

Svoluji k zapůjčení své dizertační práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Ludmila Veselá

Úloha ARE5 ABCF proteinů v antibiotické rezistenci a regulaci
u rodu *Streptomyces*

The role of ARE5 ABCF proteins in antibiotic resistance and regulation
in the genus *Streptomyces*

Dizertační práce

Vedoucí práce: Mgr. Gabriela Balíková Novotná, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Pro stylistickou úpravu některých pasáží tohoto textu bylo využité AI. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 16. 2. 2025

.....
Mgr. Ludmila Veselá

Tato dizertační práce vznikla v letech 2015-2025 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i. v detašovaném týmu laboratoře Antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky v rámci projektu Biotechnologického a biomedicínského centra Akademie věd a Univerzity Karlovy (BIOCEV) pod odborným vedením Mgr. Gabriely Balíkové Novotné Ph.D. Práce je založena na publikacích, jejichž kopie tvoří přílohu této závěrečné práce a byla finančně podpořena projekty, jejichž přehled je uveden níže. Dílčí části práce byly prezentovány na níže uvedených mezinárodních konferencích.

Přehled projektů

- Grantová agentura České republiky (projekt 15-16225Y a P302-12-P632)
- Grantová agentura Univerzity Karlovy (projekt 1767418)
- BIOCEV – Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy, Evropský fond pro regionální rozvoj (projekt CZ.1.05/1.1.00/02.0109)
- Cestovní stipendium poskytnuté nadací Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových

Přehled absolvovaných mezinárodních konferencí

- *Central European Symposium on Antimicrobials and Antimicrobial Resistance* (CESAR 2015), Šibeník – Chorvatská republika
- *8th Congress of European Microbiologists* (FEMS 2019), Glasgow – Velká Británie

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné, Ph.D. za odborné vedení dizertační práce a cenné připomínky během mého působení v laboratoři Antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky. Za přínosnou spolupráci děkuji Mgr. Markétě Koběrské, Ph.D., Mgr. Vladimírovi Vimbergovi, Ph.D., Mgr. Zdeňkovi Kameníkovi, Ph.D. a Mgr. Jakubovi Lenartovi, Ph.D.

Mé poděkování patří také Nadaci Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových za poskytnutí finančních prostředků na cestovné spojené s účastí na konferenci 8th Congress of European Microbiologists (FEMS 2019) v Glasgow.

Zvláštní poděkování směřuji členům laboratoře Regulace transkripce v Brně, zejména jejímu vedoucímu Mgr. Gabrielovi Demovi, Ph.D., Mgr. Sylvě Brabencové, Ph.D. a RNDr. Aleně Pastuchové za poskytnutou podporu a zázemí během psaní dizertační práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich vydatnou podporu, trpělivost a pochopení nejen v průběhu psaní dizertační práce.

Abstrakt

Mikroorganismy se potřebují rychle adaptovat na změny prostředí, což vede k optimalizaci jejich genové exprese a jejímu vyústění v různé fenotypické projevy. Dynamika a komplexnost této plasticity není za současného stavu poznání stále plně pochopena. Tato práce se zaměřuje na rezistenční proteiny ARE5 podrodiny ABCF proteinů, které udílejí rezistenci vůči antibiotikům inhibujícím translaci vazbou na velkou 50S ribozomální podjednotku, konkrétně vůči linkosamidům, streptograminům A a pleuromutilinům (LS_{AP}). U producenta linkomycinu *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 se nám podařilo popsat zapojení ARE5 proteinu LmrC do nově objevené signální kaskády. Tato kaskáda urychluje nástup produkce linkomycinu v odpovědi na přítomnost antibiotik v prostředí, čímž dochází k synchronizaci produkce linkomycinu v bakteriální populaci. Protein LmrC spouští expresi pozitivního regulátoru LmbU, ten dále spouští vlastní produkci linkomycinu. Následně je produkce LmrC potlačena funkcí zbylých dvou rezistenčních proteinů LmrA a LmrB, jejichž geny jsou kódovány v linkomycinovém biosyntetickém genovém klastru (BGC) spolu s geny *lmrC* a *lmbU*.

Vliv na produkci sekundárních metabolitů byl pozorován také pro ARE5 proteiny TiaA (SCO0636) a SCO6720 kódované v genomu bakterie *Streptomyces coelicolor* M145. Tyto proteiny modulují v odpovědi na přítomnost LS_{AP} antibiotik produkci redox-aktivního, modře zbarveného antibiotika aktinorodinu (ACT), jehož produkce se aktivuje přítomností antibiotik inhibujících translaci. TiaA je navíc rozhodujícím rezistenčním faktorem zodpovědným za rezistenci *S. coelicolor* k pleuromutilinu, který je produkován houbou *Clitopilus passeckerianus*. Dle fylogenetické analýzy a společné kultivace obou kmenů je tato rezistence z hlediska mezidruhové interakce klíčová.

V reakci na duální funkci proteinu LmrC se dále povedlo objevit adaptivní systém, který bakterii *S. coelicolor* umožňuje dynamickou reakci na přítomnost LS_{AP} antibiotik odrážející jejich koncentraci. Zmíněný adaptivní systém spoléhá na funkční kooperaci TiaA s proteinem SCO6720. Tento protein je zapojen v reakci bakterie na nízké koncentrace antibiotik. Dále byl potvrzen jeho vliv na WblC regulon, který je zodpovědný za rezistenci k linkomycinu. Exprese *tiaA* je naopak spouštěna ve vyšších koncentracích indukujících antibiotik. Poněvadž zástupci kmene *Actinobacteria* dle fylogenetické analýzy ARE5 ABCF proteinů obsahují ustálené dvojice ARE5 proteinů, zdá se, že je tento adaptivní mechanismus kooperace konzervovaný. Prostřednictvím své rezistenční funkce působí ARE5 ABCF proteiny zároveň jako globální translační regulátory. Tato práce mění zažitý pohled na ARE5 ABCF proteiny jako rezistenční proteiny a zdůrazňuje jejich duální, rezistenčně-regulační roli, která má širší ekologický a fyziologický význam.

Klíčová slova:

ARE ABCF proteiny, LmrC, TiaA, *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces coelicolor*, LS_{AP} antibiotická rezistence, linkomycinový BGC, mikrobiální interakce, regulace BGC

Abstract

Microorganisms need to quickly adapt to environmental changes, which leads to optimization of their gene expression and its manifestation in various phenotypic traits. The dynamics and complexity of this plasticity are not yet fully understood given the current state of knowledge. This work focuses on ARE5 resistance proteins of the ABCF protein subfamily, which provide resistance to antibiotics that inhibit translation by binding to the large 50S ribosomal subunit, specifically to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LS_{AP}). In the lincomycin producer *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466, we described the involvement of the ARE5 protein LmrC in a newly described signalling cascade. This cascade accelerates the onset of lincomycin production in response to the presence of antibiotics in the environment, leading to synchronization of lincomycin production in the bacterial population. The LmrC protein triggers the expression of the positive regulator LmbU, which further triggers lincomycin production itself. Subsequently, LmrC production is suppressed by the function of the remaining two resistance proteins LmrA and LmrB, whose genes are encoded in the lincomycin biosynthetic gene cluster (BGC) together with the *lmrC* and *lmbU* genes.

The influence on secondary metabolite production was also observed for ARE5 proteins TiaA (SCO0636) and SCO6720 encoded in the genome of *Streptomyces coelicolor* M145. These proteins modulate the production of the redox-active, blue-coloured antibiotic actinorhodin (ACT) in response to the presence of LS_{AP} antibiotics, whose production is activated by the presence of translation-inhibiting antibiotics. Moreover, TiaA is a crucial resistance factor responsible for *S. coelicolor*'s resistance to pleuromutilin, which is produced by the fungus *Clitopilus passeckerianus*. According to phylogenetic analysis and co-cultivation of both strains, this resistance is crucial in terms of interspecies interaction.

In response to the dual function of the LmrC protein, we further discovered an adaptive system that allows *S. coelicolor* to dynamically react to the presence of LS_{AP} antibiotics reflecting their concentration. This adaptive system relies on the functional cooperation of TiaA with the protein SCO6720. This protein is involved in the bacterial response to low antibiotic concentrations. Furthermore, its influence on the WblC regulon, which is responsible for lincomycin resistance, was confirmed. In contrast, *tiaA* expression is triggered at higher concentrations of inducing antibiotics. Since members of the *Actinobacteria* phylum contain established pairs of ARE5 proteins according to phylogenetic analysis of ARE5 ABCF proteins, this adaptive mechanism of cooperation appears to be conserved. Through their resistance function, ARE5 ABCF proteins also act as global translational regulators. This work changes the established view of ARE5 ABCF proteins as resistance proteins and emphasizes their dual, resistance-regulatory role, which has broader ecological and physiological significance.

Key words:

ARE ABCF proteins, LmrC, TiaA, *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces coelicolor*, LS_{AP} antibiotic resistance, BGC of lincomycin, microbial interactions, regulation of BGC

Obsah

1.	Úvod.....	13
2.	Literární přehled	15
2.1.	Antibiotika zacílená na translaci	15
2.1.1.	Bakteriální proteosyntéza	15
2.1.2.	Antibiotika vázající se na 50S ribozomální podjednotku	18
2.1.2.1.	Linkosamidy	18
2.1.2.2.	Streptograminy	19
2.1.2.3.	Makrolidy	20
2.1.2.4.	Pleuromutiliny	20
2.1.2.5.	Amfenikoly a oxazolidinony	21
2.1.2.6.	Aminonukleosidová antibiotika a hygromycin A	22
2.1.3.	Role antibiotik v přírodě.....	22
2.2.	Biosyntéza antibiotik a producenti	24
2.2.1.	Regulace BGC.....	25
2.2.2.	<i>Streptomyces coelicolor</i>	27
2.2.2.1.	Aktinorodin	28
2.2.2.2.	Undecylprodigiosin	31
2.2.3.	Linkomycinový BGC	33
2.3.	Bakteriální ABCF proteiny	35
2.3.1.	Charakterizace ABCF proteinů	35
2.3.1.1.	ABCF proteiny s regulační funkcí	36
2.3.1.2.	Rezistence zprostředkována ABCF proteiny	37
2.3.2.	Struktura.....	39
2.3.3.	Interakce ABCF proteinů s ribozomem.....	41
2.3.4.	Mechanismus funkce ABCF proteinů	41
2.3.5.	Regulace exprese ABCF proteinů	44
2.3.6.	ABCF proteiny v biosyntetických genových klastrech	48
3.	Cíle dizertační práce	50
4.	Materiál a metody.....	51
4.1.	Materiál	51
4.1.1.	Bakteriální kmeny	51
4.1.2.	Kmeny hub	53
4.1.3.	Vektory.....	54
4.1.4.	Kultivační média	56
4.1.5.	Pufry a roztoky	58
4.1.6.	Primery	60

4.1.7.	Komerční soupravy a standardy	60
4.1.8.	Protilátky a detekční systém pro Western blot	61
4.1.9.	Enzymy	63
4.1.10.	Bioinformatické nástroje	63
4.1.10.1.	Software a internetové aplikace.....	63
4.1.10.2.	Databáze	64
4.1.10.3.	Použité chemikálie	64
4.2.	Metody	66
4.2.1.	Podmínky kultivace a následného uschování mikrobiálních kultur.....	66
4.2.1.1.	Kultivace a uchování kmenů <i>Escherichia coli</i>	66
4.2.1.2.	Kultivace a uchování bakterií kmene <i>Actinobacteria</i>	66
4.2.1.3.	Kultivace <i>Clitopilus passeckerianus</i>	67
4.2.2.	Transformace bakteriálních kmenů <i>Escherichia coli</i>	68
4.2.2.1.	Transformace tepelným šokem.....	68
4.2.2.2.	Transformace elektroporací.....	69
4.2.3.	Mezidruhová konjugace	70
4.2.4.	Metody práce s DNA.....	72
4.2.4.1.	DNA elektroforéza v agarosovém gelu	72
4.2.4.2.	Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu.....	72
4.2.4.3.	Izolace plazmidové DNA	72
4.2.4.4.	Izolace chromozomální DNA	72
4.2.4.5.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	73
4.2.4.6.	Místně specifická mutageneze.....	76
4.2.4.7.	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	77
4.2.4.8.	Ligace DNA	78
4.2.4.9.	Sekvenace DNA	79
4.2.5.	Metody práce s RNA.....	79
4.2.5.1.	Izolace celkové RNA.....	79
4.2.5.2.	Enzymatické odstranění DNA z celkové RNA.....	80
4.2.5.3.	Reverzní transkripce RNA a následná PCR (RT-PCR).....	80
4.2.6.	Metody práce s proteiny	82
4.2.6.1.	Proteinová elektroforéza – SDS-PAGE.....	82
4.2.6.2.	Barvení SDS-PAGE gelu.....	83
4.2.6.3.	Western blot a imunodetekce proteinů	83
4.2.6.4.	Purifikace proteinu LmrC.....	84
4.2.7.	Analýza produkce linkomycinu pomocí LC-MS.....	85
4.2.7.1.	Kultivace <i>Streptomyces lincolnensis</i> pro stanovení linkomycinové produkce	85
4.2.7.2.	Extrakce linkomycinu.....	85

4.2.7.3.	LC-MS analýza	85
4.2.8.	Stanovení citlivosti bakteriálních kmenů.....	86
4.2.8.1.	Agarová diluční metoda	86
4.2.8.2.	Diskový difuzní test.....	88
4.2.9.	Kapkový test.....	88
4.2.10.	Sledování ACT produkce	89
4.2.11.	Společná kultivace kmenů <i>Streptomyces</i> a <i>Clitopilus</i>	89
4.2.12.	Mikroskopické pozorování rodu <i>Streptomyces</i>	90
4.2.12.1.	Mikroskopické pozorování morfologie mycelia <i>Streptomyces lincolnensis</i>	90
4.2.12.2.	Fluorescenční mikroskopie.....	90
4.2.13.	<i>In vitro</i> translační systém	90
4.2.13.1.	Příprava translačního lyzátu <i>Enterococcus faecalis</i>	90
4.2.13.2.	Příprava translačního lyzátu <i>Streptomyces lincolnensis</i>	91
4.2.13.3.	Příprava <i>in vitro</i> translačního systému pro <i>Enterococcus faecalis</i> – optimalizovaný protokol	91
4.2.14.	Ribozomální profil	92
4.2.14.1.	Ribozomální profil pro detekci LmrC na ribozomech.....	92
4.2.14.2.	Ribozomální profil translačního lyzátu	93
4.2.15.	Subcelulární frakcionace a analýza distribuce LmrC	93
4.2.16.	Fylogenetická analýza ARE5 ABCF proteinů.....	94
5.	Výsledky	96
5.1.	Úloha proteinu LmrC v rezistenční fenotypu producenta linkomycinu	96
5.1.1.	Příprava bakteriálních kmenů a konstruktů	96
5.1.2.	Stanovení citlivosti.....	101
5.1.3.	Specifita antibiotické rezistence zprostředkovaná LmrC	103
5.2.	Ovlivnění bakteriálního růstu v přítomnosti proteinu LmrC a jeho variant.....	104
5.2.1.	Vliv ATPáz deficientní varianty LmrC na bakteriální růst.....	107
5.2.2.	Příprava konstruktů pro expresi ATPáza deficientních LmrC variant.....	108
5.2.2.1.	Optimalizace podmínek indukce	109
5.2.2.2.	Charakterizace růstových defektů v přítomnosti EQ mutantních variant LmrC.....	111
5.3.	Role proteinu LmrC v antibiotiky indukované produkci linkomycinu	113
5.4.	Indukce produkce proteinu LmrC LS _A P antibiotiky	115
5.5.	Charakterizace rezistenční specifity ARE5 proteinů u <i>Streptomyces coelicolor</i> M145.....	119
5.5.1.	Příprava konstruktů a kmenů pro analýzu funkce ARE5 proteinů u <i>S. coelicolor</i>	119
5.5.2.	Stanovení citlivostí.....	121
5.5.3.	Rezistence k tiamulinu v rodě <i>Actinobacteria</i>	122
5.5.3.1.	Bioinformatická analýza regulačních oblastí před ARE5 proteiny.....	126
5.6.	Mezidruhové interakce <i>Streptomyces coelicolor</i> a <i>Clitopilus passeckerianus</i>	127

5.7.	ARE5 proteiny TiaA a SCO6720 ovlivňují produkci ACT indukovanou ribozom-vazebnými antibiotiky.....	130
5.8.	Heterologní exprese a nadprodukce ABCF proteinů ve spojitosti s rezistencí a produkcí ACT.....	132
5.8.1.	Příprava konstruktů a kmenů.....	133
5.8.2.	Testování fenotypů.....	135
5.9.	Optimalizace metod pro studium proteinu LmrC v <i>in vitro</i> podmínkách.....	138
5.9.1.	Purifikace proteinu LmrC.....	139
5.9.2.	<i>In vitro</i> transkripčně-translační systém.....	141
5.10.	Buněčná lokalizace proteinu LmrC a jeho interakce s ribozomy.....	143
6.	Diskuze.....	149
7.	Souhrn	156
8.	Seznam literatury.....	157
9.	Přílohy	172

Abecední seznam použitých zkratek

(p)ppGpp	guanosine tetraphosphate/pentaphosphate	guanosin tetrafosfát/pentafosfát
30S IC	<u>30S</u> initiation complex	30S iniciační komplex
5'UTR	5' <u>un</u> translated <u>re</u> gion of mRNA	5' nepřekládaná oblast mRNA
ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette protein	ATP-vazebný protein
ABCF	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette proteins subfamily <u>F</u>	ABC protein podrodiny F
ACT	actinorhodin	aktinorodin
AMP-PNP	adenylyl-imidodiphosphate	adenylyl-imidodifosfát
ARD	<u>a</u> ntibiotic <u>r</u> esistance <u>d</u> omain	doména antibiotické rezistence
ARE ABCF	<u>a</u> ntibiotic <u>r</u> esistance ABCF	rezistenční proteiny z podrodiny ABCF
A-místo	aminoacyl/acceptor ribosome site	aminoacylové/akceptorové místo ribozomu
A-tRNA	aminoacyl-tRNA	aminoacyl-tRNA (tRNA s navázanou aminokyselinou v A-místě ribozomu)
BGC	<u>b</u> iosynthetic <u>g</u> ene <u>c</u> luster	biosyntetický genový klastr
CAM	chloramphenicol	chloramfenikol
cAMP	<u>c</u> yclic <u>a</u> denosin <u>m</u> onophosphate	cyklické AMP
CARB	carbenicilin	karbenicilin
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA	komplementární DNA
CDA	<u>c</u> alcium- <u>d</u> ependent <u>a</u> ntibiotic	kalcium-dependentní antibiotikum
CLI	clindamycin	klindamycin
CP	<u>c</u> entral protuberance	centrální výběžek
CSR	<u>c</u> luster- <u>s</u> ituated <u>r</u> egulator	regulátor lokalizovaný v BGC
CTD	<u>C</u> - <u>t</u> erminal <u>d</u> omain	C-terminální doména
CTE	<u>C</u> - <u>t</u> erminal <u>e</u> xtension	C-terminální prodloužení
CV	<u>c</u> olumn <u>v</u> olume	objem kolony
EF	<u>e</u> longation <u>f</u> actor	elongační faktor
EGT	ergothioneine	ergothionein
E-místo	exit ribosome site	výstupní místo ribozomu
Erm	<u>e</u> rythromycin- <u>r</u> ibosome <u>m</u> ethylase	-
ERY	erythromycin	erytromycin
EtBr	ethidium bromide	ethidium bromid
IF	<u>i</u> nitiation <u>f</u> actor	iniciační faktory

LAL	large ATP-binding regulator of the LuxR like family	-
LIN	lincomycin	linkomycin
LNZ	linezolid	linezolid
LP	leader peptide	vedoucí peptid
LS _A P	lincosamides, streptogramins <u>A</u> and pleuromutilins	linkosamidy, streptograminy A a pleuromutiliny
LSM	lincosamide	linkosamid
LSM-GDP	GDP-activated lincosamide	linkosamid aktivovaný pomocí GDP
MAM	macrolide arrest motif	motiv makrolidy indukovaného zastavení ribozomu
MBC	4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxaldehyde	4-metoxo-2,2'-bipyrrol-5-karboxaldehyd
MFS	major facilitator superfamily	-
MIC	minimal inhibitory concentration	minimální inhibiční koncentrace
MLS _B	macrolides, lincosamides and streptogramins <u>B</u>	makrolidy, linkosamidy a streptograminy B
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	meticilin-rezistentní kmen <i>Staphylococcus aureus</i>
MS _B	macrolides and streptogramins <u>B</u>	makrolidy a streptograminy B
MSH	mycothiol	mykothiol
MsrA	macrolide and streptogramin B resistance	-
MTL	methylthiolincosaminide	metylthiolinkosamid
NBD	nucleotide binding domain	nukleotid vazebná doména
NPET	nascent peptide exit tunnel	výstupní kanál nascentního peptidy
NTP	nucleoside triphosphate	nukleosidtrifosfát
OD	optical density	optická denzita
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
PEG	polyethylen glycol	polyethylenglykol
PhO	phenicols, oxazolidinones	amfenikoly, oxazolidinony
PIA	pristinamycin <u>IA</u>	pristinamycin IA
PIIA	pristinamycin <u>IIA</u>	pristinamycin IIA
PKS	polyketide synthase	polyketid syntetáza
P-místo	peptidyl ribosome site	peptidylové místo ribozomu
ppGpp	guanosine tetraphosphate	guanosin tetrafosfát

PPL	propylproline	propylprolin
PTC	peptidyl transferase center	peptidyltransferacové centrum
PtIM	P-site tRNA interaction motif	peptidyl-tRNA interakční motiv
P-tRNA	peptidyl-tRNA	peptidyl-tRNA (tRNA s navázaným rostoucím peptidovým řetězcem v P-místě ribozomu)
PURO	puromycin	puromycin
PVDF	polyvinylidenedifluoride	polyvinylidendifluorid
RBS	ribosome binding site	ribozom vazebné místo
RED	undecylprodigiosin	undecylprodigiosin
RET	retapamulin	retapamulin
RF	release factor	terminační faktor
RNAP	RNA polymerase	RNA polymeráza
ROS	reactive oxygen species	reaktivní forma kyslíku
RPM	revolutions per minute	počet otáček za minutu
RRF	ribosome release/recycling factor	ribozomální recyklační faktor
rRNA	ribosomal ribonucleic acid	ribozomální ribonukleová kyselina
RT	room temperature	pokojová teplota
S _A	streptogramin A	streptogramin A
SAM	S-adenosyl methionine	S-adenosylmethionin
SARP	<i>Streptomyces</i> antibiotic regulatory protein	-
S _B	streptogramin B	streptogramin B
SD	Shine-Dalgarno sequence	Shine-Dalgarnova sekvence
SRC	stalled ribosomal complex	uzamčený ribozomální komplex
TELI	telithromycin	telitromycin
TET	tetracycline	tetracyklin
TIA	tiamulin	tiamulin
TMD	transmembrane domain	transmembránová doména
tRNA	transfer ribonucleic acid	transferová ribonukleová kyselina
uORF	upstream open reading frame	vedoucí otevřený čtecí rámeček
VGM	virginamycin M	virginamycin M
VRE	vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>	vankomycin-rezistentní kmeny rodu <i>Enterococcus</i>
WT	wilde type	divoký druh

1. Úvod

Zavedení antibiotik do lékařské praxe mělo revoluční dopad na společnost, neboť přispělo ke kontrole infekčních onemocnění doprovázené významným snížením úmrtnosti. Z historických pramenů je však patrné, že antibiotika byla využívána již před nástupem moderní medicíny, jak dokládá přítomnost tetracyklinu v kosterních pozůstatcích datovaných do 350–550 n.l. nebo používání chleba pokrytého plísní pro léčbu ran a popálenin ve starověkém Egyptě (1–3). Přestože zavedení antibiotik do lékařské praxe přineslo zásadní pokrok v medicíně bylo provázeno silným selekčním tlakem, který vyústil ve vznik rezistentních bakteriálních kmenů (4). V současnosti představuje výskyt multirezistentních bakteriálních kmenů globální hrozbu, na kterou upozorňuje i Světová zdravotnická organizace (WHO), čímž se dostal tento problém do povědomí širší veřejnosti (5).

Velká část klinicky používaných antibiotik je přírodního původu nebo je z přírodních látek odvozena. Produkována jsou zejména bakteriemi a houbami (6). Jejich produkce je neodvratně spjata i s ochranou producentů před jejich toxickým účinkem. Přírodní prostředí tak tvoří bohatý rezervoár rezistenčních genů, které mohou být přenášeny pomocí horizontálního přenosu na okolní bakterie (4, 7). Dlouhou dobu bylo na antibiotika pohlíženo jen jako na látky používané k léčbě infekcí, v současnosti jsou však vnímána mnohem komplexněji. Častěji je studována jejich ekologická role, neboť kromě klíčové role v eliminaci infekcí hrají také významnou roli jako signální molekuly v interakcích mezi mikroorganismy (6).

Antibiotika a s antibiotiky spojené rezistenční mechanismy byly v přírodě dříve, než se o ně začalo zajímat lidstvo. To značí, že mají nezastupitelnou úlohu v celém ekosystému, protože schopnost komunikace je v dynamickém prostředí, které mikroorganismy obývají, nepostradatelná. Funkce antibiotik se odvíjí od jejich dosažené koncentrace v prostředí. Ve vysokých koncentracích negativně ovlivňují růst okolních bakterií a tím poskytují svým producentům selekční výhodu v kompetici o živiny. V subinhibičních koncentracích pak fungují jako signální molekuly ovlivňující genovou expresi okolních organismů. Tím dochází k synchronizaci chování v rámci populace a ovlivnění fyziologických vlastností jednotlivých jedinců. Antibiotika mají tedy duální funkci, která je závislá na jejich koncentraci (6, 8, 9).

Důležitými producenty antibiotik jsou zástupci rodu *Streptomyces* obývající půdu i vodní prostředí. Mezi těmito antibiotiky mají nezastupitelnou roli skupiny, které inhibují translaci prostřednictvím vazby na velkou 50S ribozomální podjednotku. Rod *Streptomyces* produkuje různé skupiny antibiotik cílených na ribozom, mezi které patří makrolidy, linkosamidy, streptograminy A a B (10, 11). Geny pro tyto biosyntetické dráhy jsou v genomu lokalizované v úsecích nazývaných biosyntetické genové klastry (BGC). Bakterie zpravidla využívají kombinaci několika rezistenčních mechanismů k vlastní ochraně, což se odráží v častém výskytu většího počtu rezistenčních genů v rámci jednoho BGC (12). V klastrech pro syntézu antibiotik cílených do peptidyltransferázového centra (PTC) a výstupního tunelu ribozomu se často nachází geny pro ARE (antibiotic resistance) ABCF proteiny (13–17).

ABCF proteiny patří do velké proteinové nadrodiny ABC proteinů, které jsou z velké části zapojeny do transportu látek. Na rozdíl od nich ABCF proteiny interagují s ribozomem a účastní se proteosyntézy jako záchranné faktory. ARE ABCF proteiny udílí rezistenci k translačním inhibitorům mechanismem ochrany ribozomu (18–21). ABCF proteiny označované v této práci jako regulační se podílí na udržení aktivní proteosyntézy v případě obtížně translatovatelných sekvencí (22–24). Obě skupiny ABCF proteinů mají tedy schopnost zachránit ribozom zastavený antibiotikem nebo komplikovaným mRNA templátem. Navíc bylo

ukázáno, že regulační ABCF protein EttA je zapojen do regulace translace enzymů primárního metabolismu, konkrétně citrátového a glyoxylátového cyklu (23). Velká srovnávací fylogenetická analýza odhalila, že se ABCF proteiny dále člení do 45 podskupin, mezi kterými je 7 označovaných jako ARE, avšak funkce většiny z nich nebyla studována. ABCF proteiny tak zůstávají stále málo prozkoumanou skupinou ABC proteinů (25).

V rámci této práce jsem se zaměřila na charakterizaci funkce ARE5 ABCF proteinů, a to konkrétně na protein LmrC z linkomycinového BGC ze *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 a TiaA (SCO0636) a SCO6720 ze *Streptomyces coelicolor* M145. Ukazují, že se tyto proteiny mohou vedle rezistence k linkosamidům, streptograminům A a pleuromutilinům (LS_AP) podílet na ovlivnění genové exprese v reakci na antibiotický signál. Konkrétně se vůbec poprvé povedlo ukázat, že ARE5 protein LmrC spouští produkci linkomycinu v reakci na přítomnost linkosamidových antibiotik. Vliv na genovou expresi jsem následně detekovala i u ARE5 proteinů TiaA a SCO6720 jejichž geny nejsou spojeny s BGC. Zjistila jsem, že tyto proteiny modulují produkci aktinorodinu (ACT) indukovanou antibiotiky. Na základě výsledků jsme navrhli mechanismus, kterým ARE ABCF proteiny prostřednictvím své rezistenční funkce regulují genovou expresi v závislosti na koncentraci antibiotik. Tato práce sjednocuje pohled na ARE ABCF a regulační ABCF proteiny, protože obě skupiny regulují genovou expresi v závislosti na inhibici translace, kdy se liší jen původ této inhibice.

2. Literární přehled

2.1. Antibiotika zacílená na translaci

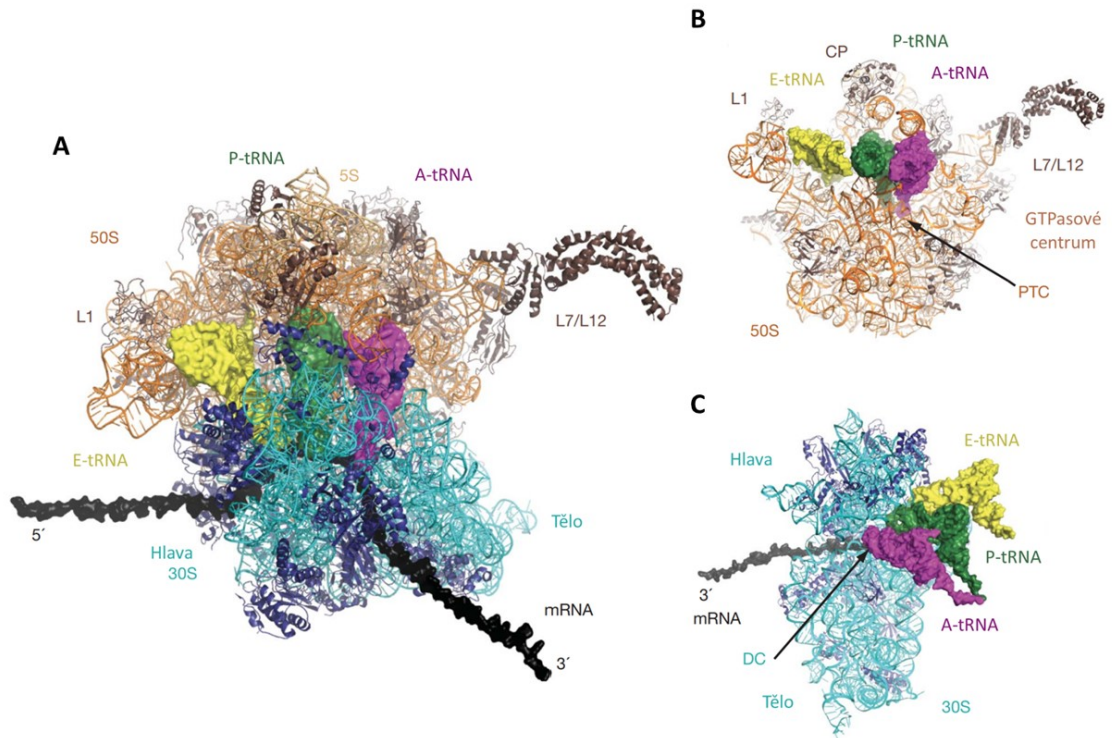
Antibiotika jsou malé bioaktivní molekuly, které jsou produkovány v rámci sekundárního metabolismu, též označovaného jako specializovaný metabolismus, různými mikroorganismy jako jsou bakterie a houby (26–28). Váží se na životně důležité buněčné struktury a tím inhibují klíčové mikrobiální procesy jakými jsou replikace, transkripce, či syntéza buněčné stěny. Velké množství klinicky významných antibiotik je pak zacíleno na inhibici translace (29, 30). Objev antibiotik byl pro lidskou společnost velkým krokem vpřed. Umožnil léčbu infekčních onemocnění, čímž bylo možné odvrátit epidemie, které postihovaly lidstvo v průběhu dějin (3). Spolu s jejich zavedením do lékařské praxe se však začaly objevovat bakteriální kmeny, které jsou k použitým antibiotikům rezistentní (4).

Chemické modifikace původních, v přírodě se vyskytujících, látek vedly k semisyntetickým a později čistě syntetickým derivátům, které se vyznačují lepšími vlastnostmi než původní antibiotika (31). Některé dokonce překonávají vzniklé rezistence. Velkou škálu klinicky používaných antibiotik produkují zástupci kmene *Actinobacteria*, kteří mají nepostradatelnou úlohu nejen z medicínského, ale také ekologického hlediska, kde jsou zapojeny do koloběhu látek a mezidruhových interakcí.

2.1.1. Bakteriální proteosyntéza

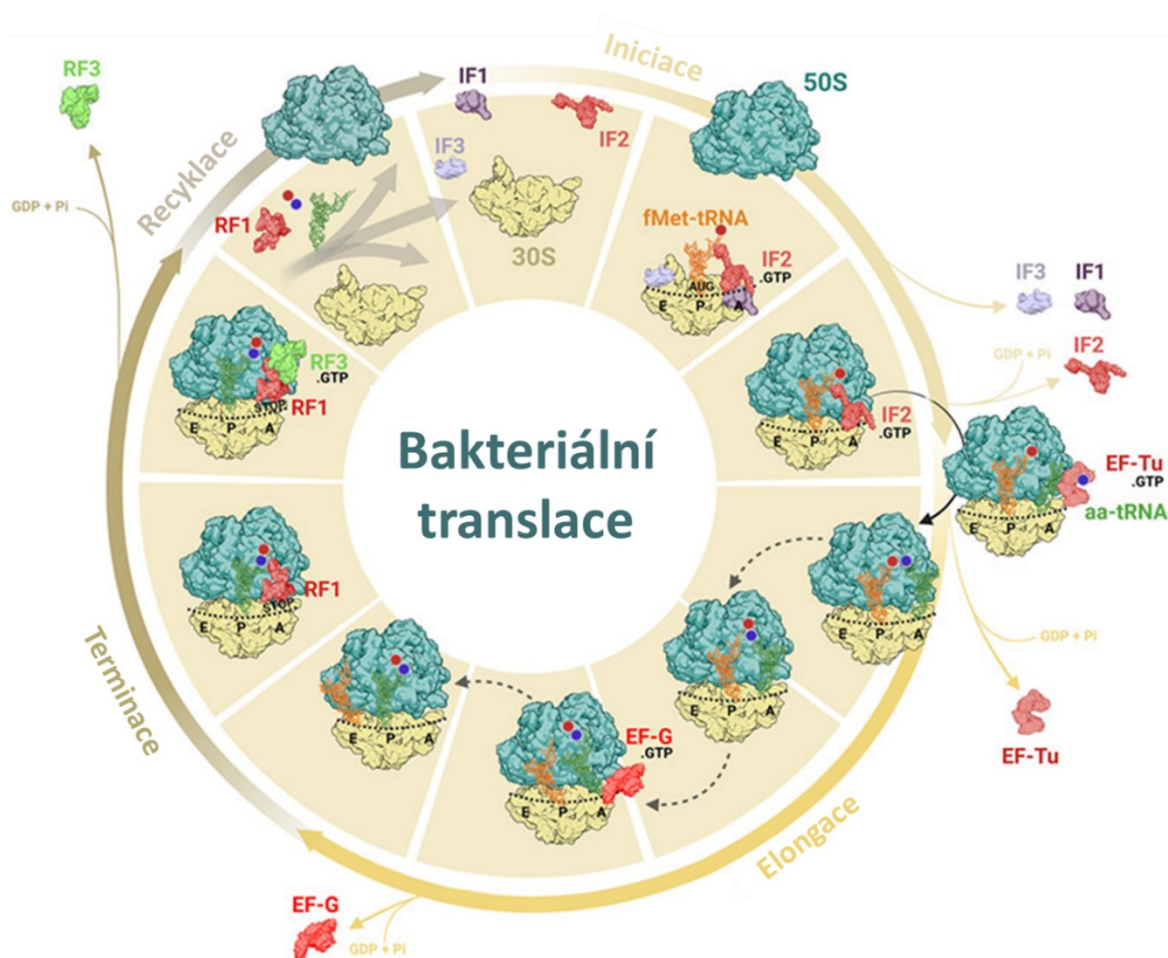
Jedním z nejdůležitějších fyziologických procesů je translace, při které jsou syntetizovány proteiny. Dochází při ní k dekodování informace obsažené v mediátorové RNA (mRNA) prostřednictvím aminoacylované transferové RNA (tRNA) do aminokyselinové sekvence, která tvoří polypeptidový řetězec. Informace v templátové mRNA jsou kódovány ve formě tří nukleotidů zvaných kodón, které se párují s třemi nukleotidy v antikodonové smyčce tRNA nesoucí příslušnou aminokyselinu. Přesnost translace je velmi důležitá pro správnou funkci buňky (32, 33). K biosyntetickému procesu dochází na velkém ribonukleoproteinovém komplexu, který je nazýván ribozom. Bakteriální 70S ribozom je tvořen dvěma podjednotkami – malou 30S ribozomální podjednotkou a velkou 50S podjednotkou (Obr. 1A). Malá 30S ribozomální podjednotka je tvořena 16S ribozomální RNA (rRNA) a 21 ribozomálními proteiny (S1-S21), které strukturně tvoří tři základní domény označované jako hlava, krk a tělo. Role 30S podjednotky spočívá v dekodování templátové mRNA vázané mezi hlavou a tělem a v přesnosti translace (Obr. 1C) (34–36). Velká 50S ribozomální podjednotka se skládá z 23S rRNA, 5S rRNA a 34 proteinů (L1-L34) (37). Sekundární struktura 23S rRNA je tvořena šesti doménami (I-VI). Velká 50S podjednotka obsahuje několik významných míst (Obr. 1B). V peptidyltransferázovém centru (PTC) dochází k vytvoření peptidové vazby. Syntetizovaný polypeptid vychází z ribozomu přes výstupní kanál (nascent peptide exit tunnel (NPET)), který je přibližně 100 Å dlouhý a 10–20 Å široký se zúžením, ke kterému dochází u proteinů L4 a L22. Dalším výrazným regionem je centrální výběžek (CP). Velká ribozomální podjednotka dále obsahuje dynamické struktury, jakými jsou L1 doména (L1 stalk) a L7/L12 doména, která je součástí GTPázového centra, které obsahuje také ribozomální proteiny L6, L11, L14, a kam se v průběhu proteosyntézy váží různé translační faktory (36, 38–40). Proces translace do značné míry závisí na konformační dynamice ribozomu. Rozsáhlé přestavby ribozomů v průběhu proteosyntézy umožňují translokaci mRNA a tRNA. Na ribozomu rozlišujeme tři vazebná místa pro tRNA – aminoacylové (A), peptidylové (P) a výstupní (E) místo (33).

Do A-místa se váže nová aminoacyl-tRNA, která nese aminokyselinu kódovanou na mRNA. V P-místě je lokalizována tRNA s navázaným polypeptidickým řetězcem, který je syntetizován. Posledním vazebným místem pro tRNA je E-místo, kde je vázána deacylovaná tRNA než opustí ribozom. Translace je dynamický proces, který se skládá ze čtyř fází: iniciace, elongace, terminace a recyklace ribozomu (Obr. 2); (32, 33, 36). Vlastnímu procesu translace ještě předchází důležitá část, při které dochází k aminoacylaci tRNA (41). Na všech fázích proteosyntézy se podílejí translační faktory, které zajišťují správný průběh (33).



Obrázek 1: Struktura bakteriálního ribozomu. (A) Celkový pohled na 70S ribozom, (B) velkou 50S (hnědá) a (C) malou 30S ribozomální podjednotku (modrá). Významná funkční místa a domény ribozomu jsou zvýrazněny. Navázaná mRNA je znázorněna černou barvou (převzato a upraveno (36)).

Pro efektivní zahájení syntézy proteinu by mRNA měla obsahovat iniciační kodón (u rodu *Streptomyces* AUG, nebo GUG; (42, 43)) a tzv. Shine-Dalgarno (SD) sekvenci, která je komplementární k sekvenci na 16S rRNA malé 30S podjednotky (anti-SD sekvence). Nejprve je mRNA s iniciační formylmetionyl-tRNA ($tRNA^{Met}$) navázána na P-místo 30S ribozomální podjednotky. Na formování 30S iniciačního komplexu (30S IC) se podílejí tři iniciační faktory (IF) – IF1, IF2 a IF3. V další fázi dochází k navázání velké 50S ribozomální podjednotky a uvolnění IF1 a IF3. Po disociaci IF2 spojené s hydrolyzou GTP dojde k vytvoření elongačního komplexu 70S, který umožňuje tvorbu dipeptidu a translace vstupuje do fáze elongace. Pro tvorbu dipeptidu musí být druhá aminoacylovaná tRNA umístěna do A-místa prostřednictvím elongačního faktoru Tu (EF-Tu) a následně je vytvořena peptidová vazba (33, 37).



Obrázek 2: Schématické znázornění bakteriální translace včetně zapojených translačních faktorů (převzato a upraveno (33)).

V průběhu elongace dochází k syntéze polypeptidu. Elongace je cyklus tvořený opakováním procesů dekódování mRNA, formování peptidové vazby a následné translokace. V průběhu dekódování je nová aminoacyl-tRNA přinesena pomocí GTPázy EF-Tu do volného A-místa ribozomu (36). V případě, že dojde ke správnému párování a ověření, že jde o vhodnou kódující tRNA je GTP hydrolyzováno a dojde k uvolnění EF-Tu. Po disociaci EF-Tu je 3' koncová sekvence -CCA tRNA nesoucí příslušnou aminokyselinu vzdálena 80Å od PTC. V ribozomu dojde ke konformačním změnám, které stabilizují tRNA s vhodnou aminokyselinou v A-místě ribozomu a jejímu posunu do PTC. Velká ribozomální podjednotka následně katalyzuje formování peptidové vazby, čímž dojde k přenesení polypeptidu z tRNA nacházející se v P-místě (P-tRNA) na tRNA nacházející se v A-místě (A-tRNA). Vytvořením vazby zůstane v P-místě deacylovaná tRNA a polypeptid je vázán na A-tRNA. Následuje translokace zahrnující sérii kroků synchronizujících pohyb mRNA a tRNA přes ribozom, čímž dojde k posunu o jeden kodón. Translokace je podporována elongačním faktorem EF-G (32, 33). Elongace přechází do fáze terminace ve chvíli, kdy se v A-místě ribozomu objeví terminační kodón (36).

Terminace je u bakterií zprostředkována pomocí terminačních faktorů (release factor, RF) RF1 a RF2, které rozeznávají terminační kodóny (RF1 – UAA/UAG a RF2 – UAA/UGA) na mRNA. RF faktory obsahují dvě domény. Jedna je zodpovědná za rozeznání stop kodónu a druhá, katalytická, za hydrolyzu peptidyl-tRNA v PTC (33, 44). Celý proces terminace lze rozdělit do tří částí: rozeznání terminačního

kodónu RF faktorem, hydrolyza esterové vazby mezi peptidem a tRNA a následné uvolnění RF faktoru (32). Disociace RF1 je zprostředkována pomocí RF3 a uvolněním peptidu z ribozomu. RF2 je schopen disociace samovolně. Následně je 70S ribozom s navázanou mRNA a tRNA připravený na disociaci podjednotek, aby mohl zahájit nové kolo translace. V uvolnění tRNA, mRNA a disociaci podjednotek hrají úlohu ribozomální recyklační faktor (RRF) a EF-G (33).

2.1.2. Antibiotika vázající se na 50S ribozomální podjednotku

Tyto skupiny antibiotik zahrnují chemicky různorodé látky, které však sdílejí podobná vazebná místa na velké 50S ribozomální podjednotce. Jejich navázání vede k inhibici proteosyntézy.

2.1.2.1. Linkosamidy

Linkosamidy jsou malou, ale významnou skupinou antibiotik. Jsou aktivní proti grampozitivním patogenům a vybraným gramnegativním anaerobům a protozoím (45). Významnými v přírodě se vyskytujícími zástupci jsou linkomycin (LIN), produkovaný několika zástupci rodu *Streptomyces* (*Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces spinosus* a *Streptomyces pseudogriseolus*), a celesticetin produkovaný bakterií *Streptomyces caelestis* (46). Klinicky významným linkosamidem je klindamycin (7(S)-chloro-7-deoxylinkomycin, CLI), chlorovaný semisyntetický derivát LIN (Obr. 3). Výhodou CLI je jeho vyšší účinnost v porovnání s LIN zapříčiněná přítomností chloru v molekule. Kvůli schopnosti pronikat do tkání a kostí je CLI využíván také k léčbě pojivových tkání (47). Dalšími významnějšími linkosamidy jsou semisyntetické deriváty pirlimycin a RB02 odvozené od LIN, a syntetické antibiotikum iboxamycin. Iboxamycin je schopen překonat rezistence k LIN a CLI způsobené metylací 23S rRNA a má navíc širší spektrum účinku (31).

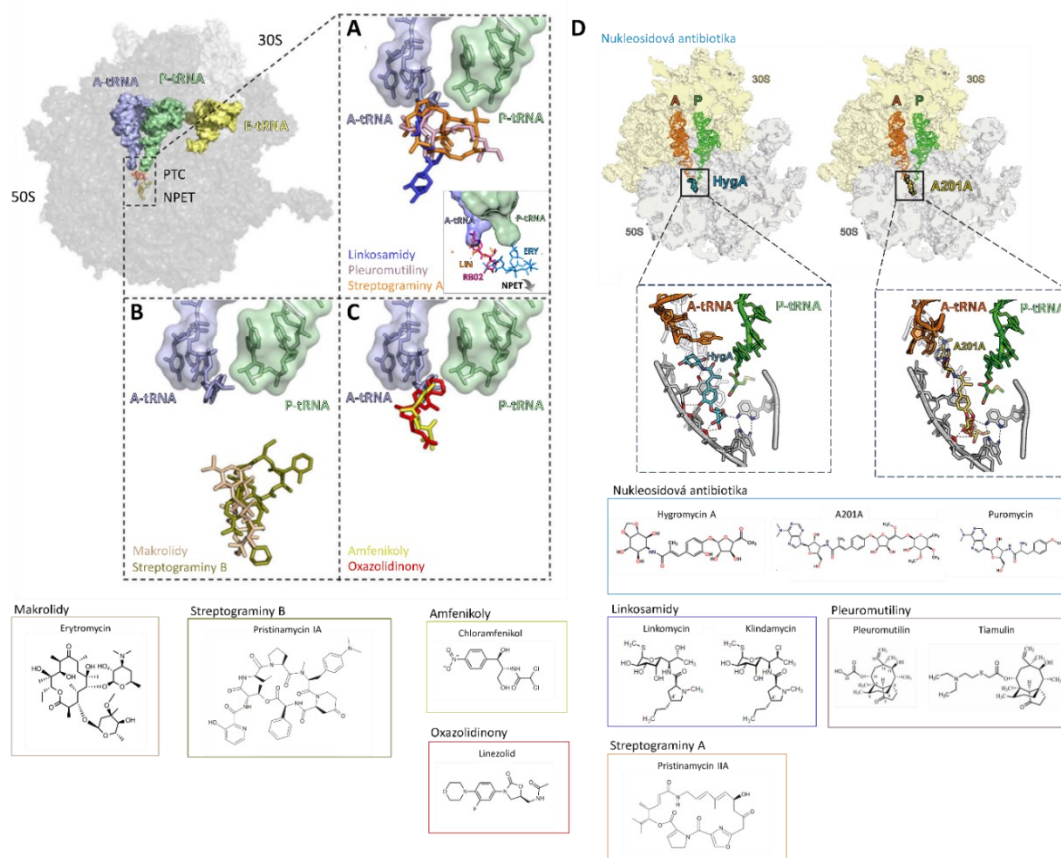
Linkosamidy jsou tvořeny prolinem spojeným s aminocukrem pomocí amidové vazby. V závislosti na typu linkosamidu může být prolin dále alkylován. V případě LIN je aminokyselinovou částí N-methylpropylprolin a sacharidovou částí metylthiolinkosamid (MTL). K syntéze dochází odděleně s výslednými meziprodukty propylprolinem (PPL) a GDP aktivovaným linkosamidem (LSM-GDP). Následně jsou obě stavební části spojeny zmíněnou amidovou vazbou a modifikovány na konečný produkt (Kap. 2.2.3.).

Všechna studovaná linkosamidová antibiotika se vážou do stejného vazebného místa (Obr. 3A). Dochází k inhibici časné fáze elongačního cyklu jejich interakcí s A- a P-místem ribozomu v PTC. Cukerná část linkosamidů je umístěna u ústí výstupního tunelu a překrývá se s vazebným místem deosaminové cukerné složky makrolidových antibiotik. Prolinová část naopak brání správnému navázání 3' koncové části A-tRNA. Při vazbě linkosamidů na ribozom hrají důležitou roli interakce s 23S rRNA, kde mají úlohu vodíkové vazby a van der Waalovy síly (48–51). V této síti dochází k drobným změnám v závislosti na konkrétním navázaném antibiotiku, např. LIN a RB02 tvoří rozdílné van der Waalovy interakce s 23S rRNA (51). Dle kinetických studií se předpokládá, že k vazbě CLI na ribozomu dochází ve dvou fázích. V první fázi dojde k blokování A-místa ribozomu navázaným antibiotikem. V následující fázi dochází k pomalému posunu antibiotika k P-místu (52, 53). Vazebné místo linkosamidů stericky blokuje syntetizovanému proteinu vstup do NPET. V případě CLI je proteosyntéza ukončena po syntéze polypeptidu o délce dvou až čtyř aminokyselin. Délka uvolněného peptidu odpovídá vazebnému místu linkosamidů (54).

2.1.2.2. Streptograminy

Streptograminová antibiotika zahrnují dvě strukturně odlišné skupiny antibiotik se synergistickým účinkem (A a B), které jsou produkovány ve směsi v poměru 70:30 zástupci rodů *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Actinomadura* a *Micromonospora*. Streptograminy A (S_A) jsou polynesenované cyklické makrolaktony, které se vážou do PTC a tím zvyšují afinitu ribozomu k streptograminům B (S_B) změnou orientace A2062. Tento synergický efekt vede k dosažení baktericidní aktivity. Samostatně mají pouze průměrný bakteriostatický účinek. S_B jsou cyklické hexadepsi- nebo heptadepsi-peptidy, které interagují s ribozomem u NPET (49, 55, 56). Obě látky inhibují translaci rozdílným mechanismem. S_B interagují s 23S rRNA v tunelu a tím brání průchodu syntetizovaného polypeptidu (Obr. 3B); (49). Výsledkem je uvolnění nedosyntetizovaného proteinu o délce 6 aminokyselin (54). S_A inhibují formování peptidové vazby v PTC změnou konformace A- a P-míst ribozomu (Obr. 3A); (57).

Streptograminy nemohou procházet skrz vnější membránu gramnegativních bakterií a jsou primárně aktivní proti grampozitivním bakteriím (58). Některé byly schváleny pro lékařské využití. Pristinamicin, směs pristinamycinu IIA (PIIA) a pristinamycinu IA (PIA; Obr. 3), byl do lékařské praxe zaveden v roce 1965. Jeho nevýhodou je jeho nízká rozpustnost. Jeho semisyntetický derivát, komerčně známý pod označením Synercid[®] – směs dalfopristinu a quinupristinu, má vyšší rozpustnost (55). Mezi další známé streptograminy patří virginiamycin M (VGM) a virginiamycin S (58).



Obrázek 3: Vazebná místa antibiotických skupin cílených na velkou 50S ribozomální podjednotku. (A) Linkosamidy, pleuromutiliny a streptograminy A se k velké 50S ribozomální podjednotce vážou v blízkosti PTC, **(B)** Vazebné místo makrolidů a streptograminů B se nachází v okolí NPET, **(C)** Amfenikoly a oxazolidinony se vážou v blízkosti PTC. **(D)** Interakce antibiotik hygromycinu A a A201A s 23S rRNA a aminoacyl-tRNA. Pro vybrané zástupce je ukázána chemická struktura (převzato a upraveno (30, 59, 60)).

2.1.2.3. Makrolidy

Makrolidy jsou velkou skupinou klinicky důležitých antibiotik zavedených do lékařské praxe již v 50. letech minulého století. Mají relativně široké spektrum využití. Běžně se používají k léčbě respiračních a gastrointestinálních infekcí, ale také k léčbě kůže a měkkých tkání. Jsou účinná jak proti grampozitivním bakteriím, jako je např. *Streptococcus pneumoniae*, tak některým gramnegativním patogenům, jako jsou *Haemophilus influenzae* či *Neisseria gonorrhoeae*. Jsou i důležitým lékem proti *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* a *Chlamydia pneumoniae*, které jsou zodpovědné za atypickou pneumonii. Dále jsou alternativním lékem při přecitlivosti k betalaktamovým antibiotikům. Dále se uplatňují ve veterinární praxi (29, 61).

Typickým zástupcem této třídy je erytromycin (ERY), produkováný bakterií *Streptomyces erythraeus*, který je využíván v experimentální části této práce (Obr. 3). Makrolidová antibiotika jsou často přírodního původu, nebo mají semisyntetický původ. Mnoho z nich je produkováno zástupci rodu *Streptomyces*, nicméně některá jsou produkována i rodem *Micromonospora* (61). Jádro makrolidů je tvořeno 12–16 členným makrolaktonovým kruhem s navázaným jedním nebo více amino-, či deoxy-cukry. Postranní řetězce určují biologické a klinické vlastnosti makrolidů (61–63). Do této antibiotické skupiny patří také ketolidy, což jsou semisyntetické deriváty 14členných makrolidů charakteristické 3-keto skupinou na laktonovém kruhu v místě L-kladinosy a alkyl-aryl postranním řetězcem (54, 61, 64).

Makrolidová antibiotika se váží do NPET nedaleko PTC (Obr. 3B). Makrolaktonový kruh je podobně orientovaný u všech makrolidů. K vazbě mezi ribozomem a makrolidy dochází prostřednictvím 23S rRNA, kde dochází k interakci s A2058, podobně jako u linkosamidů. Antibiotikum je dále stabilizováno pomocí dalších interakcí s nukleotidy 2611 a 2057 (48–50, 61, 65). V klasickém pohledu makrolidy vytvářejí proteinovou zátku a dochází k neselektivní blokaci průchodu vznikajícího peptidu vedoucí k předčasné terminaci a uvolnění peptidu o délce 3–10 aminokyselin (54, 63, 66). Nicméně mechanismus inhibice je složitější. Antibiotika umožňují průchod některým vznikajícím proteinům a proteosyntéza buňky není plně zastavena (63). Dochází k selektivnímu zastavení proteosyntézy jen určitých proteinů, které obsahují motiv makrolidy indukovaného zastavení ribozomu (macrolide arrest motifs (MAMs)). Nejvýraznějším motivem je R/K-X-R/K, kde X je libovolná aminokyselina, obklopena lyzinem, nebo argininem, nazývaný též jako +X+ motiv. Ribozom s navázaným makrolidovým antibiotikem není schopný tento motiv správně polymerovat a dojde k sekvenčně specifickému zastavení (63, 66–68). Zajímavým aspektem je, že v okamžiku zastavení, je MAM motiv v PTC a ne vedle molekuly makrolidu. Dalšími objevenými MAM motivy jsou např. RXVD, XDK (X značí libovolnou aminokyselinu), IFVI anebo IAVV motiv (63, 67). Tato schopnost je využívána i v regulaci exprese (Kap. 2.3.5.). Klasický pohled na makrolidy jako globální inhibitory proteosyntézy byl změněn na kontextově specifické inhibitory tvorby peptidové vazby.

2.1.2.4. Pleuromutiliny

Pleuromutilinová antibiotika vykazují silné antibakteriální účinky proti grampozitivním a některým gramnegativním bakteriím. Své využití našly jak ve veterinární medicíně (např. tiamulin (TIA) a valnemulin), tak klinické praxi (např. retapamulin (RET) a lefamulin); (69, 70). Jedná se o semisyntetické deriváty pleuromutilinu, antibiotika produkováného basidiomycetami *Pleurotus mutilus* (*Clitopilus scyphoides*) a *Pleurotus passeckerianus* (*Clitopilus passeckerianus*); (71). Struktura pleuromutilinů je tvořena

tricyklickým mutilinovým jádrem, na jehož C₂₁ je připojena keto skupina a na C₁₄ jsou navázány různé substituenty (72). V experimentální části této práce je využíván producent pleuromutilinu *Clitopilus passeckerianus* a semisyntetický derivát TIA (Obr. 3).

Všechny zatím testované pleuromutiliny se váží do A- a P-místa ribozomu v PTC na velké 50S ribozomální podjednotce (Obr. 3A). Konkrétně dochází k interakcím s doménou V 23S rRNA. Tricyklické jádro molekuly se váže do A-místa a postranní řetězec navázaný na C₁₄ zasahuje do P-místa (70-72). Tento postranní řetězec zesiluje interakci s 23S rRNA a to v případě TIA skrze vodíkovou vazbu s C2063 a interakce s nukleotidy A2062, U2585 a C2586 (73). Vazbou antibiotika dochází k narušení vazby tRNA do A- a P-místa ribozomu a k blokování peptidyltransferázové reakce (74, 75).

2.1.2.5. Amfenikoly a oxazolidinony

Amfenikoly jsou širokospektrá antibiotika s bakteriostatickým účinkem. Nejznámějším zástupcem této antibiotické skupiny je dříve medicínsky používaný chloramfenikol (CAM) produkováný bakteriálním kmenem *Streptomyces venezuelae* (Obr. 3); (58, 76). Od poloviny 60. let byly detekovány závažné nežádoucí účinky, mezi které patří např. aplastická anemie, a proto se v současné době používá jen ve výjimečných případech (58, 77).

Oxazolidinony jsou naopak skupinou vysoce účinných, čistě syntetických antibiotik. Jsou účinná proti širokému spektru grampozitivních bakterií a to včetně multirezistentních bakterií, jakými jsou vankomycin-rezistentní kmeny rodu *Enterococcus* (VRE) nebo meticilin-rezistentní kmen *Staphylococcus aureus* (MRSA). Jejich účinky jsou také bakteriostatické (78). Nejznámějším zástupcem je, od roku 2000 klinicky využívaný, linezolid (LNZ; Obr. 3); (79). Dalšími medicínsky využívanými oxazolidinony jsou tedizolid, který patří mezi druhou generaci oxazolidinonů, a radezolid, který je efektivní i proti LNZ rezistentním kmenům (80). Nejnovějším oxazolidinonem s klinickým využitím je contezolid, který byl v roce 2021 schválen v Číně (81).

I když jsou LNZ a CAM chemicky odlišné látky, obě se váží do PTC velké 50S ribozomální podjednotky, čímž inhibují proteosyntézu. Jejich vazebné místo se překrývá s aminoacylovou skupinou tRNA vázanou v A-místě ribozomu, čímž ovlivňuje vazbu a vhodnou orientaci A-tRNA (Obr. 3C); (48, 50, 57, 65, 82). Konformace PTC s navázaným LNZ zamezuje formování peptidové vazby, čímž dochází k inhibici translace (82). Dříve se předpokládalo, že inhibice proteosyntézy způsobená LNZ i CAM je univerzální a inhibována v časném stádiu. Další studie odhalily, že zastavení translace je sekvenčně specifické v reakci na předposlední aminokyselinu nacházející se v syntetizovaném peptidu. Pokud je touto aminokyselinou alanin, serin, či threonin dochází k zastavení proteosyntézy (83, 84). Výraznou úlohu má také akceptorová aminokyselina. Pokud je na A-místě ribozomu tRNA^{Gly}, dojde k překonání zastavení ribozomu způsobené přítomností CAM a translace dále pokračuje (83). Oxazolidinony se vážou a jsou schopné inhibovat bakteriální i archeální ribozomy, nikoliv ale lidské cytoplazmatické ribozomy. Nevýhodou této skupiny léčiv je jejich potenciál vyvolat myelosupresi a negativně ovlivnit lidské mitochondrie, a tím způsobit nežádoucí reakce. Schopnost inhibice mitochondriálních ribozomů sdílí obě skupiny antibiotik (85–87).

2.1.2.6. Aminonukleosidová antibiotika a hygromycin A

Aminonukleosidová antibiotika patří mezi různorodou skupinou nukleosidových antibiotik mikrobiálního původu se složitou strukturou (Obr. 3). Krom antibakteriální funkce mají tyto látky široké spektrum dalšího využití díky svým herbicidním, antifungicidním, antivirovým a insekticidním účinkům (88). Známým zástupcem této antibiotické skupiny je puromycin (89). Dalším antibiotikem patřícím do této skupiny je antibiotikum A201A, které bylo prvně izolováno z bakterie *Streptomyces capreolus* NRRL 3817. Je složeno z pěti podjednotek – 6-N-dimethylaminopurinu, 3'-amino-3'-deoxyribosy, α -metyl kyseliny p-kumarové, hexofuranosy a 3,4-di-O-metyl-D-rhamnosy, spojených lineárně pomocí jedné amidové a třech glykosidických vazeb (90). A201A je aktivní proti grampozitivním bakteriím a anaerobním gramnegativním bakteriím. Slabě toxický je pak i pro aerobní gramnegativní bakterie a některé houby a savce (60, 91). Strukturálně podobný hygromycin A, též označován jako totomycin (92), produkovaný bakterií *Streptomyces hygroscopicus* je složený ze tří podjednotek – 5-dehydro- α -L-fukofuranosy, (E)-3-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-metyl kyseliny akrylové a aminocyklitolu (60). Je to širokospektré antibiotikum s nižší účinností proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Nové studie ukazují jeho dobrou účinnost proti *Borrelia burgdorferi* a *Treponema pallidum* (93). Hygromycin A a jeho deriváty mají také herbicidní účinky (94).

A201A i hygromycin A se váží na překrývající se místo v PTC velké 50S ribozomální podjednotky (Obr. 3D). Jejich přítomnost blokuje správné navázání A-tRNA, což způsobuje strukturální deformace aminoacylového CCA ramene A-tRNA. A201A, které má delší strukturu v porovnání s hygromycinem A, zasahuje hlouběji do ribozomu až k NPET a překrývá se i s vazebným místem pro makrolidová antibiotika. I když má A201A větší vazebný povrch, *in vitro* testy ukazují, že je hygromycin A účinnějším translačním inhibítorem. Tato antibiotika neinterferují s počáteční vazbou ternárního komplexu (aminoacyl-tRNA, EF-Tu s GTP), ale zpomalují kontrolu správnosti (30, 60). Puromycin se také váže do A-místa ribozomu, ale mechanismus je rozdílný. Po vazbě puromycinu do A-místa dojde k navázání syntetizovaného polypeptidu na antibiotikum s následnou předčasnou terminací proteosyntézy (95).

2.1.3. Role antibiotik v přírodě

Dlouhou dobu se na antibiotika pohlíželo hlavně z medicínského hlediska v souvislosti s eliminací původců onemocnění a rozvojem rezistencí. Z tohoto pohledu jsou antibiotika látky inhibující růst bakterií (bakteriostatické), nebo přímo schopné bakterie zabít (baktericidní); (96). Tento směr zůstává ve středu zájmu z důvodů rostoucí hrozby v podobě multirezistentních mikroorganismů, u kterých běžně používaná antibiotika nefungují, a výzvou, které budeme muset v budoucnosti čelit (97, 98). Antibiotika a geny pro antibiotickou rezistenci byly ale v přírodě dříve, než jsme je začali využívat, a hrají zde důležitou úlohu (4).

Mikroorganismy žijí ve velmi dynamickém prostředí s limitovanými zdroji živin, kde se mění fyzikálně-chemické vlivy, jakými je např. pH, teplota, či vlhkost. Ve všech přírodních nikách vznikají složitá mezidruhová společenství, kde dochází k neustálé kompetici o živiny, ale také ke spolupráci napříč různými živočišnými druhy, což umožňuje neustálý koloběh látek v přírodě (28, 99, 100). Například u bakterií kmene *Actinobacteria* byly prokázány symbiotické, saprofytické a parazitické vztahy s rostlinami i živočichy. Některé tyto bakterie mohou produkcí svých sekundárních metabolitů ochraňovat rostliny před patogeny

(101, 102). Velmi známý je symbiotický vztah bakteriálního rodu *Frankia* fixujícího vzdušný dusík s určitými druhy krytosemenných rostlin. Tyto složité mezidruhové vztahy stojí v kontrastu ke klasickým laboratorním podmínkám (101, 103, 104).

Na antibiotika lze nahlížet jako na zbraně, které zabíjejí konkurenční mikroorganismy. V tomto hledisku produkce antibiotik poskytuje selekční výhodu v kompetici s ostatními citlivými organismy. Důležitým aspektem v tomto pohledu je, že se koncentrace antibiotik musí pohybovat v takové výši, aby byla schopná eliminovat citlivé konkurenty (6, 8). Z ekologického hlediska dochází k ovlivnění struktury a složení mikrobiální komunity, což může vést k snížení mikrobiální diverzity a dominanci jednoho druhu a tím přispět k destabilizaci ekosystému (6, 105). Mikroorganismy hrají klíčovou roli v biogeochemických cyklech, jako je cyklus dusíku, uhlíku nebo síry. Antibiotika mohou ovlivnit aktivitu těchto mikroorganismů, a tím i rychlost a efektivitu těchto cyklů (6, 28). Například sulfonamidy částečně inhibují denitrifikaci a tím by mohly představovat riziko pro ekosystém (106). Denitrifikace je jedním z klíčových procesů v biogeochemickém cyklu dusíku, při němž dochází k přeměně dusičnanu na vzdušný dusík. Celkovou diverzitu mikrobiálních komunit zapojených do procesu denitrifikace ovlivňuje také vankomycin, ale vliv na účinnost denitrifikace byl menší pravděpodobně z důvodu rezistence těchto bakterií (107). Bakterie jsou zapojeny i v přeměnách toxických látek jakou je např. arsen. Ve vodním prostředí se vyskytuje hlavně ve dvou anorganických formách As^V a As^{III} , který je více toxický díky své vyšší pohyblivosti. CAM má vliv na mikrobiální složení a má inhibující efekt na aerobní oxidaci As^{III} , za kterou jsou zodpovědní hlavně zástupci kmene *Proteobacteria*, kteří jsou citliví na CAM (108). Při hodnocení vlivu antibiotik na ekosystémy bychom měli klást důraz na koncentraci, kterou jsou v těchto prostředích schopné dosáhnout, a zda je dostatečná pro jejich ovlivnění.

V subinhibičních koncentracích antibiotik byla detekována změna expresního profilu bakterií. Slouží tedy i jako signální molekuly ovlivňující různé fyziologické procesy, jakými jsou stresová odpověď, virulence, tvorba biofilmu a změna metabolického profilu. Tím koordinují některé procesy v rámci mikrobiální populace (6, 9, 109). Subinhibiční koncentrace metronidazolu, vankomycinu, CLI, či LNZ mohou během exponenciální růstové fáze indukovat dřívější transkripci genů kódujících faktory virulence *tdcA* (toxinA) a *tcbB* (toxinB) u patogenní bakterie *Clostridium difficile*, která je zodpovědná za průjemová onemocnění (110). Naopak subinhibiční koncentrace CAM a ERY mění u kmene *Bacillus subtilis* 168 expresi genů zapojených do aminokyselinového metabolismu. Antibiotika také mění produkční profil (111). Po přidání LIN se spouští produkce streptomycinu u *Streptomyces griseus*. V případě *Streptomyces coelicolor* byl pro subinhibiční koncentraci LIN popsán jeho globální efekt. Krom spuštění produkce antibiotik aktinorodinu (ACT) a undecylprodigiosinu (RED) dochází ke zvýšení exprese rezistenčních genů a také genu *sco6720* kódujícího ARE5 ABCF protein. Naopak dočasné snížení exprese bylo pozorováno u některých esenciálních, tzv. housekeeping, genů (např. F_0F_1 ATP syntetázy, RNA polymerázy (RNAP) a ribozomálních proteinů). Po vystavení bakterie LIN došlo také k dočasnému zvýšení intracelulární koncentrace nukleotidů (NTP) a navýšení biomasy (112, 113). Dále bylo zjištěno, že antibiotika mohou fungovat jako induktory pro svou vlastní produkci. Výskyt antibiotik v prostředí podporuje synchronizaci produkce sekundárních metabolitů, včetně aktivace rezistenčních mechanismů v rámci mikrobiální komunity, a to i před začátkem stacionární fáze, během které je produkce běžně spouštěna (114). Tato

chemická komunikace může být klíčová pro přežití v určitých podmínkách. Také se zvyšuje selekční tlak, což zvyšuje rychlost adaptivní evoluce včetně rozvoje rezistence (4).

Antibiotika jsou široce používána jak v lidské medicíně, veterinářské praxi, tak u hospodářských zvířat k zvýšení výnosů. Vzhledem k tomu, že většina antibiotik není v těle lidí a zvířat plně metabolizována, dochází k uvolňování velkého procenta podaných antibiotik do vody a půdy prostřednictvím komunálních odpadních vod a zvířecího hnoje. Tím dochází k vytvoření potenciální hrozby pro organismy obývající tyto prostředí ovlivněním mikrobiálního složení půdy a potenciálnímu narušení signalizace působením lidské činnosti. Rychlost degradace antibiotik v půdě závisí na chemické struktuře a ovlivňuje ji mnoho faktorů od vlhkosti, pH, typu půdy až k biologickému složení a katabolické aktivitě přítomných organismů (6, 115).

Na funkce antibiotik v přírodě tedy můžeme nahlížet ze dvou úhlů pohledu. Bakterie potřebují mezi sebou komunikovat a synchronizovat své chování, čím mohou napodobovat mnohobuněčné organismy. Chemická komunikace, při které dochází k produkci a uvolnění malé signální molekuly do prostředí, která následně ovlivní okolní bakterie a tím dochází k synchronizaci jejich chování, je nepostradatelná. Z tohoto pohledu jde o nízké koncentrace antibiotik, které negativně neovlivňují růst bakterií. Při vyšších koncentracích slouží antibiotikum jako zbraň a produkce je selekční výhodou v kompetici o živiny. Zdá se tedy, že antibiotika mají duální funkci, která je závislá na jejich koncentraci (6, 8, 9).

2.2. Biosyntéza antibiotik a producenti

Bakterie a houby produkují velké množství malých molekul, které nejsou zapojeny v primárním metabolismu. Tyto sekundární metabolity mají důležitou a rozmanitou roli v ekologii a fyziologii organismů (Kap. 2.1.3.). Často se jedná o průmyslově zajímavé látky např. s antivirovými, protinádorovými, antifungálními, herbicidními a antibakteriálními účinky. Dvě třetiny antibiotik je produkováno zástupci kmene *Actinobacteria* a většina pak rodem *Streptomyces*. Mezi významnější metabolity můžeme zařadit streptomycin, tetracyklin, CAM, ERY nebo LIN (27, 116, 117). Mnoho bakterií produkuje větší množství metabolitů a jednotlivé bakteriální druhy se vzájemně liší svým produkčním profilem (10).

Geny kódující proteiny nezbytné pro syntézu těchto komplexních sloučenin jsou v bakteriálním genomu seskupeny a tvoří tzv. biosyntetické genové klastry (BGC). Tyto klastry zahrnují geny kódující enzymy, které katalyzují jednotlivé kroky biosyntetické dráhy, regulační geny, rezistenční geny a případně dále proteiny zapojené v transportu vzniklého metabolitu. Biosyntetické dráhy jsou komplexní a složeny i z více jak 40 proteinů, které jsou kódovány v sekvenci dlouhé i okolo 100 kb (27, 116). Např. BGC pro syntézu makrolidového antibiotika tylosinu obsahuje 43 genů, které jsou kódovány v úseku dlouhém 85 kb (118). Prekurzory pro biosyntézu jsou často látky, které se běžně vyskytují v primárním metabolismu (117). Náklady na syntézu sekundárních metabolitů a udržení těchto biosyntetických drah v genomu jsou značné. Přes silný evoluční tlak zůstávají geny spojené se syntézou sekundárních produktů přítomny v genomu, a to pravděpodobně díky selekční výhodě, kterou poskytují v určitých podmínkách. Velká diverzita BGC také vypovídá o jejich rychlém vývoji, v čem může hrát roli i jejich horizontální přenos. Rozdílný produkční profil v rámci bakteriální populace naopak podporuje strategii, ve které se zvyšuje paleta metabolitů na populační úrovni, ale snižuje se počet klastrů, který nesou jednotlivé kmeny ve své genetické informaci (119). Dalším zajímavým evolučním jevem je skutečnost, že rod *Streptomyces* a další bakterie mají často v genomu tzv. tiché BGC. Jedná se o neaktivní BGC, které nejsou za normálních kultivačních podmínek exprimovány (120).

2.2.1. Regulace BGC

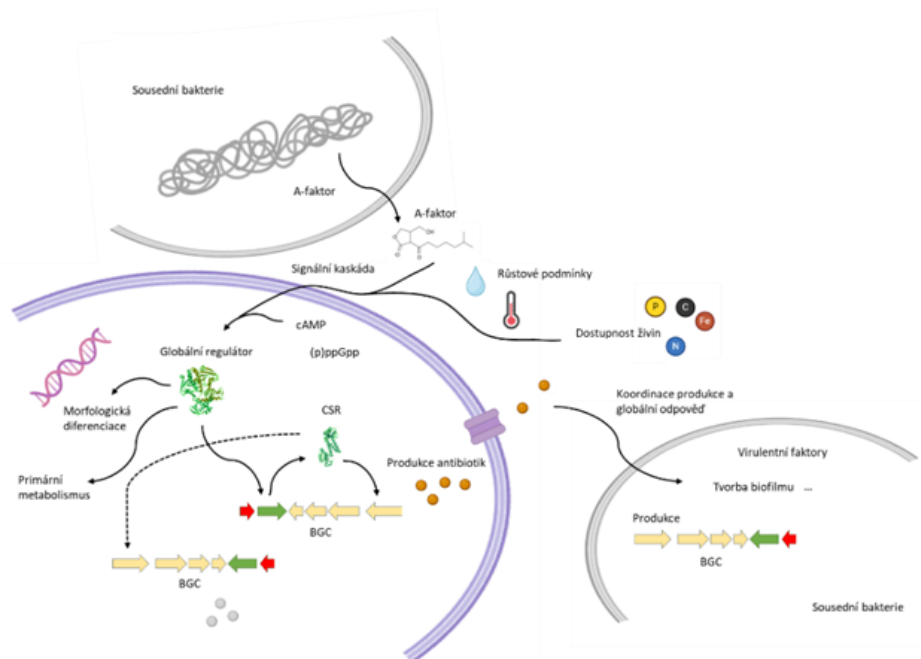
Biosyntéza antibiotik a obecně sekundárních metabolitů je závislá na růstové fázi bakterie a odpovídá počátku tvorby vzdušného mycelia při kultivaci na agarové misce a stacionární fázi při kultivaci v tekutém médiu, kdy v prostředí docházejí živiny (116, 121). Klíčovým aspektem regulace BGC je jejich organizace, která umožňuje koordinovanou expresi celého metabolického procesu. Celý klastř je často dělen do několika transkripčních jednotek, jejich exprese je dále vzájemně synchronizována. Regulace může probíhat nejen na úrovni transkripce, ale i translace (12, 26, 122, 123). Schopnost dynamicky regulovat a optimalizovat produkci sekundárních metabolitů podle potřeb organismu v reakci na podmínky prostředí zvyšuje schopnost přežít v konkurenčním prostředí. Striktní kontrola se správným načasováním produkce, která je spojená s koordinací v rámci populace, je pro sekundární metabolismus a s ním spojenou selekční výhodou klíčová. Vznikají složité signální kaskády, na které mají vliv různé signály a vnější podmínky od množství okolních buněk, dostupnosti živin (uhlíku, dusíku, fosfátu), energetického stavu buňky, po signální molekuly a další typy stresů (oxidativní, osmotický). Takto vzniklé komplikované regulační sítě mohou reagovat na různé signály z prostředí (Obr. 4); (27, 124, 125).

Nejbližší k biosyntetické dráze jsou specifické transkripční regulátory situované přímo v klastrech (CSR), v jejichž rámci regulují ostatní geny a tím i vlastní produkci sekundárního metabolitu. Transkripční faktory při tom mohou působit jako pozitivní nebo negativní regulátory genových klastřů. CSR kontrolují antibiotickou biosyntézu přímo prostřednictvím regulace transkripce biosyntetických genů a stojí tudíž na konci regulační kaskády. BGC obvykle obsahují jeden a více CSR (122). Tyto regulátory nejčastěji patří do proteinových rodin SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein) a LAL (large ATP-binding regulators of the LuxR-like family); (122). SARP regulátory se vyskytují výlučně u kmene *Actinobacteria*. Dle zastoupení různých domén a délce proteinu se SARP proteiny dělí do tří skupin (malé, střední a velké). Všechny mají na N-konci proteinu DNA vazebnou doménu následovanou transkripční aktivační doménou. Mohou působit také jako globální regulátory (126). Mezi CSR se vyskytují také regulátory z jiných rodin, např. z proteinové rodiny LuxR nebo TetR. V modelovém organismu *Streptomyces coelicolor* je známo šest zástupců CSR: *actII-ORF4* pro biosyntézu ACT (kap. 2.2.2.1.), *redD* a *redZ* pro produkci RED (kap. 2.2.2.2.), *cdaR* pro syntézu kalcium-dependenčního antibiotika (CDA) a *cpkO* a *cpkN* kontrolující produkci žlutého pigmentu (124, 127). Některé CSR mohou mít vliv i na jiné klastry, než ve kterých jsou lokalizované. Jejich vliv může být pro obě biosyntetické dráhy stejný, jako v případě FscRI, který spouští produkci kandidinu i antimycinu u *Streptomyces albus* S4 (128). Naopak GdmRIII zvyšuje produkci geldamycinu a snižuje syntézu elaiofylinu u *Streptomyces autolyticus* CGMCC0516 (129). U *S. coelicolor* byl pro RedZ popsán vliv jak na RED produkci, tak na produkci ACT a CDA (130).

V regulaci BGC jsou dále zapojeny pleiotropní globální regulátory, které přímo aktivují nebo represují biosyntetické geny, nebo ovlivňují výše zmíněné CSR. Tyto regulátory mají širší efekt než CSR. Krom ovlivnění více klastřů mají vliv i na morfologickou diferenciaci (27).

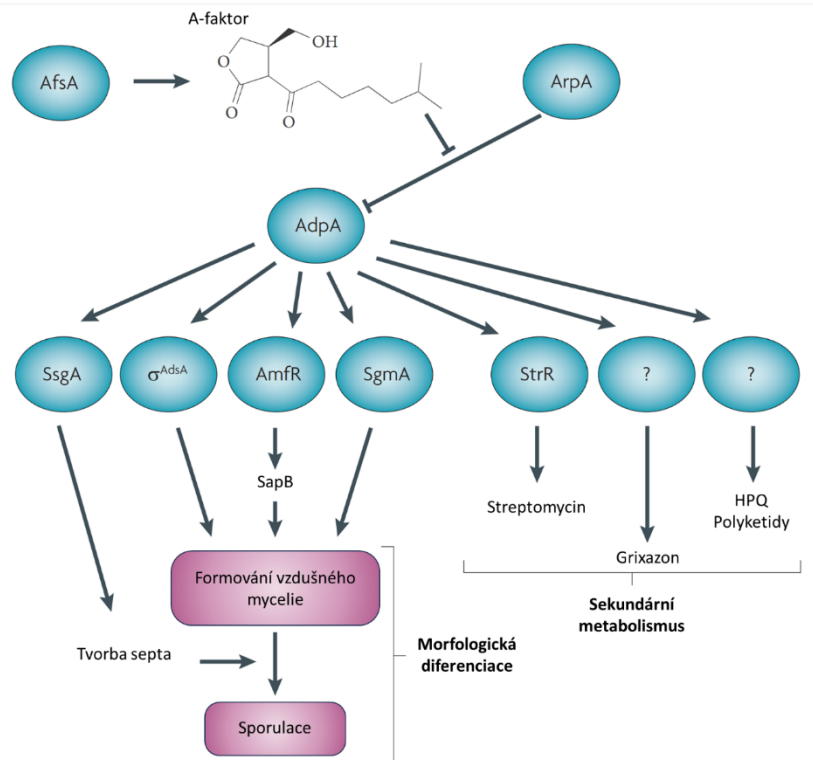
Mezi významné signální molekuly ovlivňující sekundární metabolismus patří γ -butyrolaktony (např. A-faktor, IM-2, SCB1), P1 faktor, furany, sekundární poslové (např. cyklický adenosin monofosfát (cAMP) a guanosin tetrafosfát (ppGpp)), antibiotika a biosyntetické intermediáty. Tyto malé molekuly hrají zásadní roli ve vnitrodruhové a mezidruhové komunikaci a ovlivňují další vlastnosti buněk včetně stresové odpovědi (26, 27, 114, 116, 131, 132).

Mezi další systémy, které ovlivňují produkci sekundárních metabolitů patří dvousložkové regulační systémy, které fungují na mechanismu přenosu signálu ze sensorové proteinkinázy na transkripční regulátor pomocí fosforylace. Na regulaci se také podílí AfsK/AfsR systém, který je u *S. coelicolor* spojen s globální regulací produkce ACT, RED, CDA a metylenomycinu. Systém je založen na serin/threoninové proteinkináze AfsK, která prostřednictvím fosforylace přenáší signál na globální regulátor AfsR. AfsR je transkripční faktor příbuzný k SARP regulátorům. Po fosforylaci aktivuje transkripci genu, který kóduje protein AfsS. Ten dále reguluje sekundární metabolismus. Globální regulátor AfsR může být fosforylován i jinými proteinkinázami (např. AfsL); (27, 124, 133, 134). U *S. griseus* je AfsK/AfsR systém zapojen ve formování vzdušného mycelia v reakci na glukosu (135). Dalším důležitým mechanismem zapojeným v regulaci produkce sekundárních metabolitů je zpětnovazební inhibice (27, 124).



Obrázek 4: Komplexní regulace sekundárního metabolismu u rodu *Streptomyces*. Schematické znázornění vzájemných vztahů mezi environmentálními podněty, buněčnou signalizací a regulačními drahami kontrolujícími produkci sekundárních metabolitů.

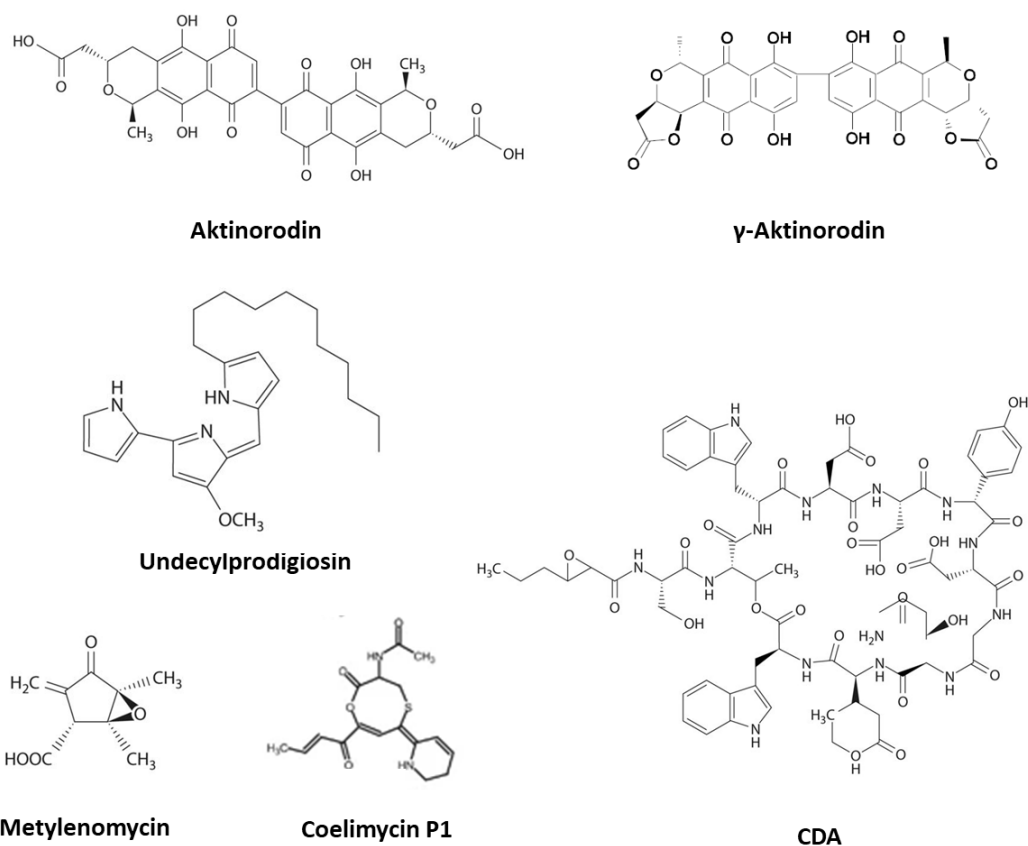
První kompletní regulační dráha vedoucí k aktivaci BGC byla popsána u *Streptomyces griseus* pro syntézu streptomycinu (Obr. 5). V regulaci je zapojen A-faktor, který se hromadí v médiu před spuštěním biosyntézy. Za jeho produkci je zodpovědný protein AfsA. A-faktoru se váže na cytoplasmatický receptorový protein ArpA, který inhibuje transkripci genu *adpA*. Po vazbě A-faktoru dojde k disociaci ArpA z promotoru genu *adpA*, čímž dojde ke spuštění jeho exprese. AdpA je pleiotropní regulátor ovlivňující geny účastnící se jak sekundárního metabolismu, tak morfologické diference. Mezi nimi je i CSR regulátor StrR regulující syntézu streptomycinu (27, 136).



Obrázek 5: Signální kaskáda řízena A-faktorem regulující morfologickou diferenciaci a produkci sekundárních metabolitů u *S. griseus*. Regulační dráha ukazuje hlavní transkripční aktivátor a jeho globální efekt, který zahrnuje i produkci streptomycinu (převzato a upraveno (137)).

2.2.2. *Streptomyces coelicolor*

Rod *Streptomyces* patří mezi bakterie s lineárním chromozomem (119). Modelový organismus *Streptomyces coelicolor* má genom o velikosti 8,668 Mb s hustotou genů určenou na 88,9 %. Chromozom se dělí na tři části. V centrálním regionu, který je dlouhý $\approx 4,9$ Mb, jsou převážně lokalizovány esenciální geny. Vzniklé periferní části jsou různě dlouhé – levé rameno má délku kolem 1,5 Mb a pravé 2,3 Mb (138). Na ramenech se nachází neesenciální geny, které jsou mimo jiné zapojeny v adaptabilních funkcích, jakým je růst na komplexních sacharidech (např. celulóza, chitin), a do produkce sekundárních metabolitů (119, 138–140). *S. coelicolor* obsahuje dle různých předpokladů kolem 29 klastřů, které zabírají více jak 5 % celkového genomu. Hlavními produkty bakterie *S. coelicolor* jsou ACT, RED, CDA, coelimycin P1, označovaný též jako žlutý pigment (yellow pigment) a metylenomycin (Obr. 6). Periferní regiony jsou náchylné k častým přestavbám, což může přispívat k metabolické diverzitě rodu *Streptomyces* (26, 119, 124).



Obrázek 6: Chemické struktury nejznámějších sekundárních metabolitů produkovaných kmeny *S. coelicolor*. Znázorněnými metabolity jsou aktinorodin (ACT) a jeho laktonový derivát γ -aktinorodin, undecylprodigiosin (RED), metylenomycin, coelimycin P1 a kalcium-dependentní antibiotikum (CDA; převzato a upraveno (26, 124, 141)).

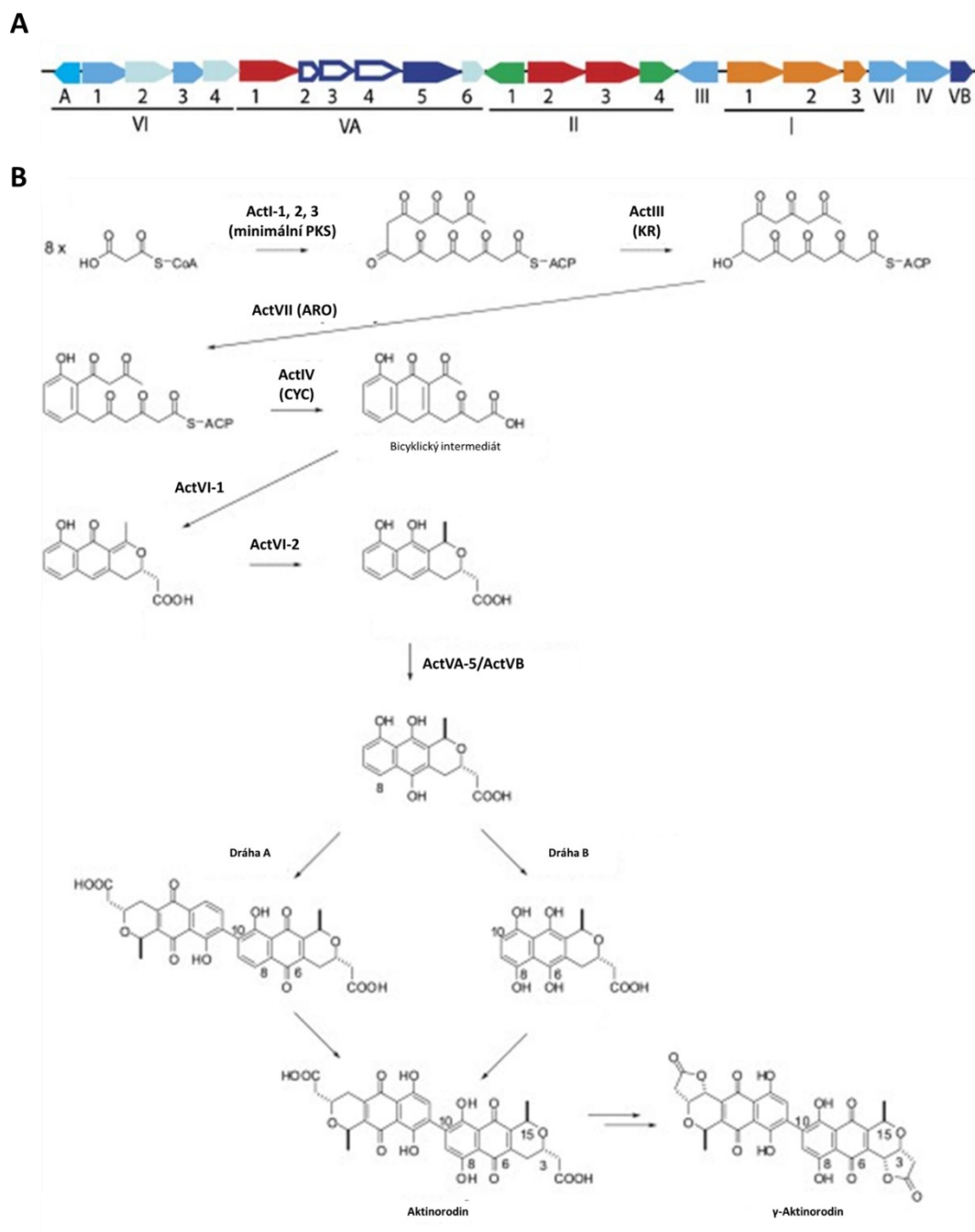
2.2.2.1. Aktinorodin

Aktinorodin (ACT) byl prvně objeven ve 40. letech 20. století jako viditelné modré halo obklopující kolonie *S. coelicolor* M145. ACT je benzoisochromanechinonové antibiotikum patřící mezi polyketidy typu II (124, 142, 143). Polyketidy jsou skupinou sekundárních metabolitů, které jsou produkovány prostřednictvím polyketid syntetáz (PKS). Jedná se o strukturně a funkčně různorodou skupinu dělenou do několika skupin (144). ACT je látka produkovaná intracelulárně, extracelulárně je sekretován jako laktonový derivát zvaný γ -aktinorodin. V literatuře jsou ale obě látky často označovány souhrnně jako ACT (143, 145). Tím, že je ACT díky své modré barvě dobře vizuálně detekovatelný, sloužil jako modelová látka pro studium sekundárního metabolismu (146).

Z chemické stránky má ACT tři hlavní charakteristiky. Má amfoterní charakter, což znamená, že může působit jako kyselina i zásada, v závislosti na prostředí, ve kterém se nalézá. Jeho barva je závislá na pH. V kyselém prostředí má červenou a v bazickém modrou barvu. Může být tedy použit i jako pH indikátor. Dále je ACT redox-aktivní molekula. Konkrétně může redukovat chinonové skupiny, čímž dochází ke generování elektronů, které mohou interagovat s kyslíkem za vzniku jeho reaktivních forem (ROS) jako je peroxid vodíku (H_2O_2). Ten by mohl být zodpovědný za antibakteriální vlastnosti molekuly. Mechanismem účinku spadá ACT mezi redoxně aktivní antibiotika s aktivitou proti gram pozitivním bakteriím. Jeho působením dochází k oxidativnímu poškození různých buněčných cílů včetně DNA, proteinů, nebo

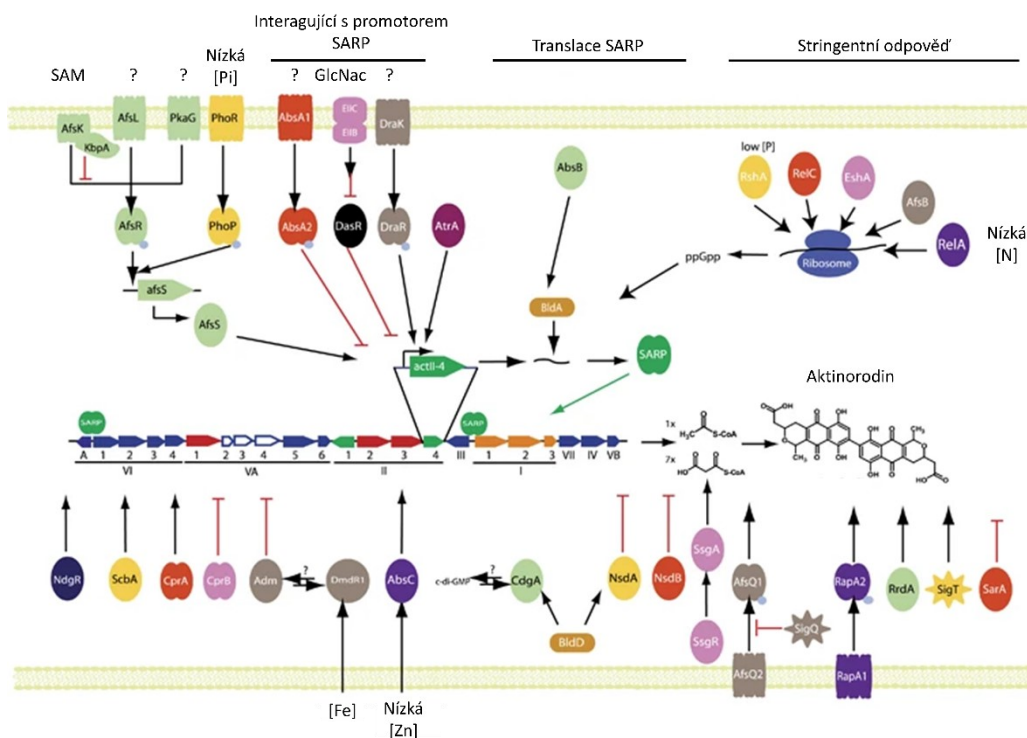
buněčného obalu. Jeho bioaktivita je ovšem citlivá na pH, aktivnější je v kyselém prostředí. Stále není plně známo, zda se jedná o primární cíle ACT (146).

Geny pro biosyntézu ACT jsou kódovány v 22 kb dlouhém BGC obsahujícím 22 genů (Obr. 7A); (26, 124). Prekurzory pro biosyntézu jsou čerpány z primárního metabolismu. Jedná se o acetyl-CoA a malonyl-CoA, ze kterých je poskládán hlavní uhlíkový řetězec ACT (26). Za syntézu je zodpovědná PKS ActI-ORF1,2,3. Následuje zacyklení lineárního uhlíkatého řetězce a následné modifikace (26, 147). Unikátní je pak enzymaticky kontrolovaná dimerizační reakce, za kterou jsou zodpovědné geny ActVA-ORF4 a ActVA-ORF3 (148). Schéma biosyntézy ACT je znázorněno na Obr. 7B.



Obrázek 7: Aktinorodinová biosyntéza. (A) Organizace BGC pro syntézu ACT s vyznačenými transkripčními jednotkami. Zeleně jsou znázorněny regulační geny, potenciální rezistenční geny červeně. (B) Zjednodušené schéma biosyntézy ACT (převzato a upraveno (26, 147)).

BGC je dělen do 5 transkripčních jednotek, které jsou závislé na pozitivním CSR regulátoru ActII-ORF4 patřící do SARP proteinové rodiny. Jeho N-část má DNA vazebnou doménu obsahující strukturní motiv „helix-turn-helix“ a na C-konci je doména zodpovědná za aktivaci transkripce. Jedná se tedy o protein patřící do skupiny malých SARP regulátorů (125, 126). Tím, že se jedná o hlavní regulátor ACT biosyntetické dráhy, je cílem globálních regulátorů reagujících na buněčnou fyziologii a vnější podmínky, které ovlivňují načasování a úroveň produkce. Celá regulační síť, která kontroluje biosyntézu ACT, je velmi komplexní a reaguje na mnoho podnětů, jak bylo nastíněno v úvodu (124). Jmenovitě se jedná o dostupnost látek od základních jako jsou dusík a fosfát, přes kovy (železo, zinek), až po komplexnější molekuly jako je N-acetylglukosamin, xylóza a S-adenosyl-metionin (SAM), dále o signální molekuly, mezi které patří cAMP, ppGpp spojený se stringentní odpovědí a γ -butyrolakton, jehož receptory spojenými s ACT jsou AtrA a ScbR2, který byl také identifikován jako antibiotický receptor. Tím dochází k přesnému načasování spuštění ACT produkce, které odráží podmínky prostředí včetně hustoty buněčné populace (26, 27, 124, 149–151). Na Obr. 8 je pro alespoň částečnou představu o její složitosti znázorněna regulační síť ACT BGC se zapojenými regulačními proteiny, které byly identifikovány do roku 2013. Promotorový region genu *actII-ORF4* je řízen přinejmenším 8 regulačními proteiny – AdpA, LexA, AbsA2, DasR, DraR, AfsQ1, AtrA, ROK7B7. Dále je do regulace ACT produkce pravděpodobně zapojen GlnR a dalších několik regulátorů proteinové rodiny TetR, které mají úlohu jak v produkci antibiotik, tak v morfologické diferenciaci (26, 27, 124, 125). Transkripce genu *actII-ORF4* je kontrolována sigma faktorem σ^{HrdB} . Disociovatelná podjednotka σ , která je dle svého typu zodpovědná za rozeznávání začátků transkripce dle specifických potřeb buňky, je vyžadována RNAP pro iniciaci transkripce. RNAP je vícepodjednotkový enzym zodpovědný za transkripci, jehož jádro je, v případě bakteriální RNAP, složeno z pěti podjednotek – α_2 , β , β' a ω . Sigma faktor σ^{HrdB} je spojen se stringentní odpovědí buňky (152–154). Regulace ActII-ORF4 probíhá i na translační úrovni. V mRNA genu se vyskytuje vzácný leucinový kodón (UUA), který činí translaci genu *actII-ORF4* závislou na specifické tRNA, která je kódována genem *bldA* (123).

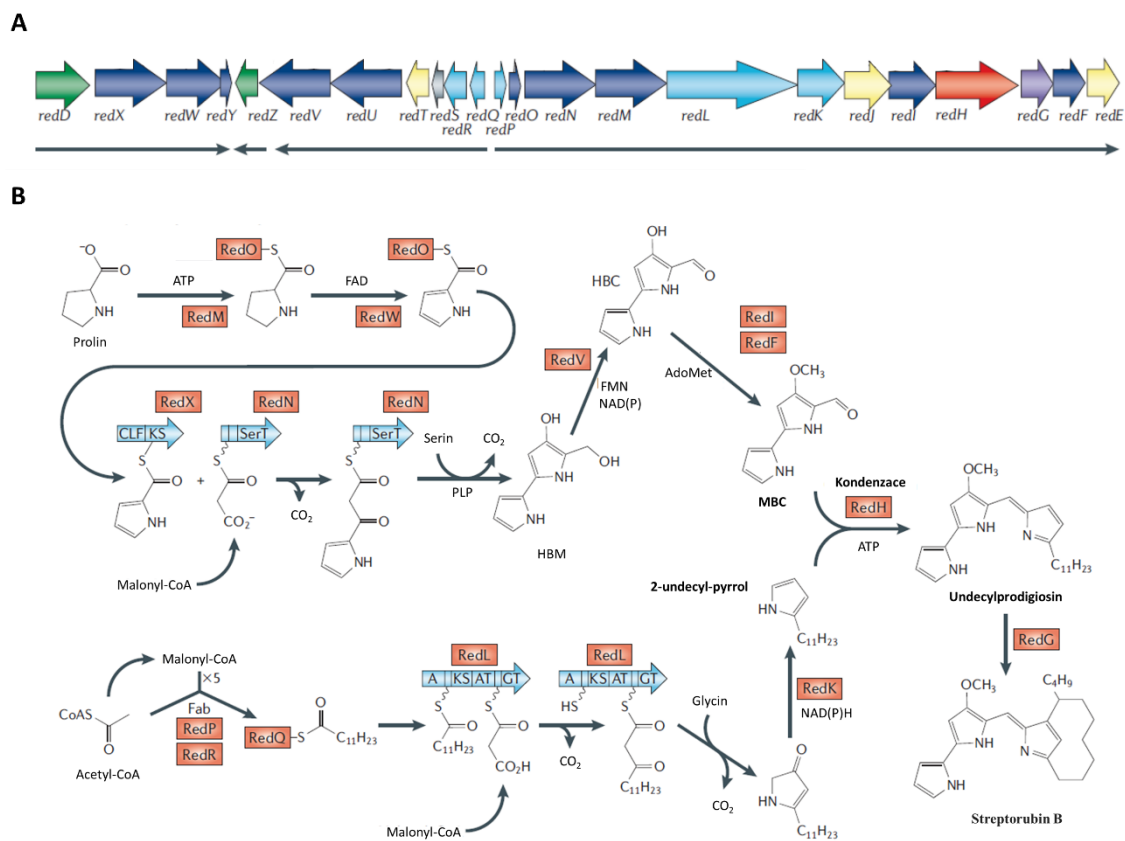


Obrázek 8: Regulační síť biosyntézy ACT v *S. coelicolor*. Schematické znázornění komplexní regulační sítě, kde klíčový transkripční aktivátor ActII-ORF4 reaguje na signály od různých globálních regulátorů a kontroluje tak biosyntézu ACT (převzato a upraveno (26)).

2.2.2.2. Undecylprodigiosin

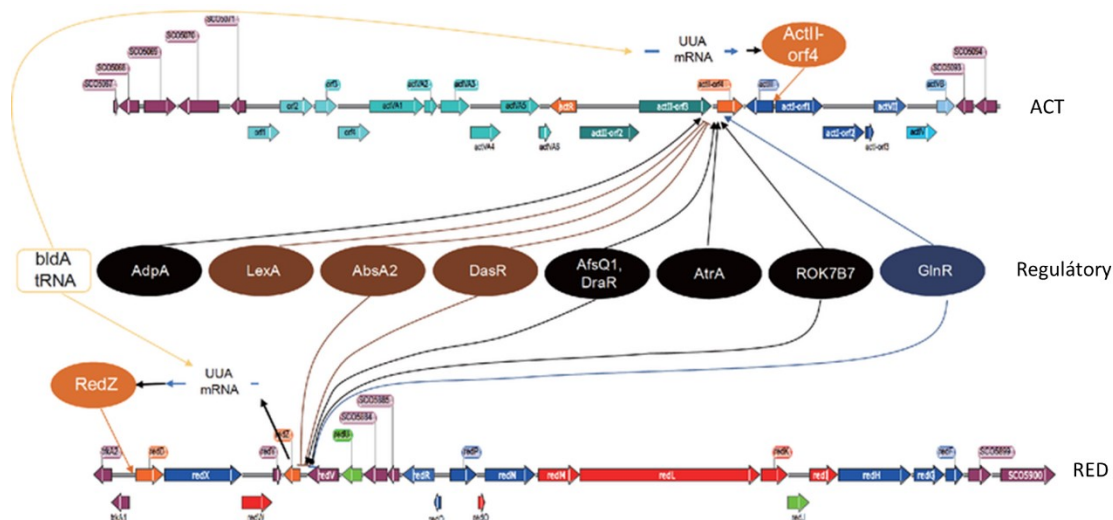
Undecylprodigiosin (RED) je dalším barevným produktem *S. coelicolor*, který vykazuje antitumorové, antifungální, antimalarické, imunomodulační a antibakteriální účinky (155). Je to červeně zbarvené antibiotikum, jehož syntéza je kódována v BGC dlouhém 30 kb obsahující 23 genů (Obr. 9A); (26, 156, 157). RED je sloučenina složená ze tří pyrolových kruhů a postranního řetězce tvořeného jedenácti uhlíky. Z chemického hlediska RED funguje jako amfoterická molekula. Tato vlastnost hraje roli v biologické aktivitě odrážející schopnost interagovat s biologickými molekulami (156).

V syntéze je zapojeno několik prekurzorů z primárního metabolismu (prolin, serin, glycin, acetyl-CoA a malonyl-CoA) a pro vytvoření lipidové skupiny se využívají enzymy z biosyntézy mastných kyselin. Biosyntéza probíhá vytvořením dvou prekurzorů 4-metoxy-2,2'-bipyrol-5-karboxaldehydu (MBC) a 2-undecylpyrrolu s následnou kondenzací. Při syntéze dochází také k produkci streptorubinu B, který vzniká zacyklením uhlíkatého řetězce (26, 156). Průběh biosyntézy je znázorněn na Obr. 9B.



Obrázek 9: Biosyntéza undecylprodigiosinu. (A) Organizace BGC pro syntézu RED s vyznačenými transkripčními jednotkami. Zeleně jsou znázorněny regulační geny, biosyntetické geny jsou značeny modře a červeně. Geny nezapojené v biosyntéze jsou značeny žlutě (B) Zjednodušené schéma biosyntézy RED (převzato a upraveno (156)).

V RED BGC jsou lokalizovány dva transkripční regulační geny – *redD* a *redZ*. *RedZ* je zodpovědný za přímou aktivaci *RedD* (SARP regulační protein), který pak přímo působí na biosyntetické geny klastru. Produkce RED reaguje komplexně na okolní prostředí a je do značné míry propletena s biosyntézou ACT (124, 156). Reakce na vnější podněty ale není u obou drah totožná. V prostředí s vyšší koncentrací NaCl dochází k indukci produkce RED, což je v kontrastu k ACT biosyntéze, která je inhibována (158). Na Obr. 10 jsou uvedeny některé z regulátorů zapojených v indukci biosyntézy RED, které jsou totožné s těmi pro ACT BGC. Pleiotropní regulátor *ScbR2* vázající γ -butyrolakton je zapojen i v regulaci syntézy RED skrze ovlivnění genu *redZ* (150, 151, 156). Exprese *redD* je naopak opět pod kontrolou σ^{HrdB} faktoru v reakci na stringentní odpověď organismu a produkci ppGpp (131, 156).

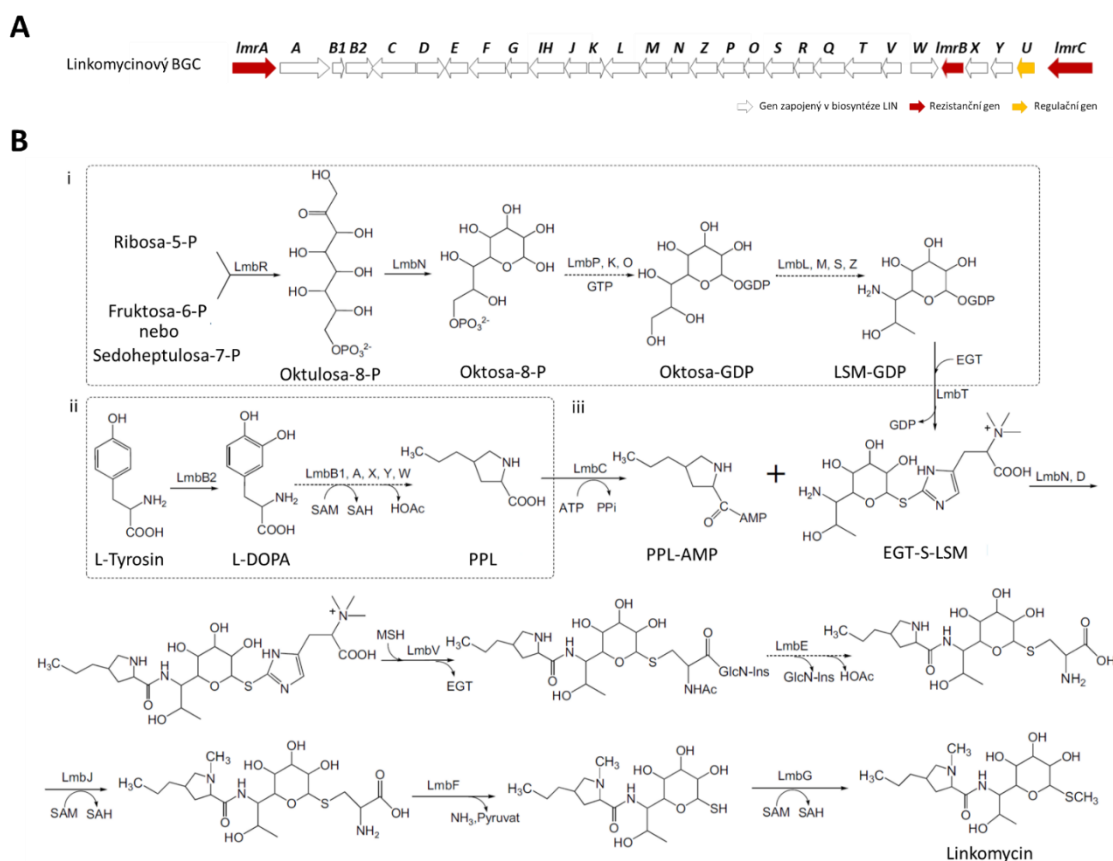


Obrázek 10: Regulační dráhy biosyntézy ACT a RED. Schématické znázornění vzájemného propojení regulačních drah řídicích biosyntézu ACT a RED v *S. coelicolor* (převzato a upraveno (159)).

2.2.3. Linkomycinový BGC

Linkomycin byl izolován z půdní bakterie *Streptomyces lincolnensis* v roce 1962 (46). V současné době je k dispozici několik genomových sekvencí této bakterie (NRRL 2936, B48, LC-G, nebo L4). Genom referenčního kmene NRRL 2936 (ATCC 25466) o velikosti 10,32 Mb je k dispozici pod přírůstkovým číslem GenBank CP016438.1 (160–163). Tento kmen je používán v experimentální části této vědecké práce. Celková organizace linkomycinového BGC se zdá být konzervována, a to i u jiných producentů LIN (164). BGC pro syntézu LIN je 32 kb dlouhý úsek obsahující 25 strukturálních genů (*lmb*), dva rezistenční geny (*lmrA* a *lmrB*), jeden regulační gen (*lmbU*) a gen *lmrC* s duální funkcí kombinující regulační a rezistenční funkci (Obr. 11A); (165). V případě vysokoprodukčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 je klastér duplikovaný (164).

Linkomycin A je tvořen dvěma stavebními jednotkami – PPL a linkosamidem (LSM). Syntéza jednotlivých částí probíhá odděleně a následně dochází k jejich propojení amidovou vazbou. Biosyntézu lze rozdělit do tří částí: (i) dráha sacharidové části, (ii) dráha aminokyselinové části a (iii) kondenzace s následujícími postkondenzačními kroky (166). Prekurzorem pro PPL je L-tyrosin. Před kondenzačním krokem je PPL aktivován navázáním AMP (166–169). Syntéza cukerné části vychází z prekurzoru ribosa-5-fosfátu a fruktosa-6-fosfátu, nebo sedoheptulosa-7-fosfátu (170). Výsledným produktem této části dráhy je LSM aktivovaný pomocí GDP (LSM-GDP). V procesu kondenzace jsou zapojeny dva thiooly – ergothionein (EGT) a mykothiol (MSH). Kondenzace probíhá mezi aktivovaným PPL a linkosamidem napojeným na EGT. MSH následně nahrazuje EGT a je donorem síry, která je přítomna v koncovém produktu (171). Celkové schéma biosyntézy LIN včetně zapojených proteinů je znázorněna na Obr. 11B.



Obrázek 11: Biosyntéza linkomycinu. (A) Organizace BGC pro syntézu LIN. Biosyntetické geny jsou značeny bíle, regulační gen *lmbU* žlutě a rezistenční geny jsou znázorněny červeně. (B) Zjednodušené schéma biosyntézy LIN (převzato a upraveno (166, 172)).

Dříve byl větší důraz kladen na popis biosyntetické dráhy LIN než na její regulaci. V nedávné době se regulace biosyntézy dostala do popředí zájmu, jak nasvědčují aktuální publikace. LIN BGC obsahuje jeden CSR označený jako *LmbU*, pro který byl potvrzen pozitivní efekt na celý klastr. Krom pozitivního ovlivnění genů v rámci BGC, *LmbU* ovlivňuje expresi dalších více jak dvaceti genů mimo klastr. Indukuje expresi transportérů, oxidoreduktáz, genů zapojených v buněčném metabolismu i některých genů pro proteiny s hypotetickou funkcí. Negativně reguluje expresi genu *hpdA* z biosyntézy L-tyrosinu. Dále byl potvrzen vliv na regulační proteiny SLINC0469, SLINC 1037 a SLINC 8097. Regulační efekt *LmbU* není tedy specifický v rámci BGC, ale má spíše pleiotropní charakter (163, 165, 166). Tomuto pohledu odpovídá i detekce homologních proteinů u zástupců kmene *Actinobacteria*. Geny pro homologní *LmbU* proteiny jsou univerzálně rozšířeny a lokalizovány jak v rámci BGC klastrů, tak i mimo ně. Počet genů na genom se při tom liší od jedné až po tři kopie. *LmbU* a jeho homology tvoří novou proteinovou rodinu regulačních proteinů (166). Expresí genu *lmbU* je pod kontrolou alternativního σ faktoru, $\sigma^{L_{sl}}$. Sigma faktor σ^L je u *S. coelicolor* zapojen v bakteriální odpovědi na osmotický stres. U *S. lincolnensis* bylo potvrzeno, že $\sigma^{L_{sl}}$ pozitivně reguluje biosyntézu LIN. Krom přímého vlivu na gen *lmbU* kontroluje také transkripci genů *lmrC*, *lmbV* a *lmbD*. Má vliv i na *mshC*, gen zodpovědný za syntézu MSH (173). Vliv na LIN produkci byl potvrzen i pro další regulátory umístěné mimo klastr, mezi které patří TetR pozitivní regulátor *AtrA*, *AdpA*, *BldA*, *BldD*, *GlnR*, *RamR*, *Rex*, *AflQ1-Q2*, *SLCG_2019*, *SLCG_Lrp* (174–176). Celkový obraz složité sítě regulačních vztahů pro biosyntézu LIN ještě nebyl popsán.

V BGC pro LIN jsou situovány tři rezistenční geny – *lmrA*, *lmrB* a *lmrC*. Gen *lmrA* kóduje protein o délce 484 aminokyselin patřící do proteinové rodiny MFS (Major facilitator superfamily) transportérů. Jedná se o velkou a velmi rozšířenou proteinovou rodinu nacházející se u prokaryotních i eukaryotních organismů. Jsou zapojeny do transportu velké škály látek včetně iontů, aminokyselin až po složitější molekuly jako jsou toxiny, lipidy, peptidy a antibiotika. Fungují jako uniportéry, symportéry a antiportéry. Pro přenos látek přes membránu využívají energii elektrochemického gradientu H⁺ nebo Na⁺ iontů (177, 178). Při heterologní expresi genu *lmrA* v bakterii *Streptomyces lividans* TK23 bylo pozorováno specifické zvýšení rezistence k LIN (z 64 µg/ml na >1000 µg/ml) (179). Protein LmrB patří do velké proteinové rodiny Erm (erythromycin-ribosome methylase) metyltransferáz. Erm proteiny udílejí rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminům B (MLS_B) pomocí N₆ mono- nebo N_{6,6} dimethylace adeninu v pozici 2058 23S rRNA. Zástupce této rodiny najdeme jak u grampozitivních, tak gramnegativních bakterií a spirochét. Většina genů této rodiny nese označení *erm*, ale v případě jejich lokalizace v BGC přejímají označení konzistentní s označením genů v daném klastru, tak jako v případě *lmrB* (180, 181). Při heterologní expresi genu *lmrB* v *S. lividans* TK23 bylo detekováno zvýšení rezistence k LIN a celesticetinu (179). Posledním genem tohoto BGC je gen *lmrC* kódující protein patřící do velké proteinové nadrodiny ABC (ATP-binding cassette) proteinů, kterému se věnuje tato dizertační práce. V předkládané práci se naší vědecké skupině povedlo poprvé popsat duální funkci ABCF proteinu LmrC, čímž došlo k prvnímu spojení regulační a rezistenční funkce pro ABCF proteiny (172).

2.3. Bakteriální ABCF proteiny

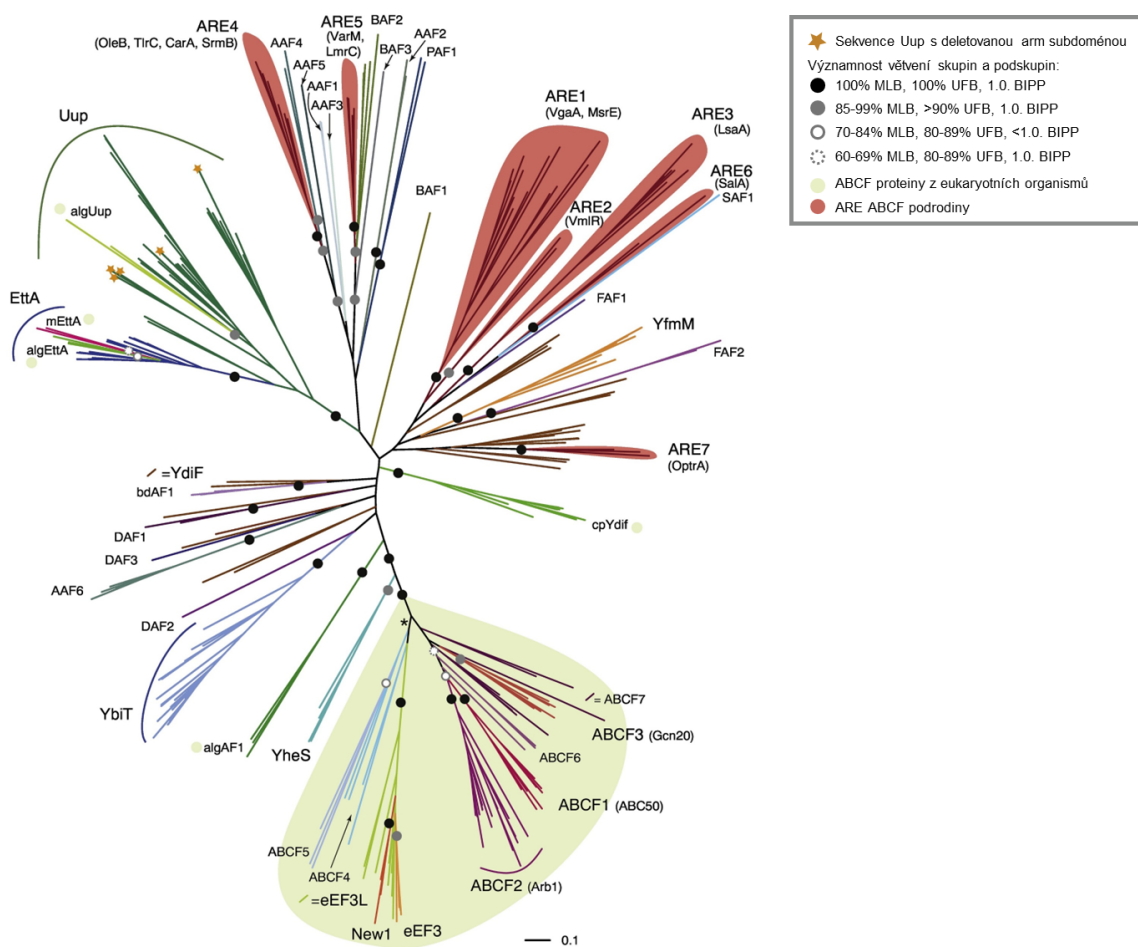
ABCF proteiny jsou jednou z osmi rodin (ABCA–ABCH) velké nadrodiny ABC proteinů (182). Tato proteinová nadrodina se vyznačuje schopností vázat a hydrolyzovat dvě molekuly ATP. Hydrolyza ATP je spojena s konformačními změnami, které jsou spojeny s funkcí proteinů. ABC proteiny jsou jednou z největších, nejrozšířenějších a nejstarších proteinových skupin vyskytujících se ve všech třech živočišných doménách (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*) a u některých virů. Nejčastěji jsou spojovány s transportní funkcí, ale dvě rodiny (ABCE a ABCF) jsou tvořeny cytosolickými proteiny zapojenými v netransportních procesech. ABCF proteiny nejsou stále příliš dobře charakterizovány, ale v poslední době se ukazuje, že jsou zodpovědné za důležité buněčné procesy (21, 25, 183).

2.3.1. Charakterizace ABCF proteinů

Bioinformatická analýza 4505 genomů ukázala, že se ABCF proteiny hojně vyskytují u eukaryotních organismů a bakterií. Bakteriální kmeny disponují různým počtem ABCF proteinů na genom, kdy zástupci kmene *Actinobacteria* kódují ve svém genomu až 11 ABCF proteinů. Přes široké rozšíření a výskyt vyššího počtu kopií ABCF proteinů na genom nejsou rozšířeny univerzálně. Mezi bakteriemi existují výjimky, mezi které patří rod *Aquificae*, u kterého nebyly tyto proteiny vůbec objeveny. Jejich téměř úplná absence je v genomech *Archaea*. V současnosti jsou ABCF proteiny detekovány pouze u čtyř zástupců archeálního kmene *Euryarchaeota* (*Candidatus Methanomassiliococcus intestinalis*, *Methanomethylophilus alvus*, *Methanomassiliococcus luminyensis* a *Thermoplasmatales* archaeo BRNA1); (25).

Rodina ABCF proteinů se dále člení do velkého množství podrodin (Obr. 12); (25). Předpokládanou společnou vlastností těchto skupin je krom společné strukturní podobnosti také jejich funkční spojení

s translací a ribozomem, a to od maturace ribozomálních podjednotek (např. kvasinkový protein Arb, či potenciální přímé, či nepřímé zapojení Uup), přes regulaci translace ve stresových podmínkách (např. EttA a Uup), až po rezistenci k antibiotikům inhibujícím translaci. Nejvíce prostudované jsou proteiny zapojené do regulace a udílení rezistence, ale fyziologická funkce většiny ABCF proteinů je stále nejasná. ABCF proteiny zapojené v rezistenci (ARE ABCF) tvoří sedm podrodin označených jako ARE1–ARE7. ARE1 v sobě obsahuje dvě podskupiny, které se vzájemně odlišují rezistenčním fenotypem. Dále byly predikovány skupiny, které jsou potenciálně zapojeny v rezistenci (BAF1–BAF3, FAF1–FAF2, PAF1 a AAF1–AAF6). AAF skupiny se specificky vyskytují pouze u zástupců kmene *Actinobacteria*, jehož zástupci jsou často zapojeni do produkce sekundárních metabolitů (25). Ard1 je prvním zástupcem skupiny AAF1, u kterého bylo experimentálně potvrzeno jeho zapojení do rezistenčního mechanismu (184). Tato dizertační práce se zaměřuje na proteiny z podrodiny ARE5 u producentů antibiotik.



Obrázek 12: Fylogenetická klasifikace ABCF proteinů. Skupiny ARE ABCF proteinů jsou ve fylogenetickém stromě znázorněny červeně (převzato a upraveno (25)).

2.3.1.1. ABCF proteiny s regulační funkcí

Nejvíce testovanými nerezistenčními ABCF proteiny jsou YheS, Uup, YbiT a EttA z modelového organismu *Escherichia coli* (22, 185, 186). Tyto proteiny se podílejí na udržení aktivní syntézy proteinů, které obsahují aminokyselinové sekvence obtížné pro translaci (22).

Proteiny jsou tvořeny různými kombinacemi aminokyselin. Sekvence vznikajícího proteinu významně ovlivňuje rychlost translace skrze interakce s ribozomem v oblasti NPET. Pro přežití potřebuje bakterie

translatovat různé aminokyselinové kombinace s vyhovující efektivitou. Těžce translatované motivy způsobují zastavení ribozomu či předčasné ukončení translace následkem destabilizace ribozomu (187, 188).

Poly-prolinové úseky mají za následek destabilizaci peptidyl-tRNA v P-místě ribozomu, čímž dojde k zastavení ribozomu. Univerzálně kódovaný translační faktor EF-P pomáhá zachovat správnou geometrii pro tvorbu peptidické vazby a tím pomáhá předcházet zastavení ribozomu v úseku bohatém na prolin. Homologní proteiny elongačního faktoru EF-P se nacházejí také u *Archaea* a *Eukarya* (aIF5A, eIF5A); (125-127). Nutnost translace proteinů s úseky bohatými na prolin je v souladu s nepostradatelností proteinu EF-P či proteinu s podobnou funkcí. U bakteriálního kmene *B. subtilis* přebírá ABCF protein YfmR úlohu EF-P v případě delece jeho genu (Δefp). Situace, kdy bakterie postrádá oba proteiny, je pro bakterii letální (24). Schopnost zabránit zastavení ribozomu při translaci poly-prolinové sekvence a tím zachovat aktivní translaci proteinů obsahujících sekvence bohaté na prolin byla detekována i u proteinu Uup z *E. coli*, který je schopen převzít úlohu YfmR při heterologní expresi v *B. subtilis* (22, 24).

Buňka těžce translatované peptidy využívá také k regulaci genové exprese. Příkladem je protein SecM obsahující sekvenční motiv F¹⁵⁰XXXXWXXXXGIRAGP¹⁶⁶, který indukuje zastavení ribozomu na prolinu P166. Zastavení ribozomu při translaci SecM spouští syntézu proteinu SecA, jehož gen se na polycistronní mRNA vyskytuje za genem *secM* (187, 192). ABCF protein YheS je schopen obnovit translaci zastaveného ribozomu v tomto motivu (22).

Pozitivně nabitě aminokyseliny vznikajícího proteinu mohou interagovat s negativně nabitým výstupním tunelem ribozomu. Naopak negativně nabitě aminokyseliny mají destabilizující účinek. ABCF proteiny YbiT a EttA (energy-dependent translational throttle A) pomáhají ribozomu překonat tato obtížná místa (22). EttA využívá tento mechanismus k regulaci exprese ve stresových podmínkách. Byl navržen model, ve kterém EttA monitoruje energetický stav buňky skrze poměr ATP/ADP a v závislosti na něm reguluje první krok translace (185, 186). V souladu s tímto modelem bylo detekováno snížení fitness ve stacionární růstové fázi při deleci genu *ettA* (186). Tento model ovšem neobjasňoval fyziologickou funkci proteinu. Produkce proteinu EttA reaguje na stres způsobený vysokou koncentrací NaCl v kultivačním médiu s aminokyselinami jako zdrojem uhlíku. V těchto podmínkách byla detekována schopnost proteinu EttA přímo regulovat translaci enzymů zapojených v citrátovém a glyoxylátovém cyklu. Mimo to bylo objeveno jeho zapojení do regulace dalších proteinů spojených se stresovou odpovědí bakterie. Regulace je založena na schopnosti EttA obnovit translaci zastaveného ribozomu na kladně nabitých aminokyselinách v nově vznikajícím proteinu. EttA hraje významnou úlohu v unikátní regulaci probíhající skrze modulaci sekvenčně specificky zastaveného ribozomu zapojené ve stresové odpovědi buňky (23).

2.3.1.2. Rezistence zprostředkována ABCF proteiny

Problém antibiotické rezistence při léčbě mikrobiálních infekcí je v současné době vážným celosvětovým problémem (98). Bakterie si vyvinuly různé mechanismy, které jim umožňují uniknout a přežít expozici těmito látkami (4). Mezi klasické a dobře popsání typy rezistence můžeme zařadit změnu zásahového místa, snížení akumulace antibiotik v buňce a inaktivaci antibiotik (193). Tato práce se zaměřuje na proteiny udílející rezistenci zprostředkovanou skrze ochranu zásahového místa, tedy v tomto případě ribozomu (20). ARE ABCF proteiny udílí rezistenci ke klinicky významným skupinám antibiotik vázajícím se k velké 50S ribozomální podjednotce (Kap. 2.1.2.). Mezi nejlépe popsání zástupce patří ty, které se vyskytují

u patogenních bakterií, kde komplikují jejich léčbu. Převážně se jedná o rody *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, ale ARE proteiny byly detekovány i u rodů *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, nebo *Listeria* (19, 184). Geny pro ARE proteiny mohou být kódovány na mobilních genetických elementech, což usnadňuje jejich šíření mezi bakteriálními kmeny (194, 195). Důležitou roli mají ARE ABCF proteiny i u producentů antibiotik, kde se podílejí na ochraně producenta před toxicitou produkovaného metabolitu (13–17). Na základě jejich antibiotické specifity lze ARE ABCF proteiny rozdělit do tří skupin:

1. V rezistenci k linkosamidům, streptograminům A a příležitostně k pleuromutilinům (LS_AP) vázajícím se do PTC ribozomu je zapojeno několik fylogenetických skupin (ARE2, ARE3, ARE5, ARE6 a jedna z podskupin ARE1). Mezi nejlépe popsané proteiny udílející LS_AP rezistenci patří Vga proteiny (196, 197), VmlR (198), LsaA (199), Sala (200), VgaL (dříve označovaný jako Lmo0919); (194, 201, 202), SrpA (203) a LmrC (13) z producenta LIN.
2. Rezistenci k makrolidům (včetně ketolidů) a streptograminům B (MS_B) vázajícím se hlouběji do ribozomu v oblasti NPET udílí skupiny ARE4 a druhá podskupina ARE1. Mezi nejlépe prostudované patří protein MsrA (Macrolide and streptogramin B resistance), poprvé popsaný u kmene *Staphylococcus aureus*, a jeho varianty (204, 205).
3. Méně experimentálně charakterizované jsou fylogenetické skupiny ARE7 a ARE8, které udílí rezistenci k amfenikolům a oxazolidinonům (PhO). Prvním objeveným ARE proteinem schopným udílet rezistenci k PhO antibiotikům byl protein OptrA (ARE7) kódovaný na plazmidu pE349 u *Enterococcus faecalis* (195). Dalším významnějším zástupcem je PoxTA (ARE8) charakterizovaný u MRSA kmene *S. aureus* (206). Tato skupina je z klinického pohledu významná pro schopnost OptrA a PoxTA udílet rezistenci k LNZ, oxazolidinonu, který patří mezi tzv. léky poslední záchrany (21). Pro PoxTA byla popsána schopnost udílet rezistenci k tetracyklinu (206). Toto pozorování se nepovedlo následně potvrdit (207). Tetracykliny se váží na malou 30S ribozomální podjednotku, a proto se nadále předpokládá, že ARE ABCF k těmto antibiotikům rezistenci neudílejí (11). I přestože se vazebná místa pro PhO a LS_AP antibiotika překrývají, nejsou ARE proteiny schopné udílet rezistenci ke všem těmto látkám najednou.

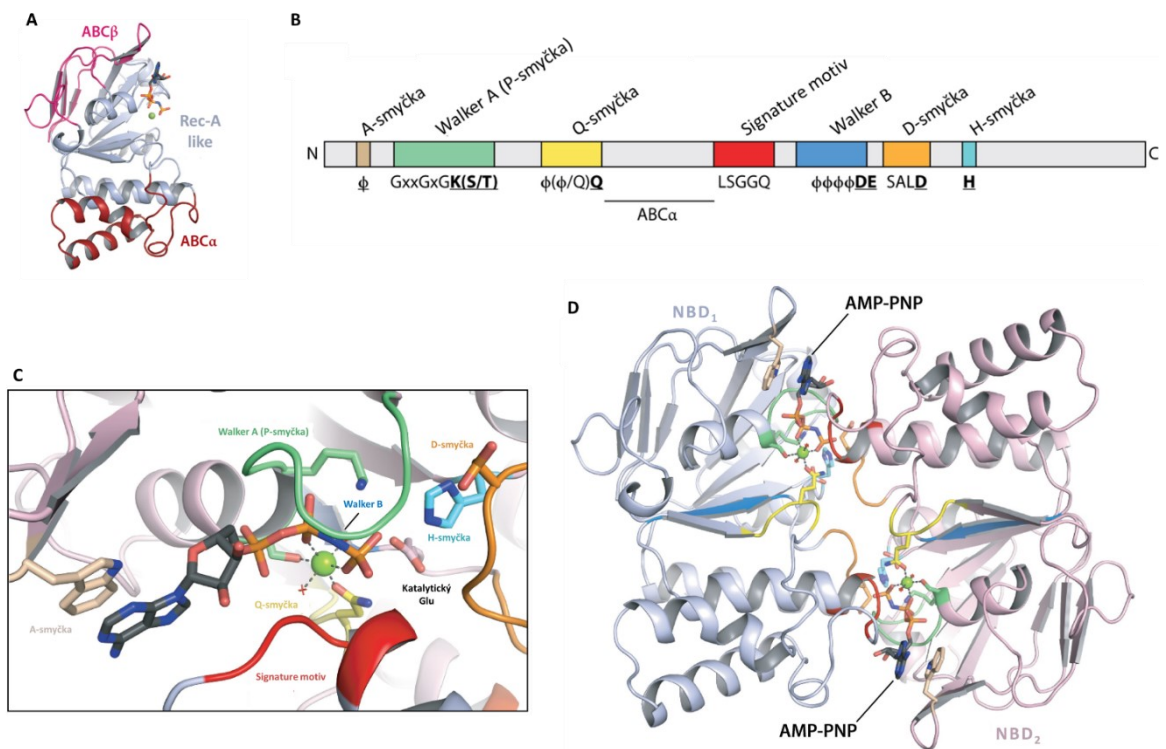
Pro proteiny VmlR z *B. subtilis* (198) a Ard1 ze *S. capreolus* (208) byla potvrzena schopnost udílet rezistenci k aminonukleosidovému antibiotiku A201A, čímž bylo spektrum antibiotik, ke kterým ABCF proteiny udílí rezistenci, rozšířeno. V případě ARE2 proteinu VmlR byla ještě detekována schopnost udílet rezistenci k hygromycinu A (184).

Pro některá antibiotika inhibující translaci, jakými jsou např. CAM, LNZ, či ERY, byla prokázána sekvenčně specifická inhibice translace (63, 83, 84), což je podobné jako v případě regulačních ABCF proteinů, pro které bylo prokázáno funkční spojení se zastaveným ribozomem při translaci specifických sekvencí (22). V obou případech je funkce ABCF proteinů spojena s vystavením bakterií stresovým podmínkám.

2.3.2. Struktura

Struktura proteinů ABCF rodiny je tvořena dvěma nukleotid vazebnými doménami (NBD), které jsou spojeny pomocí interdoménového linkeru. NBD domény jsou vysoce konzervované a v rámci celé ABC proteinové nadrodiny sdílí základní strukturní a sekvenční motivy (19, 21). Každá z domén je tvořena třemi subdoménami (Obr. 13A). Centrální část tvoří subdoména konzervovaná u mnoha dalších NTPáz označovaná jako Rec-A like. Strukturně je složena z šesti β -listů a čtyř α -helixů (označené jako A-D). Ta je doplněna o ABC β subdoménu skládající se ze tří antiparalelních β -listů a α -helixovou subdoménu (ABC α). Významnými motivy NBD domén jsou Walker A, Walker B a signature motiv, A-smyčka, D-smyčka, Q-smyčka a H-smyčka (Obr. 13B); (183, 209). ABC proteiny s transportní funkcí mají dále dvě transmembránové domény (TMD), které tvoří průchod přes membránu a nejsou sekvenčně příliš konzervované. TMD zcela chybí u cytosolických ABC proteinů (ABCF a ABCE rodiny); (21, 183).

NBD domény jsou schopné vázat a hydrolyzovat dvě molekuly ATP, čímž získávají energii pro funkci proteinu. Každý z výše zmíněných motivů se nějakou měrou podílí na vazbě a hydrolyze ATP. V Rec-A like subdoméně je umístěn Walker A motiv (GxxGxGK(S/T), kde x označuje libovolnou aminokyselinu), také označovaný jako P-smyčka, který je zodpovědný za vazbu β - a γ -fosfátu na molekule ATP, čímž přispívá ke správné orientaci a hydrolyze ATP. Walker A motiv je také zapojen v koordinační vazbě Mg^{2+} iontu, který je kofaktorem při hydrolyze ATP (209, 210). Ke správné orientaci ATP přispívá také A-smyčka, která je lokalizována ve vzdálenosti přibližně 25 aminokyselin před Walker A motivem. Jedná se o vysoce konzervovaný aromatický aminokyselinový zbytek, který interaguje s adeninem z vázaného ATP prostřednictvím stacking interakce (209, 211). Q-smyčka ($\phi(\phi/Q)Q$, kde ϕ označuje hydrofobní aminokyselinový zbytek) tvoří krátké spojení mezi subdoménami a obsahuje konzervovaný glutamin, který se také podílí na interakci s γ -fosfátem ATP. V případě ABC transportérů hraje úlohu i v interakci s TMD. Typickým motivem pro ABC proteiny je tzv. signature motiv (LSGGQ/E), též označovaný jako C-smyčka (21, 210). Signature motiv se podílí na vazbě ATP i jeho hydrolyze. Za Walker B motivem ($\phi\phi\phi\phi D$, kde ϕ označuje hydrofobní aminokyselinový zbytek), který poskytuje aspartát účastnící se koordinační vazby Mg^{2+} iontu, se nachází vysoce konzervovaný glutamát. Ten je zásadní pro hydrolyzu ATP, neboť polarizuje molekulu vody, která atakuje γ -fosfát na molekule ATP při jeho hydrolyze. V případě mutace na glutamin (tzv. EQ mutanta) ztrácí protein schopnost hydrolyzovat ATP (21). Vhodnou pozici vody zajišťuje také D-smyčka (SALD). Tak jako Q-smyčka i H-smyčka, někdy označovaná jako switch region, se podílí na interakci s γ -fosfátem na molekule ATP. Vysoce konzervovaný histidin nacházející se v H-smyčce hraje klíčovou roli ve stabilizaci tranzitního stavu katalyzované hydrolyzy (209). ABC proteiny váží molekuly ATP mezi obě NBD domény. Vzniklý dimer je označován jako ATP-sandwich (Obr. 13D). Molekula ATP je tedy vázána mezi Walker A motiv, Walker B motiv, A-smyčku, H-smyčku a Q-smyčku z jedné NBD a signature motiv druhé NBD (Obr. 13C); (183, 209).

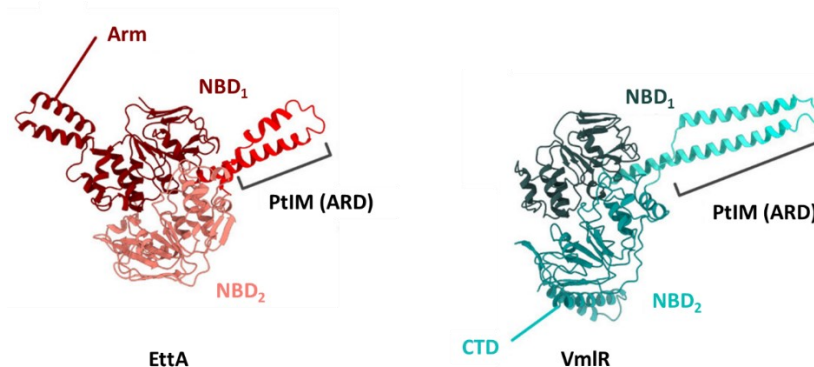


Obrázek 13: Struktura NBD domén ABC proteinů. (A) Struktura dimeru NBD domén se zvýrazněnými subdoménami Rec-A like, ABC β ABC α . (B) Lineární zobrazení s vyznačenými konzervovanými sekvenčními motivy. (C) Zobrazení nukleotid-vazebného místa s vyznačenými strukturálními motivy zapojenými do vazby ATP (AMP-PNP). (D) Struktura dimeru NBD domén s navázanými nehydrolyzovatelnými analogy ATP (AMP-PNP). Kofaktor Mg²⁺ je znázorněn zelenou kuličkou (převzato a upraveno (209)).

Kromě výše popsaných motivů ABCF proteiny obsahují další unikátní charakteristické regiony (Obr. 14). Společným znakem ABCF proteinů je prostorově výrazný interdoménový linker propojující NBD domény (20, 21). Doména je označována jako P-site tRNA interaction motif (PtIM). U proteinů s rezistenční funkcí (ARE ABCF proteiny) je tento úsek nazýván antibiotic resistance domain (ARD); (186, 207). Linker o délce 60–100 aminokyselin je tvořen dvěma α -helixy spojenými smyčkou o variabilní délce. Delší linkery se vyskytují u ARE ABCF proteinů. Doména je variabilní nejen v délce, ale také v aminokyselinové sekvenci (19–21). ARD je pro aktivitu ABCF proteinů důležitá, což dokládá delece této domény u rezistenčního proteinu MsrD a translačního faktoru YheS vedoucí ke ztrátě funkce těchto proteinů (22, 212).

Některé ABCF proteiny mají v ABC α subdoméně NBD₁ vloženou další α -helikální subdoménu označovanou jako arm. Funkce této domény zatím nebyla plně objasněna (21, 185, 186, 213).

Další specifickou strukturou je C-terminální doména (CTD), neboli C-terminální prodloužení (CTE). CTD má proměnlivou délku a stejně jako arm subdoména není přítomna u všech ABCF proteinů. Strukturálně je tvořena dvěma α -helixy, které tvoří strukturu zvanou „coiled-coil“. Funkce CTD není plně objasněna, ale je důležitá pro funkci proteinu (21). U ARE proteinů VmlR, VgaA a translačního faktoru YheS bylo prokázáno, že její delece ovlivňuje proteinovou funkci (snižuje úroveň udílené rezistence, resp. schopnost udržení aktivní syntézy); (22, 207, 214). Arm subdoména, linker i CTD jsou sice u ABCF proteinů variabilní co do primární sekvence, ale vykazují strukturální konzervovanost a jsou bohaté na nabitě aminokyseliny.



Obrázek 14: Struktura vybraných ABCF proteinů se znázorněním specifických domén. ABCF proteiny jsou tvořeny dvěma NBD doménami, které jsou spojeny linkerem. Tato doména je u regulačních ABCF proteinů označována jako PtIM a u ARE ABCF jako ARD. Tyto domény mohou být doplněny o subdoménu Arm, nebo CTD (převzato a upraveno (21)).

2.3.3. Interakce ABCF proteinů s ribozomem

ABCF proteiny jsou solubilní proteiny, jejichž funkce je spjata s translací a ribozomem zejména za stresových podmínek (21). Na základě dosud publikovaných struktur ABCF proteinů dochází k jejich vazbě na ribozom do podobného vazebného místa. Struktury komplexu ABCF proteinů s ribozomem byly získány pomocí mutantních proteinů neschopných hydrolyzy ATP (EQ mutanty), nebo za použití nehydrolyzovatelného analogu AMP-PNP (184–186, 202, 213, 215–217).

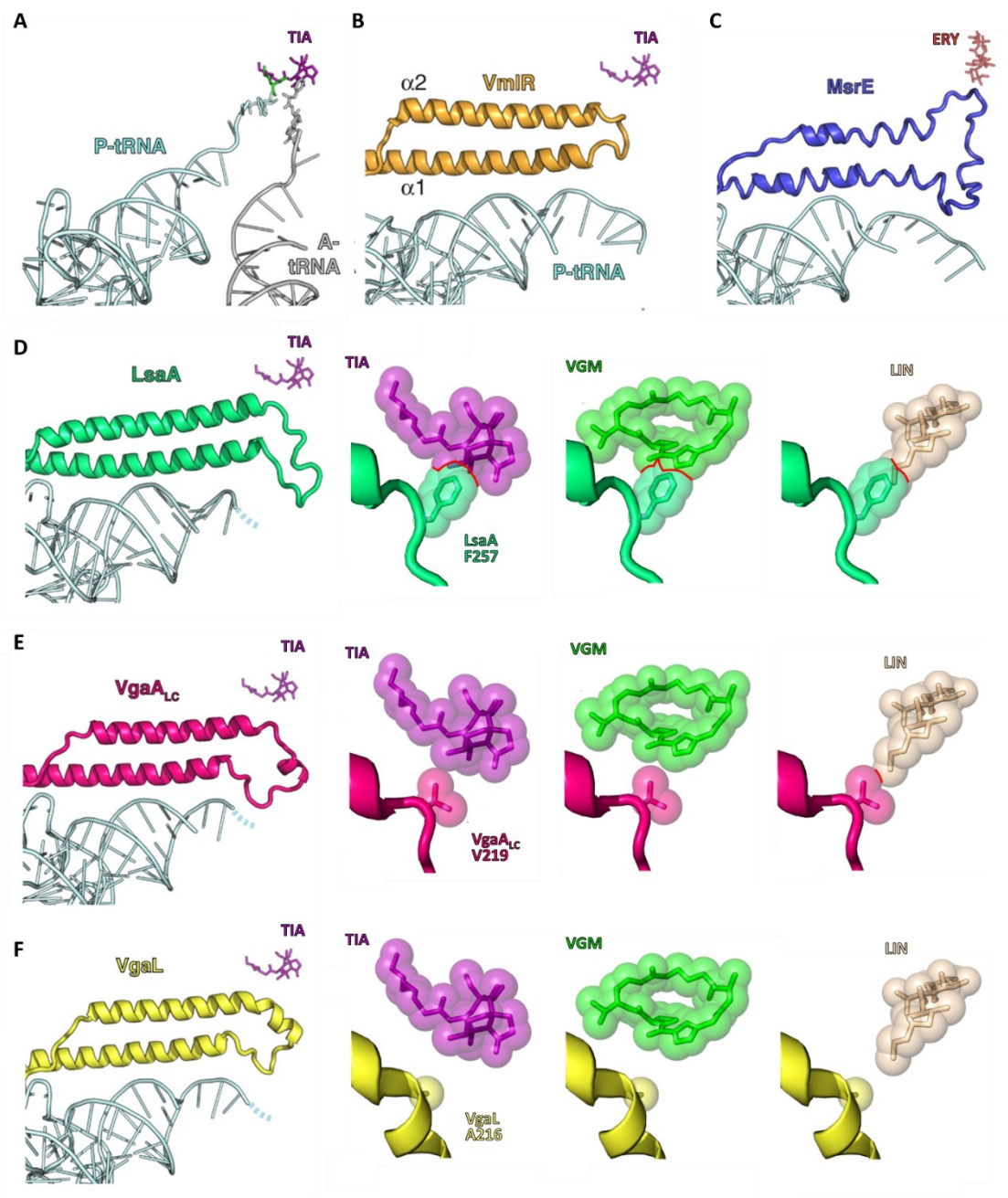
ABCF proteiny se vážou do volného ribozomálního E-místa. Při aktivní translaci za běžných podmínek dochází jen zřídka k situaci, kdy je E-místo volné, neboť uvolnění deacylované tRNA z E-místa probíhá souběžně s posunem další deacylované tRNA z P- do E-místa ribozomu. Při stresových podmínkách, jakými může být např. vazba antibiotik do PTC ribozomu, dochází k zastavení translace a tím i k uvolnění E-místa pro vazbu ABCF proteinu (19, 21). V publikovaných strukturách interaguje NBD₁ s 23S rRNA (helixy H68, H77/H78) a ribozomálním proteinem L33 z velké 50S ribozomální podjednotky. U proteinů bez arm subdomény je i v přímém kontaktu a stabilizuje otevřenou konformaci L1 domény (L1 stalk); (19, 213, 216). U proteinu PoxTA je s tímto regionem naopak v kontaktu zmíněná arm subdoména prostřednictvím domény II L1 proteinu (185, 186, 213). NBD₂ je naopak v kontaktu s loktem (elbow) P-tRNA, ribozomálním proteinem velké 50S ribozomální podjednotky L5 a malou 30S ribozomální podjednotkou prostřednictvím 16S rRNA (h41–h42) a ribozomálního proteinu S7 (202, 213, 216). CTD proteinů VmlR, Vga_{ALC} a VgaL navazující na NBD₂ je lokalizována mezi proteiny S7 a S11 malé 30S ribozomální podjednotky (202, 216). Linker spojující obě NBD domény směřuje směrem k PTC. V závislosti na délce zasahuje buď přímo do PTC nebo jeho blízkosti. Je v kontaktu s akceptorovým ramenem a 3' koncovou sekvencí -CCA P-tRNA a 23S rRNA (helixy H74–H75, H93). Interakcí s ABCF proteiny dochází k posunu P-tRNA ze standardní vazebné pozice. Toto vychýlení je závislé na konkrétním ABCF proteinu (19, 213, 216).

2.3.4. Mechanismus funkce ABCF proteinů

ABCF proteiny jsou zapojeny v různých aspektech proteinové syntézy. Přesný mechanismus funkce ovšem zatím nebyl potvrzen. Na základě publikovaných strukturálních a molekulárních dat lze očekávat, že i přes funkční různorodost je jejich funkce spojena s vazbou do E-místa ribozomu (Kap. 2.3.3.) a základní

mechanismus funkce by mohl být postaven na podobných základech (21). Nejlépe popsané jsou ARE ABCF proteiny zodpovědné za rezistenci k ribozom-vazebným antibiotikům mechanismem ochrany zásahového místa (20). Prvním potvrzením tohoto mechanismu byla obnova inhibované translace LIN a VGM přidáním vyperifikovaných ARE ABCF proteinů LsaA a VgaA v *in vitro* translační esaji (18).

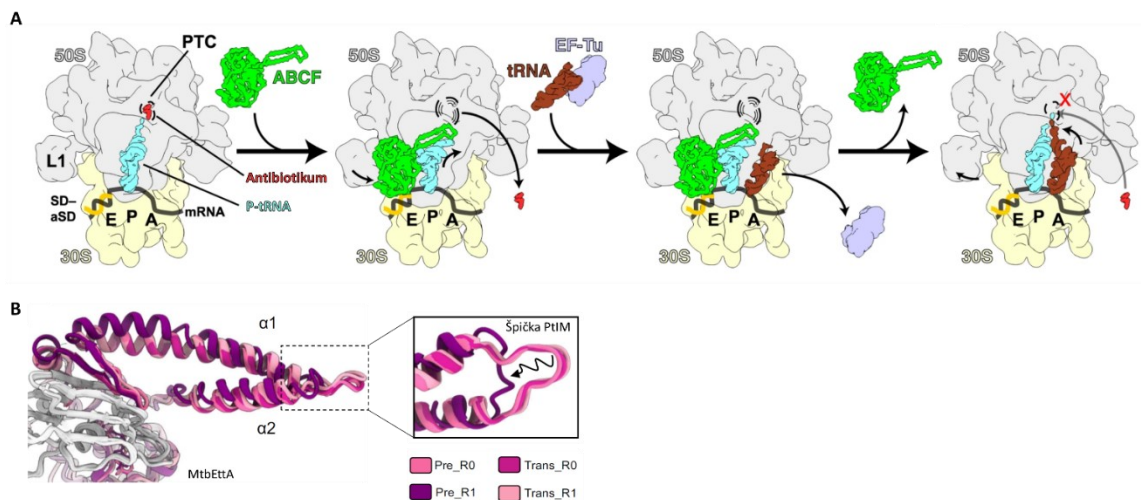
Výrazným strukturním motivem je do prostoru vystupující ARD doména. Byl navržen mechanismus, ve kterém se špička ARD domény dostává do přímé či nepřímé interakce s antibiotikem, které vytěsni z jeho vazebného místa. V souladu s touto hypotézou jsou různé dlouhé linkery ABCF proteinů. Proteiny zapojené v rezistenci k makrolidovým antibiotikům, která se vážou hlouběji v ribozomu, mají spíše delší ARD doménu v porovnání s proteiny udílejícími rezistenci k LS_AP antibiotikům a translačnímu faktoru EttA. Za substrátovou specifitu u různých variant proteinu VgaA odpovídá aminokyselinová variabilita v pozicích 218, 219, 220 a 226, které jsou lokalizované ve špičce ARD domény (218). Z těchto pozic se s vazebným místem pro antibiotika překrývá pouze pozice 219 a to s místem pro LIN (Obr. 15E). Jeho mutace na alanin ovšem neovlivňuje udílenou rezistenci (202). Výrazná změna funkce proteinu nebyla detekována ani u ARE2 proteinu VmlR (F237V, F237A); (216). Při mutační analýze translačního faktoru YheS byla potvrzena klíčová úloha několika pozic napříč celou ARD doménou, které naznačují významnost udržení struktury linkeru pro jeho funkci (22). Podobné vlastnosti vykazuje také protein LsaA (Obr. 15D). Fenylalanin na pozici 257 lokalizovaný ve špičce ARD proteinu LsaA se překrývá s vazebným místem pro LS_AP antibiotika. Jeho záměna za alanin (F257A) nemá vliv na udílenou rezistenci na rozdíl od záměny lysinu na pozici 244, který interaguje s nukleotidy G2251 a G2252 23S rRNA skrze vodíkové můstky. V případě VgaL pak k žádnému překryvu s vazebným místem LS_AP antibiotik nedochází (Obr. 15F). Při porovnání vazebného místa pro TIA s různými ARE proteiny bylo pozorováno, že delší špička u proteinů účastnících se rezistence k LS_AP antibiotikům se odklání od vazebného místa TIA směrem k 3' koncové části P-tRNA (Obr. 15). V případě MsrE, spojeného s rezistencí k makrolidům, je špička ARD rozložena jak do směru k P-tRNA, tak k vazebnému místu pro ERY (Obr. 15C); (202). Z funkčního hlediska hraje důležitou úlohu tedy spíše struktura ARD než aminokyselinové složení jeho špičky. Přímá interakce mezi ARE ABCF proteiny a antibiotiky nehraje v tomto mechanismu rezistence stěžejní roli. Důležitější je změna konformace pomocí interakce s 23S rRNA (Obr. 16A); (22, 202). Role dalších subdomén není zatím objasněna. Delece CTD u proteinu VmlR je spojena s nižší úrovní rezistence, a proto budou v mechanismu funkce ABCF proteinů i tyto regiony hrát důležitou úlohu. Hydrolyza ATP pak vede k disociaci proteinu z ribozomu (217).



Obrázek 15: Strukturální porovnání špičky ARD domény ARE ABCF proteinů. Srovnání konformace špičky ARD domény u vybraných ARE ABCF proteinů – VmlR (oranžová, B), LsaA (zelená, D), VgaALC (růžová, E) a VgaL (žlutá, F) v přítomnosti TIA, a proteinu MsrE (modrá, C) v přítomnosti ERY. Struktura A ukazuje stav bez vazby ARE ABCF proteinu. Pro proteiny LsaA, VgaALC a VgaL je znázorněná i jejich interakce v PTC s antibiotiky TIA (fialová), VGM (zelená) a LIN (světle hnědá; převzato a upraveno (202)).

Nevýhodou výše popsaných struktur je jejich zamčení ve stavu před hydrolyzou ATP pomocí využití proteinů neschopných hydrolyzy (EQ mutanty) nebo využitím nehydrolyzovatelného ATP. Cui Z. a kolegové se pokusili za využití kryoelektronové mikroskopie a rentgenové krystalografie popsat konformační změny pro komplex ABCF proteinu MtbEttA (Rv2477c) z *Mycobacterium tuberculosis* s ribozomem v průběhu ATPázového cyklu. Pro zachycení jednotlivých stavů využili nehydrolyzovatelný analog AMP-PNP a ADP-VO₄, analog napodobující tranzitní stav při hydrolyze ATP. MtbEttA je vázán v E-místě ribozomu jak ve stadiu před hydrolyzou ATP, tak v tranzitním stavu. Při porovnání získaných struktur bylo detekováno protažení špičky PtIM (ARD) domény (Obr. 16B). Vazba MtbEttA do ribozomu snižuje celkový pohyb malé

30S podjednotky vůči 50S podjednotce a zároveň stabilizuje tRNA v P/P pozici. ABC proteiny zaujímají dvě konformace – otevřenou (po hydrolýze ATP) a zavřenou (po vazbě ATP). Protein MtbEttA je slabou ATPázou a bez ribozomu, který podporuje zaujetí zavřené konformace, není schopný efektivně hydrolyzovat ATP. Po hydrolýze ATP zaujímá otevřenou konformaci a byl zaznamenán překryv jeho arm subdomény s ribozomálními proteiny S7 a L1, což zabraňuje jeho vazbě v ribozomu (217).



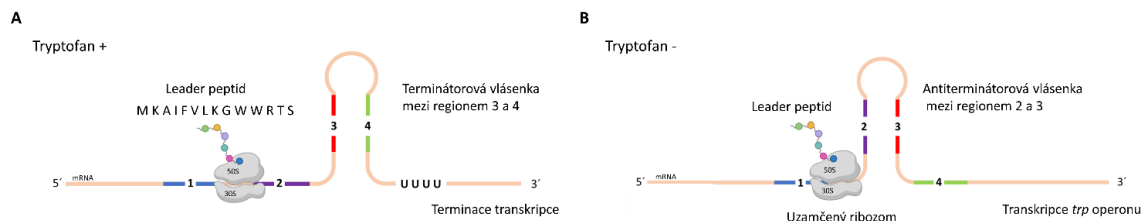
Obrázek 16: Mechanismus ochrany ribozomů zprostředkované ARE ABCF proteiny. (A) Model funkce ARE ABCF proteinů ukazující antibiotikem zastavený ribozom s volným E-místem, který je rozeznáván ARE ABCF proteinem. Následuje uvolnění navázaného antibiotika spojené s konformačními změnami a příchod nové aminoacyl-tRNA. Po hydrolýze ATP dochází k uvolnění ARE ABCF proteinu a pokračování translace. (B) Strukturální změna špičky ARD/PtiM domény v průběhu ATPázového cyklu (převzato a upraveno (202, 217)).

2.3.5. Regulace exprese ABCF proteinů

Bakteriální buňky žijí ve velmi dynamickém prostředí, které přináší nutnost rychlé reakce na stresové podmínky změnou genové exprese. Aktivitu a koncentraci proteinů lze regulovat na úrovni transkripce, translace i post-translační kontroly. Při regulaci exprese hraje důležitou úlohu 5' nepřekládaná oblast mRNA regulovaného genu, či operonu (5' UTR), která obsahuje vnitřní regulační RNA elementy. Tyto elementy reagují na vnější signály a patří mezi ně riboswitche a atenuátory (201). Signály mohou být jak fyzikálně-chemického charakteru (teplota, pH), tak různé molekuly (ionty, metabolity, tRNA). Nepřekládané oblasti jsou schopné zaujímat dvě různé vzájemně se vylučující sekundární struktury a tím ovlivnit expresi regulovaného genu odkrytím či schováním důležitých strukturálních motivů (např. ribozom vazebného místa (RBS)). V případě transkripční atenuace pak dochází k zformování terminační, či antiterminační vlásenky (201, 219, 220).

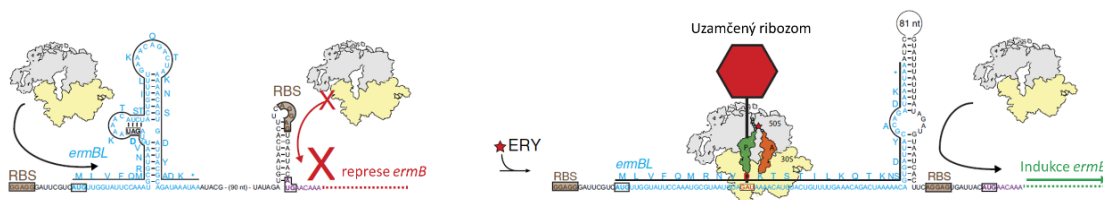
Klasickým příkladem ribozomem zprostředkované transkripční atenuace je regulace *trp* operonu u bakterie *E. coli*. Operon kóduje pět genů pro biosyntézu L-tryptofanu (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* a *trpA*). Tento mechanismus regulace je běžný u genů účastnících se biosyntézy i dalších aminokyselin. Před *trp* operonem se nachází 5' UTR oblast obsahující otevřený čtecí rámeček (ORF) kódující leader peptid (LP) o délce 14 aminokyselin. Regulační ORF je běžně označován jako vedoucí ORF (leader ORF), či uORF (upstream ORF); (221, 222). Tento uORF obsahuje dva po sobě jdoucí kodóny pro tryptofan monitorující dostupnost nabitých tryptofanyl-tRNA ($tRNA^{trp}$). V případě, že buňka má dostatek nabitých $tRNA^{trp}$ dochází k plynulému pročtení tohoto leader peptidu a k zformování terminátorové vlásenky pro předčasnou terminaci transkripce (Obr. 17A). Při akumulaci nenabitých $tRNA^{trp}$ dojde k vazbě této nenabité tRNA do ribozomu.

Vazba je následována zastavením ribozomu, který zformuje tzv. SRC komplex (stalled ribosomal complex). Tímto „uzamčením“ ribozomu v uORF dojde k vytvoření antiterminátorové vlásenky, čímž může pokračovat přepis genů pro biosyntézu tryptofanu (Obr. 17B). Operon je dále regulován dalším mechanismem, který využívá regulační protein – tzv. represor (219, 221–223).



Obrázek 17: Model mechanismu regulace transkripce *trp* biosyntetického operonu prostřednictvím atenuace. (A) V přítomnosti dostatečného množství aminoacylové-tRNA^{Trp} dochází k efektivní translaci LP, což vede k tvorbě terminační vlásenky doprovázené ukončením transkripce. (B) Při nedostatku nabitých tRNA dochází k pozastavení ribozomu na kontrolních Trp kodónech, což umožní vznik antiterminační struktury a transkripce operonu.

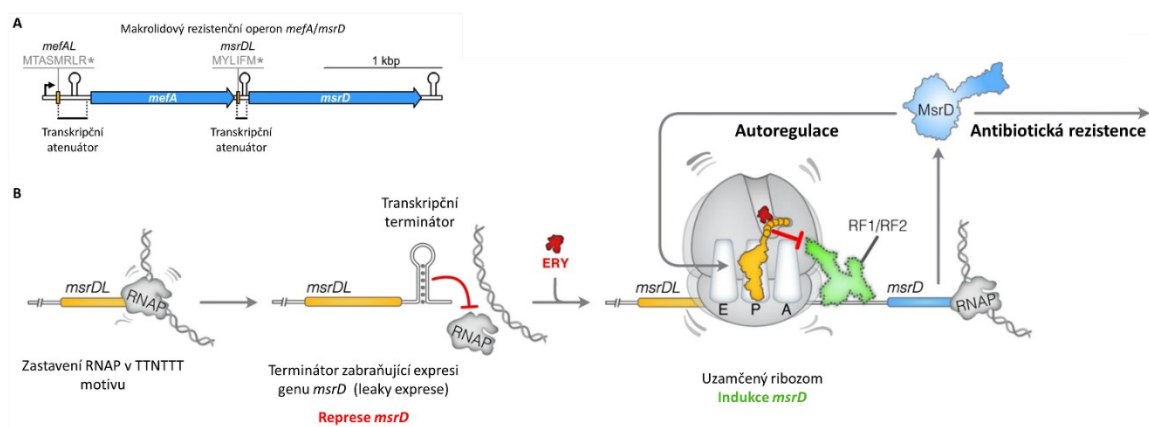
Geny udílející rezistenci k antibiotikům poskytují bakteriím výraznou výhodu ve stresových podmínkách (přítomnost antibiotika), ale jejich exprese v prostředí bez antibiotika má často negativní vliv na fitness buňky. Exprese rezistenčních genů je tedy běžně regulována v odpovědi na přítomnost indukujících antibiotik (220, 224). Modelovými geny pro studium ribozomem zprostředkované atenuace u rezistenčních genů jsou geny pro Erm metyltransferázy (220, 225). V absenci antibiotika je exprese *erm* genů potlačena tvorbou vlásenky maskující RBS. Po vazbě indukujícího antibiotika do ribozomu je translace uORF zastavena, čímž dojde k odhalení RBS pro *erm* gen a následně k jeho přepisu. Délka a aminokyselinové složení LP ovlivňuje specificitu indukce. Pro LP regulující expresi makrolidy indukovaných genů bylo popsáno několik konzervovaných aminokyselinových motivů (tzv. MAM – kap. 2.1.2.3.); (68, 226). Pro *erm* geny existují struktury popisující SRC s překládaným LP (226–229). Vedoucí peptid pro gen *ermB*, označovaný jako ErmBL, je kódován v regulační oblasti genu *ermB* (Obr. 18). Celková délka ErmBL je 27 aminokyselin. V přítomnosti ERY je translace zastavena na kodónu pro Lys (K11) po překladu prvních deseti aminokyselin. Při tvorbě ErmBL-SRC je v P-místě ribozomu vázaná peptidyl-tRNA^{Asp} a tRNA^{Lys} je vázaná v A-místě. ERY zapříčiňuje konformační změny v PTC, které inhibují formování nové peptidové vazby a vedou k zastavení ribozomu. Výsledný peptid v sobě nese jeden z výše zmiňovaných konzervovaných motivů (MLVFQMRNVD); (227, 229).



Obrázek 18: Schématické znázornění regulace genové exprese *ermB*. V reakci na přítomnost ERY dochází k zastavení translace ErmBL spojené se změnou konformace mRNA vedoucí k odkrytí RBS a zahájení translace proteinu ErmB (převzato a upraveno (227)).

I produkce ABCF proteinů je regulována v závislosti na přítomnosti antibiotik. Pro svou regulaci využívají ribozomem řízenou atenuaci, která je v některých případech modifikována. Experimentálně byla regulace zkoumána u pěti ARE ABCF proteinů (VmlR, MsrD, VgaL, VgaALC, CplR). Pokryty jsou tedy ABCF proteiny vyskytující se u *Firmicutes* (nově označované jako *Bacillota*); (184, 198, 201, 212, 230, 231).

ARE1 ABCF gen *msrD* je často lokalizován v *mefA/msrD* operonu s dalšími rezistenčními geny *mefA* a *mefE* spojenými s makrolidovou rezistencí (Obr. 19A). Gen *msrD* je kontrolován duální regulací skrze ribozom zprostředkovanou transkripční atenuací. V 5'UTR genu *msrD* je lokalizovaný uORF pro vedoucí peptid MsrDL (MYLIFM), který výlučně reguluje expresi *msrD* genu. Transkripce celého operonu je spuštěna v přítomnosti ERY z promotoru lokalizovaného přibližně 350 bp před genem *mefA*. Transkripce polycistronní mRNA je řízena pomocí LP MefAL (MTASMLRL), který je podobný ErmDL (MTHSMRLRFPTLNQ) pro ErmD metyltransferázu. Oba mají ve své sekvenci konzervovaný motiv spojený s makrolidem způsobenou blokadou ribozomu (tzv. +X+ motiv); (212, 226, 232). Expres *msrD* je indukována antibiotiky ERY a azitromycinem. Pro další makrolidová antibiotika (telitromycin, tylosin a spiramycin) formování SRC nebylo detekováno. Tyto výsledky korelují s rezistenčním fenotypem proteinu MsrD. Pro MsrDL-SRC komplex byla publikována struktura, která v kombinaci s genetickým přístupem umožňuje stanovit mechanismus regulace. Aminokyselinové složení LP, včetně STOP kodónu je důležité pro translační arest. N-konec proteinu MsrDL zaujímá háčkovitý tvar a je v kontaktu s 23S rRNA. Konkrétně se jedná o nukleotidy U2584, U2586, G2608 a C2610. Výrazná je pak interakce aminokyseliny Y2 s U2584, která vede k jeho vychýlení z kanonické pozice, a vytvoření stacking interakce s G2586. I když se L3 a I4, stejně jako u ErmBL, nedostávají do blízkého kontaktu s ERY hrají klíčovou úlohu v rozeznávání antibiotika. V přítomnosti ERY a tvorbě MsrDL-SRC komplexu je stericky bráněno vazbě RF1 a RF2 díky F5 a nukleotidům U2584 a U2585 23S rRNA. Mutace STOP kodónu vedou k snížení úrovně exprese. Výše popsané strukturální změny 23S rRNA mají za následek zamezení formování peptidické vazby a vazby RF. SRC dále zabraňuje formování Rho-nezávislého transkripčního terminátoru, čímž dojde k transkripci *msrD* genu (Obr. 19B). Jedním z možných vysvětlení, proč je exprese *msrD* pod duální kontrolou, je potřeba bakterie produkovat MsrD striktně regulovat kvůli jeho toxicitě v nepřítomnosti indukujících antibiotik. Tyto dva atenuátory také zajišťují, že k produkci MsrD dojde ve chvíli, kdy transportér MefA nestačí k zajištění rezistence a stoupne vnitřní koncentrace indukujícího antibiotika. Tato dvojí kontrola zamezuje bazální expresi v absenci induktoru, k čemuž přispívá i protein MsrD, který utlumuje svoji vlastní expresi (212).

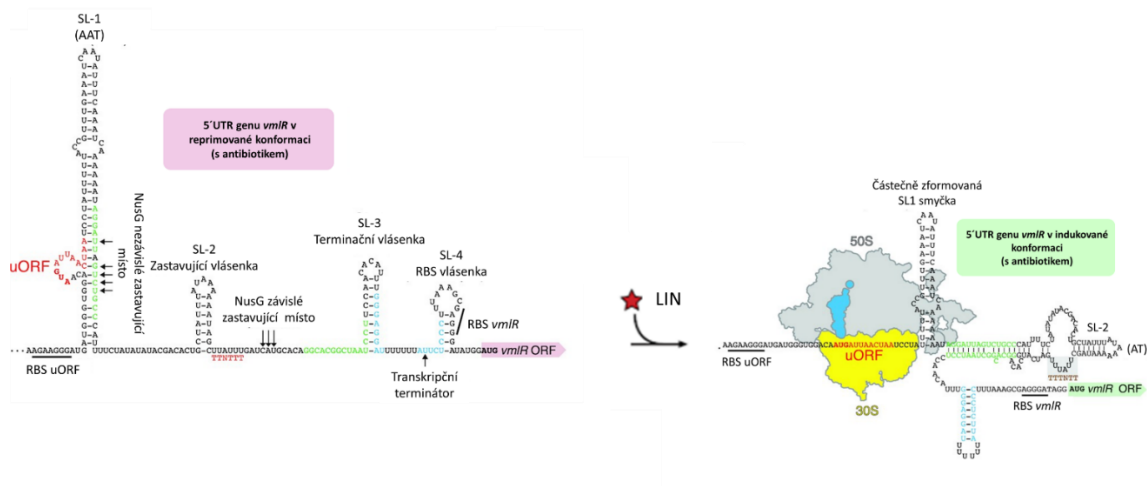


Obrázek 19: Model regulace genové exprese *msrD*. (A) Schématické znázornění organizace makrolidového rezistenčního operonu *mefA/msrD* se zvýrazněnými regulačními oblastmi. (B) Model regulace exprese *msrD* prostřednictvím konformační změny 5'UTR oblastí před genem v reakci na přítomnost ERY. V přítomnosti ERY dochází k zastavení translace *msrDL* a následně změně sekundární struktury mRNA, což umožní expresi *msrD*. Protein MsrD následně negativně reguluje svoji vlastní expresi (převzato a upraveno (212)).

Další charakterizované oblasti regulující ABCF proteiny jsou indukovatelné LS_AP antibiotiky. Pro regulaci využívají senzorový uORF kódující často krátký peptid o délce tří aminokyselin a tvorbu

antiterminátorové, či terminátorové vlásenky. Tento mechanismus byl ověřen delecemi v terminátorové a antiterminátorové vlásence pro gen *vgaL*. Klíčové úlohy uORF (kódovaná sekvence peptidu MKF) a tvorby SRC v regulaci *vgaL* genu byly potvrzeny mutací start kodónu v uORF a expresí ErmC metyltransferázy, která zamezila tvorbě komplexu. V obou případech došlo k útlumu exprese *vgaL*. Produkce VgaL je specificky aktivována v přítomnosti LIN, ale nikoliv ERY a CAM (201). Stejný regulační mechanismus reagující na LIN a pleuromutilinové antibiotikum RET byl ověřen i pro protein CplR z *Clostridium difficile*. Regulační uORF opět kóduje tripeptid (MRI). Při bioinformatické analýze vedoucího peptidu u rodu *Clostridium* byla pro třetí pozici zjištěna variabilita v aminokyselinové sekvenci (I/M); (184). U regulace exprese proteinu Vga_{ALC} bylo potvrzeno zapojení tripeptidu o sekvenci MIN. Specifita exprese *vgaA* se mění v závislosti na jeho rezistenčním profilu. Lze tedy očekávat, že regulace zapojující ribozomem zprostředkovanou atenuaci bude komplexnější a není ještě plně objasněna (230).

Expese genu *vmlR* využívá kombinovaný regulační mechanismus využívající translační a transkripční atenuaci. Specifita regulační oblasti je opět určena schopností antibiotik zastavit ribozom při translaci vedoucího peptidu. Efektivními indukujícími antibiotiky jsou linkosamidy (LIN, iboxamycin), pleuromutiliny (RET) a streptograminy A (virginamycin A). Toto spektrum odpovídá rezistenčnímu fenotypu ARE2 ABCF proteinu VmlR. Před genem *vmlR* je 219 nt dlouhý 5'UTR region obsahující několik regulačních elementů (Obr. 20). V regulační oblasti se v neindukujících podmínkách formují čtyři smyčky označené jako SL1–SL4. V oblasti SL1 se nachází uORF kódující tripeptid (MIN) a dochází k tvorbě anti-antiterminátorové vlásenky. SL1 region je pro expresi genu *vmlR* esenciální, neboť jeho delece vede k jejímu potlačení. Region SL2 je zapojený v zastavení RNAP a SL3 je terminátorová vlásenka. Poslední smyčka (SL4) maskuje RBS pro translaci VmlR proteinu. Úlohou SL4 je inhibice produkce VmlR v neindukujících podmínkách, pokud selže ukončení transkripce v regionu SL3. V přítomnosti LIN dojde k uzamčení ribozomu v uORF a tvorbě SRC. Tím dojde k zformování antiterminátorové vlásenky, transkripci celé mRNA a produkci VmlR. Pro ideální doladění míry exprese je do regulace zapojená NusG-závislá pauza RNAP. TTNTTT motiv, který se podílí na tomto typu zastavení, je lokalizovaný za SL2 regionem. NusG je globálním transkripčním elongačním faktorem ovlivňujícím také terminaci transkripce. NusG závislé zastavení RNAP dává čas pro zformování struktur potřebných pro správnou funkci regulační oblasti (anti-antiterminátorové vlásenky v absenci induktoru, zformování SRC při translaci LP v přítomnosti LIN). Zapojení NusG do regulační mašinerie přispívá k eliminaci slabé nespecifické exprese genu *vmlR* (tzv. leaky exprese); (198, 201, 231). Zapojení proteinu NusG do kontroly exprese rezistenčního genu bylo již dříve popsáno pro 23S rRNA metyltransferázu TlrB z *B. subtilis* udílející rezistenci k tylosinu (233). Dále se zvažuje i zapojení v expresi genu *msrD* neboť v *msrDL* byl nalezen TTNTTT motiv (212). Na indukci exprese *vmlR* se dále podílí malá signální molekula guanosin tetrafosfát/pentafosfát ((p)ppGpp). Tato molekula hraje důležitou úlohu v adaptaci buněk na nutriční stres. Zapojení této molekuly v regulaci exprese ABCF proteinů podporuje jejich roli ve stresové odpovědi bakterií (231).



Obrázek 20: Model regulace genové exprese *vmIR*. Schématické znázornění konformační změny v 5' UTR oblasti genu *vmIR* v reakci na přítomnost indukujících antibiotik. Tato strukturální změna reguluje expresi genu *vmIR* (převzato a upraveno (231)).

Na rozdíl od uORF zapojených v regulaci indukované makrolidovými antibiotiky, které mají konzervované aminokyselinové motivy, není mezi uORF spojených s LSAP antibiotiky výrazná sekvenční podobnost. Na rozeznání indukujících antibiotik se více než aminokyselinové složení podílí délka peptidu. LSAP antibiotika se vážou do PTC a inhibují translaci v její časně fázi. Díky tomu může dojít k zastavení ribozomu i na tomto krátkém peptidu. V případě makrolidových antibiotik dochází k inhibici translace v pozdější fázi elongace, a tak jsou tyto krátké peptidy přepsány, aniž by došlo k vytvoření SRC (54).

2.3.6. ABCF proteiny v biosyntetických genových klastrech

Některé ABCF proteiny jsou rozšířeny napříč různými skupinami bakterií (EttA, Uup, YdiF a Ybit). Tyto proteiny jsou doplněny o druhově specifické skupiny, jakými jsou např. ABCF proteiny označené jako AAF1–AAF5, vyskytující se pouze u bakterií z kmene *Actinobacteria*. Jedná se o proteiny potenciálně zapojené do udílení rezistence (Kap. 2.3.1.2.). Význam ABCF proteinů pro producenty antibiotik naznačuje jejich vyšší počet v genomech těchto bakterií, který dosahuje až počtu 11, v porovnání se zástupci kmene *Firmicutes* (25). Pravděpodobným důvodem je, že zástupci kmene *Actinobacteria* produkují velkou škálu bioaktivních látek, mezi které patří antibiotika inhibující translaci skrze vazbu do PTC a jeho okolí, ke kterým právě ARE ABCF udílí rezistenci (10, 20). Některé druhy bakterií nesou ve svém genomu více genů pro proteiny ze stejné skupiny ABCF proteinů, např. *S. lincolnensis* i *S. coelicolor* kódují dva ARE5 proteiny (LmrC a SLINC7152, respektive TiaA a Sco6720); (25).

ABCF proteiny se v BGC velmi často vyskytují společně s dalšími rezistenčními proteiny, které zajišťují ochranu pomocí jiných mechanismů. To naznačuje, že producenti disponují komplexním systémem ochrany. Např. V BGC pro syntézu aminonukleosidového antibiotika A201A nacházejícího se u *Streptomyces capreolus* je AAF1 protein Ard1 doplněn o rezistenční gen kódující protein Ard2 a MFS transportér (gen *ata9*). Rezistenční protein Ard2 udílí rezistenci prostřednictvím fosforylace antibiotika (208, 234, 235). Podobná kombinace rezistenčních genů se nachází také v BGC pro strukturálně příbuzný hygromycin A u producenta *Streptomyces hygrosopicus*. V tomto klastru byly identifikovány homology všech tří rezistenčních proteinů – Hyg28 (86% podobnost s Ard1), Hyg21 (66% podobnost s Ard2) a Hyg19 (65% podobnost s Ata9); (236).

V BGC pro syntézu makrolidových antibiotik se naopak převážně vyskytují ARE4 proteiny. Protein CarA je součástí BGC pro syntézu 16členného karbomycinu, též známý pod označením magnamycin, u *Streptomyces termotolerans*. V klastru o 30 ORF je také kódována metyltransferáza CarB zodpovědná za N₆ monometylací adeninu v pozici 2058 23S rRNA (237, 238).

Podobně komplexní je i BGC pro syntézy tylosinu, který obsahuje 43 genů (*tyl* geny). U *Streptomyces fradiae* je tento BGC lokalizován v regionu dlouhém přibližně 85 kb a je ohraničen rezistenčními geny *tlrB* a *tlrC*. Gen *tlrB* kóduje metyltransferázu, která modifikuje nukleotid G748 23S rRNA (helix 35), zatímco *tlrC* kóduje ARE4 ABCF protein. Tyto rezistenční geny doplňuje třetí rezistenční gen *tlrD* pro Erm monometyltransferázu. Bakterie *S. fradiae* má navíc mimo tento klastr ještě Erm dimetyltransferázu kódovanou genem *tlrA* (15, 118, 239).

Dalším příkladem může být ARE4 protein SrmB, který je lokalizován v BGC pro syntézu 16členného makrolidu spiramycinu. V tomto případě je rezistence k spiramycinu udílena skrze jeho inaktivaci pomocí glykosylace. V klastru jsou kódovány čtyři glykosyltransferázy a další GimA je lokalizována mimo klastr. V rezistenci je pravděpodobně kromě GimA zapojena i jedna glykosyltransferáza z BGC, její přesná identifikace však zatím nebyla potvrzena. V klastru je dále přítomen gen pro metyltransferázu označený jako SrmD (240).

ABCF proteiny vyskytující se u producentů antibiotik nejsou stále příliš dobře charakterizované. Významnějšími zástupci jsou výše zmíněné proteiny doplněné o VarM (17), OleB (241) a LmrC (13), které jsou také lokalizované v BGC pro antibiotika a předpokládá se jejich zapojení v ochraně producentů před toxicitou syntetizovaného produktu. V současnosti nejlépe charakterizovaným proteinem z producentů antibiotik je LmrC, který se nachází v BGC pro syntézu LIN spolu s dalšími dvěma rezistenčními proteiny, MFS transportérem LmrA a monometyltransferázou LmrB (Kap. 2.2.3.); (13). Tento ARE5 protein je i předmětem této dizertační práce.

3. Cíle dizertační práce

Tato práce si klade za cíl objasnit roli ARE5 ABCF proteinů u rodu *Streptomyces* s důrazem na propojení jejich rezistenční funkce s fyziologickou úlohou s možným ekologickým přesahem. Práce se zaměřuje na charakterizaci role ARE5 ABCF proteinu LmrC z kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466, jehož gen je lokalizován v BGC pro syntézu linkomycinu, a dvou ARE5 proteinů z organismu *Streptomyces coelicolor* M145, jejichž geny se naopak nacházejí mimo BGC. Dílčí cíle této dizertační práce jsou:

Studium biologické funkce ARE5 proteinu LmrC v *S. lincolnensis* ATCC 25466

1. Analýza vlivu rezistenčních proteinů z BGC pro syntézu linkomycinu na celkovou odolnost bakterie *S. lincolnensis* vůči linkosamidovým antibiotikům
 - Příprava sady bakteriálních kmenů zahrnující deleční mutanty genů *lmrA*, *lmrB* a *lmrC*, jejich komplementaci a heterologní expresi těchto rezistenčních genů ve *S. coelicolor*
 - Stanovení rezistenčního fenotypu udíleného proteiny LmrA, LmrB a LmrC
2. Stanovení vlivu proteinu LmrC a jeho ATPáza deficientních variant na bakteriální růst
 - Příprava konstruktů pro expresi ATPáza deficientních variant proteinu LmrC a jejich vnesení do kmenů *S. lincolnensis*, ΔC , *S. coelicolor* M1154 a *S. coelicolor* M145
 - Stanovení vlivu proteinu LmrC a připravených variant na bakteriální růst
3. Objasnění role ARE5 ABCF proteinu LmrC v biosyntéze linkomycinu u *S. lincolnensis*
 - Posouzení vlivu rezistenčních proteinů LmrA, LmrB a LmrC na produkci linkomycinu
 - Stanovení role proteinu LmrC v antibiotiky indukované produkci linkomycinu
4. Stanovení podmínek produkce proteinu LmrC v kontextu jeho rezistenčního fenotypu
 - Analýza vlivu rezistenčních proteinů LmrA a LmrB z linkomycinového BGC na produkci proteinu LmrC

Studium biologické funkce ARE5 proteinů v *S. coelicolor* M145

1. Charakterizace antibiotické specificity ARE5 proteinů TiaA a SCO6720 ze *S. coelicolor* M145
2. Fylogenetická analýza podrodiny ARE5 ABCF proteinů
3. Stanovení vlivu LS_AP antibiotik a ARE5 proteinů na sekundární metabolismus *S. coelicolor* M145

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Bakteriální kmeny

Escherichia coli

XL1-Blue (Agilent Technologies)

Bakteriální kmen *E. coli* XL1-Blue byl v této disertační práci využit ke klonování a amplifikaci plazmidů.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]*

JM109 (Promega)

Bakteriální kmen *E. coli* JM109 byl v této práci využit ke klonování DNA a amplifikaci plazmidů.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁺ m_K⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]*

ET12567/pUZ8002 (John Innes Center, Norwich, Velká Británie)

E. coli ET12567/pUZ8002 je nemetylující kmen obsahující vektor pUZ8002, který zajišťuje mezidruhový přenos DNA pomocí konjugace. V disertační práci byl kmen použit pro vnesení plazmidů do kmenů *Streptomyces coelicolor* M1154, *Streptomyces coelicolor* M145, *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 a od nich odvozených mutant.

Genotyp: *dam-13::Tn9 dcm-6 hsdS Cm^r*

BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich)

Bakteriální kmen umožňující vysokou úroveň produkce heterologních proteinů. Kmen nese gen kódující bakteriofágovou T7 RNA polymerázu, jejíž exprese je pod kontrolou *lacUV5* promotoru. Exprese T7 RNA polymerázy je indukována pomocí IPTG.

Genotyp: *F- ompT [lon] hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)*

BL21 (DE3)/pGroESL (Sigma-Aldrich)

Bakteriální kmen umožňující vysokou úroveň produkce heterologních proteinů. Kmen nese gen kódující bakteriofágovou T7 RNA polymerázu, jejíž exprese je pod kontrolou *lacUV5* promotoru. Exprese T7 RNA polymerázy je indukována pomocí IPTG. Kmen navíc nese vektor kódující geny pro chaperoniny (GroEL (60kDa) a GroES (10kDa)). Přítomnost chaperoninů pomáhá správnému složení produkovaného proteinu. *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL byl použit pro heterologní produkci proteinu LmrC.

Genotyp: *F- ompT [lon] hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)*

Streptomyces lincolnensis ATCC 25466

Typový kmen produkující linkomycin získaný ze sbírky Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Z tohoto typového kmene byla odvozena sada delečních mutantů v rezistenčních genech z linkomycinového BGC. Odvozené kmeny použité v této disertační práci jsou uvedeny v Tab. 1 včetně grafického znázornění mutace. Kmeny byly získány pomocí metody REDIRECT PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2) (242) za využití inaktivačních kazet 773 a 775. Bakteriální kmeny byly připraveny Mgr. Markétou Koběrkou Ph.D.

Tabulka 1: Seznam delečních mutantů *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Pro zobrazení genetického kontextu připravených delečních mutantů je použita grafická reprezentace linkomycinového BGC se znázorněnou orientací připravené delecce. Biosyntetické geny jsou reprezentovány bílou barvou, regulační gen je označen žlutou barvou a rezistenční geny jsou červené.

Bakteriální kmen	Grafická reprezentace mutace
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ATCC 25466	
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ΔC (BN3001)	
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ΔB (BN3002)	
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ΔA (BN30024)	
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ΔBC (BN3008)	
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ΔAB (BN3021)	
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ΔAC (BN3018)	

Streptomyces coelicolor

M145

Typový bakteriální kmen odvozený od *Streptomyces coelicolor* A3(2) delecí plazmidů SCP1 a SCP2. V disertační práci byl tento kmen využit pro heterologní expresi rezistenčních genů z kmene *S. lincolnensis*. Dále byly z tohoto kmene odvozeny deleční mutanty v genech *tiaA* a *sco6720*.

M1154

Kmen byl odvozen z bakteriálního kmene *Streptomyces coelicolor* M145 přes delecí čtyř biosyntetických genových klastrů a zavedením dobových mutací do genů *rpoB* a *rpsL*. Kmen *S. coelicolor* M1154 vykazuje, v porovnání s mateřským kmenem, zhoršenou schopnost sporulace na pevném médiu a má sníženou pigmentaci spor (243). V disertační práci byl tento kmen využit jako citlivý hostitel pro expresi testovaných rezistenčních genů.

Genotyp: $\Delta act \Delta red \Delta cpk \Delta cda rpoB[C1298T]rpsL[A262G]$

***Kocuria rhizophila* CCM 552**

Kmen používaný jako biomarker pro testování produkce antimikrobiálních látek z důvodů jeho citlivosti k testovaným antibiotikům.

V rámci této disertační práce byly dále použity vybraní zástupci kmene *Actinobacteria* pro stanovení jejich citlivosti vůči TIA, CLI a ERY. Získané citlivosti byly propojeny s fylogenetickým stromem pro ARE5 ABCF proteiny. Tyto testované kmeny jsou uvedeny v Tab. 2.

4.1.2. Kmeny hub

***Clitopilus passeckerianus* CCBAS738**

Houba patřící mezi *Basidiomycota* produkující pleuromutilin. Kmen byl získaný ze sbírky Culture collection of Basidiomycetes (CCBAS).

***Clitopilus passeckerianus* CCBAS739**

Houba patřící mezi *Basidiomycota* produkující pleuromutilin. Kmen byl získaný ze sbírky CCBAS.

Tabulka 2: Seznam použitých kmenů z kmene *Actinobacteria*

Bakteriální kmen	Zdroj
<i>Amycolatopsis keratiniphila</i> subsp. <i>keratiniphila</i> NRRL B-24117	NRRL
<i>Kitasatospora phosalacinea</i> CCM 4152	-
<i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030	Julian Guzman
<i>Streptomyces albus</i> J1074	(244)
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC 39897	ATCC
<i>Streptomyces ambofaciens</i> OSC2	(245)
<i>Streptomyces antibioticus</i> ISP 5234	NRRL
<i>Streptomyces avermitilis</i> DSM 46492	DSZM
<i>Streptomyces catenulae</i> DSM 40258	DSZM
<i>Streptomyces caelestis</i> ATCC 15084 (DSM 40084)	DSZM
<i>Streptomyces globisporus</i> DSM 40991	DSZM
<i>Streptomyces griseoflavus</i> NRRL B-5312	NRRL
<i>Streptomyces griseoflavus</i> Tu4000	prof. Joshua A.V. Blodgetta, (Washington University in Saint Louis)
<i>Streptomyces griseus</i> CCM 3178	-
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>limoneus</i> KCTC 1717	KCTC (246)
<i>Streptomyces lividans</i> OS45.6	(247)
<i>Streptomyces niveus</i> DSM 40088	DSZM
<i>Streptomyces prasinus</i> NRRL B-12521	NRRL
<i>Streptomyces scabrissporus</i> DSM 41855	DSZM
<i>Nocardia carnea</i> CCM 2756	-
<i>Nocardiopsis prasina</i> DSM 43845	DSZM
<i>Nocardia tenerifensis</i> DSM 44704	DSZM

4.1.3. Vektory

pMS81 (6 115 bp, získáno z University of Cambridge, Velká Británie)

Integrační vektor vhodný pro práci s mnoha druhy rodu *Streptomyces*. Vložení do genomu zajišťuje integráza z bakteriofága Φ BT1. Plazmid obsahuje *oriT* pro mezidruhovou konjugaci mezi *Escherichia coli* a rodem *Streptomyces*. Vektor nese selekční marker pro rezistenci k hygromycinu (Obr. 21A); (248).

Z vektoru pMS81 byly odvozeny komplementační plazmidy pMS81 + *lmrA* (pLV012; dále značen jako A_n), pMS81 + *lmrB* (pLV013; dále značen jako B_n) a pMS81 + *lmrC* (pLV017; dále značen jako C_n) využívané pro *in trans* komplementaci delečních mutant kmene *S. lincolnensis* (Obr. 21A). Tyto komplementační plazmidy byly připraveny v rámci mého magisterského studia. Plazmidy nesou rezistenční gen včetně jeho nekódujícího regionu předcházející příslušný rezistenční gen.

pIJ10257 (6 672 bp, získáno z University of Cambridge, Velká Británie)

Integrační vektor pIJ10257 byl vytvořen vložением konstitutivního promotoru *ermE*^{*}, klonovacího (multicloning site (MCS)) a ribozom-vazebného místa (RBS) do plazmidu pMS81 (249). Vektor tedy nese gen pro integrázu z bakteriofága Φ BT1, hygromycinovou rezistenci a *oriT* zajišťující mezidruhovou konjugaci (Obr. 21B). V této dizertační práci byl vektor pIJ10257 využit k doplnění chybějících komplementačních plazmidů a přípravě vektorů zajišťující konstitutivní expresi genů *sco6720* (ARE5 ABCF) a *sco6742* (AAF1 ABCF).

Z vektoru pIJ10257 byl v rámci mé diplomové práce připraven komplementační plazmid pIJ10257 + *lmrC* (pLV018; dále značen jako C_C) zajišťující konstitutivní expresi genu *lmrC* (Obr. 21B) a dále plazmid produkující protein LmrC značený pomocí histidinové kotvy (pLV020).

pIJ6902 (4 334 bp)

pIJ6902 je integrační expresní vektor obsahující thiostreptonem indukovaný promotor *P_{tipA}* (130). Poněvadž vektor pIJ6902 využívá pro své vložení do genomu integrázu z bakteriofága Φ C31 je kompatibilní s pIJ10257, případně pMS81 (248). Dále obsahuje *oriT* zajišťující mezidruhovou konjugaci a nese gen *acc(3)IV* udílející rezistenci k apramycinu (Obr. 21C).

pUZ8002 (55 693 bp, získáno z John Innes Center, Norwich, Velká Británie)

Pomocný plazmid zajišťující přenos vektorů z donorového kmene *Escherichia coli* do recipientního kmene pomocí mezidruhové konjugace. Vektor pUZ8002 postrádá vlastní funkční *oriT* pro svůj přenos a tím zajišťuje přenos pouze plazmidům obsahujícím funkční *oriT* (250). V této práci byl plazmid pUZ8002 využit v buňkách nemetylujícího kmene *Escherichia coli* ET12567 pro přenos vektorů do kmenů *Streptomyces lincolnensis* a *Streptomyces coelicolor*. Vektor pUZ8002 nese gen pro kanamycinovou rezistenci. Dříve bylo uváděno, že pUZ8002 je derivát vektoru RK2 (RP4) s defektním *oriT*, vektor byl však pravděpodobně odvozen z plazmidu pUZ8 (251).

LK6 (46 117 bp, Laboratoř biologie sekundárního metabolismu MBÚ AVČR, v.v.i.)

Kosmid LK6 byl připraven vložением klastu pro biosyntézu linkomycinu z typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25444 (38,217 kbp) do vektoru SuperCosI (7,9 kbp, Stratagene).

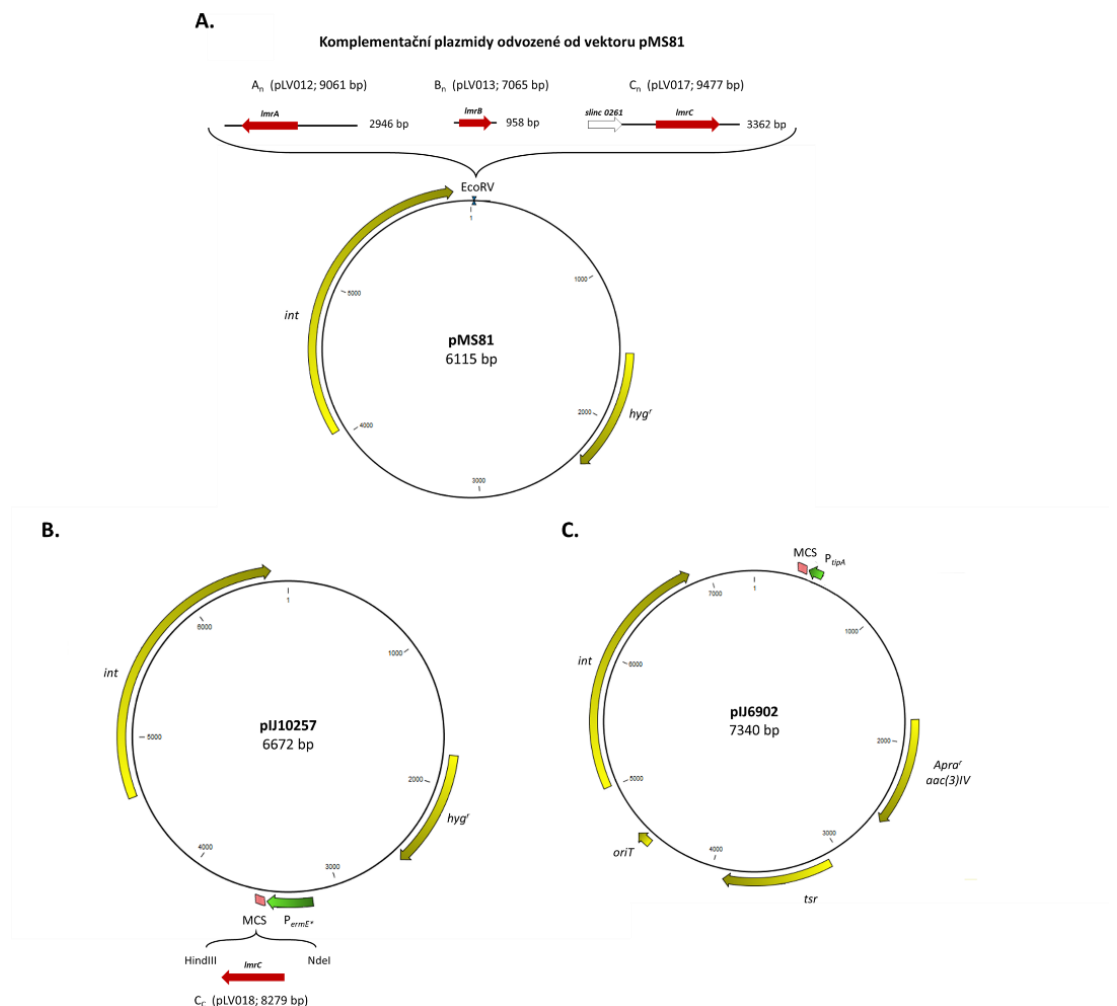
Kosmid LK6 obsahuje selekční markery pro rezistenci ke kanamycinu a karbenicilinu. Kompletní sekvence kosmidu LK6 je dostupná pod číslem EU124663 v databázi GenBank (13).

7G01 (49 511 bp, získáno ze *Streptomyces* cosmid library, Earlham Institute, Norwich, Velká Británie)

Kosmid 7G01 byl vytvořen v rámci přípravy nové kosmidové knihovny pro *Streptomyces coelicolor* M145. Pro vytvoření knihovny byl využit vektor pWEBTM (8,179 kbp, Epicentre Biotechnologies). 7G01 v sobě nese úsek genomu obsahující geny v rozmezí *sco0610–sco0647* (649 159 bp–690 490 bp). Kosmid 7G01 nese gen pro rezistenci ke karbenicilinu (252).

pET-42b(+)-lmrC (6 748 bp, vektor připraven Mgr. Jakubem Lenartem Ph.D.)

Vysokokopiový plazmid pro heterologní expresi proteinu LmrC v *E. coli*. Protein LmrC je na svém C-konci fúzován s tzv. histidinovou kotvou (6xHis) pro následnou afinitní chromatografickou purifikaci. Plazmid je odvozen z expresního vektoru pET-42b(+) a nese kanamycinovou rezistenci (Novagene).



Obrázek 21: Schématické znázornění použitých vektorů. (A) Vektor pMS81 a od něj odvozené komplementační plazmidy. (B) Vektor pIJ10257 a od něj odvozený vektor pLV018. (C) Vektor pIJ6902. Zeleně jsou znázorněny promotorové oblasti (P_{emrE^*} a P_{tipA}), růžová barva zvýrazňuje klonovací místo, žlutě jsou reprezentovány geny pro integrázu a rezistenční geny zapojené v selekci plazmidů a červeně vkládané rezistenční geny *lmrA*, *lmrB* a *lmrC*.

4.1.4. Kultivační média

Pokud není uvedeno jinak, byla všechna kultivační média připravována v destilované vodě a následně sterilizována autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

LB médium

Složení roztoku	
Trypton	10 g.dm ⁻³
Kvasničný extrakt	5 g.dm ⁻³
NaCl	10 g.dm ⁻³

pH upraveno na 7,5

LB agar

Složení roztoku	
Trypton	10 g.dm ⁻³
Kvasničný extrakt	5 g.dm ⁻³
NaCl	10 g.dm ⁻³
Agar	15 g.dm ⁻³

pH upraveno na 7,5

Doplněné LB médium (médium A)

Složení roztoku	
Trypton	10 g.dm ⁻³
Kvasničný extrakt	5 g.dm ⁻³
NaCl	10 g.dm ⁻³

Po sterilizaci v autoklávu

MgSO ₄	10 mM
(sterilizováno filtrací)	
Glukosa	0,2 % (w/v)
(sterilizováno filtrací)	

pH upraveno na 7,5

Médium pro uchovávání kompetentních buněk

Složení roztoku	
PEG (M _r = 8000)	15 mM
Glycerol	36 % (v/v)
MgSO ₄	12 mM

Připraveno v LB médiu a následně sterilizováno filtrací.

SOC médium

Složení roztoku	
Trypton	20 g.dm ⁻³
Kvasničný extrakt	5,5 g.dm ⁻³
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Po sterilizaci v autoklávu

MgSO ₄	10 mM
(sterilizováno filtrací)	
MgCl ₂	10 mM
(sterilizováno filtrací)	
Glukosa	20 mM
(sterilizováno filtrací)	

pH upraveno na 7,5

MH (Mueller-Hinton) agar

Složení roztoku	
Mueller-Hinton broth	21 g.dm ⁻³
Agar	15 g.dm ⁻³

pH neupraveno

DNA agar

Složení roztoku	
Difco™ Nutrient Agar	23 g.dm ⁻³

pH neupraveno

MS médium

Složení roztoku	
Manitol	20 g.dm ⁻³
Sójová mouka	20 g.dm ⁻³
Agar	20 g.dm ⁻³

pH neupraveno

K přípravě média použita vodovodní voda
Médium bylo autoklávováno dvakrát

GYM agar

Složení roztoku	
Kvasničný extrakt	0,4 % (w/v)
Sladový extrakt	1,0 % (w/v)
Glukóza	0,4 % (w/v)
CaCO ₃	0,2 % (w/v)
Agar	1,2 % (w/v)

pH upraveno na 7,2

AVM médium

Složení roztoku

(NH ₄) ₂ SO ₄	15 mM
Kvasničný extrakt	0,2 % (w/v)
NaCl	34 mM
K ₂ HPO ₄	0,29 mM
CaCO ₃	50 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,18 mM
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,4 mM

Po sterilizaci v autoklávu

Glukóza (sterilizováno filtrací)	3 % (w/v)
-------------------------------------	-----------

pH upraveno na 7,4

2x GM médium

Složení roztoku

Kvasničný extrakt	1 % (w/v)
Casaminoacids	1 % (w/v)

Po sterilizaci v autoklávu

CaCl ₂ (sterilizováno filtrací)	10 mM
---	-------

MM agar

Složení roztoku

L-asparagin	0,5 g.dm ⁻³
K ₂ HPO ₄	0,5 g.dm ⁻³
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3 g.dm ⁻³
FESO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 g.dm ⁻³
Agar	10 g.dm ⁻³

Po sterilizaci v autoklávu

Glukóza (sterilizováno filtrací)	10 g.dm ⁻³
-------------------------------------	-----------------------

B1 agar

Složení roztoku

Hovězí extrakt	10 g.dm ⁻³
Pepton	10 g.dm ⁻³
NaCl	5 g.dm ⁻³
Agar	20 g.dm ⁻³

YEME produkční

Složení roztoku

Kvasničný extrakt	4 g.dm ⁻³
Pepton	5 g.dm ⁻³
Sladový extrakt	10 g.dm ⁻³

pH upraveno na 7,2

2x YT médium

Složení roztoku

Trypton	16 g.dm ⁻³
Kvasničný extrakt	10 g.dm ⁻³
NaCl	5 g.dm ⁻³

pH upraveno na 7,2

Nutrient agar

Složení roztoku

Pepton	0,5 % (w/v)
Hovězí extrakt	0,3 % (w/v)
Agar	1,5 % (w/v)

BHI médium

Složení roztoku

Brain-heart infusion	20 g.dm ⁻³
----------------------	-----------------------

pH neupraveno

Malt extract agar (ME agar)

Složení roztoku

Sladový extrakt	20 g.dm ⁻³
Agar	20 g.dm ⁻³

pH neupraveno

TSA agar

Složení roztoku

Trypton Soya Broth	30 g.dm ⁻³
Agar	5 g.dm ⁻³

pH neupraveno

4.1.5. Pufry a roztoky

Fyziologický roztok

<u>Složení roztoku</u>	
NaCl	0,9 % (w/v)

Sterilizace autoklávováním (121 °C, 15 min)

TES pufr

<u>Složení roztoku</u>	
Tris-HCl	20 mM
EDTA	25 mM
NaCl	75 mM

pH upraveno na 7,5

1x TAE

<u>Složení roztoku</u>	
Tris-acetát	40 mM
EDTA	1 mM

pH upraveno na 7,5

1x SDS-PAGE pufr

<u>Složení roztoku</u>	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Coomassie – barvicí roztok

<u>Složení roztoku</u>	
Metanol	50 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1 % (w/v)
Kyselina octová	10 % (v/v)

Přenosový pufr

<u>Složení roztoku</u>	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Metanol	15 % (v/v)

pH upraveno na 6,8

1x TE⁻¹

<u>Složení roztoku</u>	
Tris-HCl	10 mM
EDTA	0,1 mM

10x DNA vzorkový pufr

<u>Složení roztoku</u>	
EDTA	100 mM
Glycerol	20 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)
Bromfenolová modř	0,25 % (v/v)

2x SDS-PAGE vzorkový pufr

<u>Složení roztoku</u>	
Tris-HCl	125 mM
SDS	2 % (w/v)
Merkaptoetanol	5 % (v/v)
Glycerol	20 % (v/v)
Bromfenolová modř	0,002 % (v/v)

pH upraveno na 6,8

Destain – odbarvovací roztok

<u>Složení roztoku</u>	
Metanol	20 % (v/v)
Kyselina octová	10 % (v/v)

Roztoky pro přípravu vzorků na SDS-PAGE

Roztok I – 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8,0)

Roztok II – 50 mM Tris-HCl, 1x inhibitor proteas (pH 8,0)

Eluční pufrы pro purifikaci proteinu LmrC

Eluční pufr A – 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1% Triton, 1 mM PEFA (pH 8,0)

Eluční pufr B – 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 1% Triton, 1 mM PEFA (pH 8,0)

Eluční pufr C – 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 mM Imidazol, 1% Triton, 1 mM PEFA (pH 8,0)

Eluční pufr D – 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1% Triton, 1 mM PEFA (pH 8,0)

Základní roztoky

5% SDS – 5 g SDS/100 ml dH₂O

2M NaOH – 8 g NaOH/100 ml dH₂O

1x PBS – 1 tbl. PBS (Phosphate Buffer Saline) DulbeccoA (Oxoid)/100 ml dH₂O

Antibiotika

Roztoky antibiotik (Tab. 3) byly využity k selekci, či stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) bakteriálních kmenů. Zásobní roztoky použitých antibiotik pro selekci bakteriálních kmenů byly připraveny 1000x koncentrované oproti finální koncentraci a sterilizovány pomocí filtrace. Uchovávány byly při teplotě -20 °C.

Tabulka 3: Seznam použitých antibiotik.

Antibiotikum	Zásobní koncentrace [mg/ml]	Rozpustnost	Firma
Apramycin	50	dH ₂ O	Duchefa Biochemie B. V
Erytromycin	10	Etanol	Duchefa Biochemie B. V
Hygromycin	40	dH ₂ O	Invitrogen™
Chloramfenikol	25	Etanol	Duchefa Biochemie B. V
Kanamycin	50	dH ₂ O	Duchefa Biochemie B. V
Karbenicilin	100	dH ₂ O	Duchefa Biochemie B. V
Klindamycin	10	dH ₂ O	Duchefa Biochemie B. V
Linkomycin	250	dH ₂ O	Sigma-Aldrich
Nalidixová kyselina	25	0,3 M NaOH	Duchefa Biochemie B. V
Pristinamycin IA	10	Metanol	-
Pristinamycin IIA	10	Metanol	-
Puromycin	10	dH ₂ O	-
Tetracyklin	10	dH ₂ O	-
Tiamulin	10	dH ₂ O	Sigma-Aldrich

4.1.6. Primery

Oligonukleotidy použité v této práci byly syntetizovány společnostmi Sigma-Aldrich a Eurofins Genomics. Lyofilizované primery byly resuspendovány ve sterilní destilované vodě (dH₂O) na finální koncentraci 100 μM (100 pmol.μl⁻¹). Seznam použitých oligonukleotidů včetně jejich použití je uveden v Tab. 4.

4.1.7. Komerční soupravy a standardy

Izolace plazmidové DNA

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

NucleoBond[®] Xtra Midi/Maxi (Maherey-Nagel)

Izolace genomové DNA

Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega)

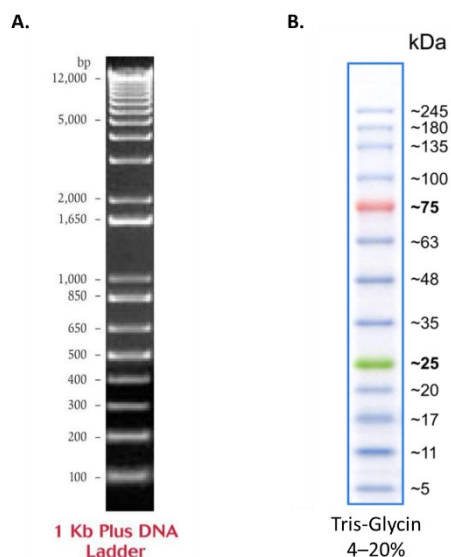
Izolace DNA z agarosového gelu a přečištění PCR produktu

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Standardy molekulové hmotnosti

1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) – Standard molekulové hmotnosti pro DNA agarosovou elektroforézu obsahuje 20 fragmentů v rozmezí velikostí 100 bp – 12 000 bp (Obr. 22A). Marker může být použit pro přibližné stanovení koncentrace DNA ve vzorku. Před použitím byl marker naředěn do pracovního roztoku (100 μl 1 kb Plus DNA ladder, 100 μl 10x DNA vzorkového pufru, 800 μl TE⁻¹ pufru), který byl nanášen v objemu 5 μl na agarosový gel.

BlueElf Prestained Protein Marker (Jena Bioscience) – Standard molekulové hmotnosti pro proteinovou SDS-PAGE elektroforézu obsahující 13 purifikovaných proteinů v rozmezí molekulární hmotností 5–254 kDa (Obr. 22B). Dle doporučení výrobce, proteinový marker byl použit v objemu 5 μl na jamku polyakrylamidového gelu.



Obrázek 22: Použité standardy molekulárních hmotností. (A) 1 Kb Plus DNA ladder (převzato a upraveno z <https://www.yumpu.com/en/document/view/9205264/lam-marker-card-10-08-invitrogen>). (B) BlueElf Prestained Protein Marker (převzato a upraveno z www.jenabioscience.com/images/PDF/PS-105.pdf).

4.1.8. Protilátky a detekční systém pro Western blot

Primární protilátky

Specifická králičí polyklonální protilátka proti proteinu LmrC (GenScript USA, Inc.)

Specifická protilátka proti ribozomálnímu proteinu S7 (Mee-Ngan F. Yap (253)).

Sekundární protilátky

Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-rabbit (H+L) (Invitrogen) – kozí polyklonální protilátka konjugována s křenovou peroxidázou proti králičím protilátkám (IgG)

Substrát pro křenovou peroxidázu sekundární protilátky

Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck)

Tabulka 4: Seznam použitých primerů. Restriční místa použita pro inzerce do vektoru jsou podtržena. Použitá označení: LV – Mgr. Ludmila Veselá, GBN – Mgr. Gabriela Balíková Novotná Ph.D., NP – Mgr. Nikola Pindřáková

Název	Sekvence (5' → 3')	Použití	Navrženo
LmrAForpIJ10257	GATCC <u>CATATG</u> TCTGTCTTCGCTCGTGCCAC	Amplifikace genu <i>lmrA</i> s přidanými restričními místy (NdeI a HindIII) pro vložení genu do vektoru pIJ10257	LV
LmrARevplIJ10257	GTTAA <u>AAGCTT</u> TTCAGTCCTCCTGCTCCCGGG		LV
LmrBForpIJ10257	GTTTC <u>CATATG</u> CCCAGCCGATACGGCAG	Amplifikace genu <i>lmrB</i> s přidanými restričními místy (NdeI a HindIII) pro vložení genu do vektoru pIJ10257	LV
LmrBRevplIJ10257	GTTTA <u>AAGCTT</u> TTCAGCCGCTGTTGCGCCGCG		LV
ermLmrCpIJ6902F	CAAAGAATTCCGGTACCAGCCCCGACCCGA	Amplifikace genu <i>lmrC</i> včetně promotoru <i>ermE*</i> s přidanými restričními místy (EcoRI a BglII) pro vložení genu do vektoru pIJ6902	LV
ermLmrCpIJ6902R	CCAAAGATCTTCACTTATCCCGATGAGG		LV
SLI_7152_pIJ_F	CCCC <u>CATATG</u> TCCCTGTCCATCACCTGCAC	Amplifikace genu <i>slinc7152</i> s přidanými restričními místy (NdeI a HindIII) pro vložení genu do vektoru pIJ10257	LV
SLI_7152_pIJ_R	CAAAA <u>AAGCTT</u> CTAGGCGGGATACCCGACAGCCTC		LV
Sco6720pIJFW	AAACA <u>AAGCTT</u> CTAGGCGGAATACCCG	Amplifikace genu <i>sco6720</i> s přidanými restričními místy (NdeI a HindIII) pro vložení genu do vektoru pIJ10257	LV
Sco6720pIJREV	CCTT <u>CATATG</u> TCTACTTCCCCACTTCTCTC		LV
Sco6742pIJFW	CAAAC <u>CATATG</u> ACTGCCACCCTCGTCGC	Amplifikace genu <i>sco6742</i> s přidanými restričními místy (NdeI a HindIII) pro vložení genu do vektoru pIJ10257	LV
Sco6742pIJREV	AATTA <u>AAGCTT</u> CTACGTGCGTCCACCAC		NP
LmrC_G499C_For	GCTGATCCTCGACCAACCCACCAACAACC	Místně specifická mutageneze genu <i>lmrC</i> (G499C)	LV
LmrC_G499C_Rev	GGTTGTTGGTGGGTTGGTCGAGGATCAGC		LV
LmrC_G1453C_For	CTCCTGCTGGACCAGCCGACGAACAAC	Místně specifická mutageneze genu <i>lmrC</i> (G1453C)	LV
LmrC_G1453C_Rev	GTTGTTGCTCGGCTGGTCCAGCAGGAG		LV
testpIJ10257FWnew	TTGAAAACGCTCACTGGTAC	Testovací primery pro ověření připravených konstruktů ve vektoru pIJ10257 (sekvenace, koloniová PCR)	LV
testpIJ10257REV	CGAGCTGAAGAAAGACAATC		GBN
testpIJ6902FW	CTATTCTCACTCCGCTGAAAC	Testovací primery pro ověření připravených konstruktů ve vektoru pIJ6902 (sekvenace, koloniová PCR)	LV
testpIJ6902REV	AGATGGAGTTCTGAGGTCATTA		LV
Complet upstream_RT_REV	GAGAAGGACAGGTCGGAGCA	Primery pro RT-PCR analýzu okolí genu <i>tiaA</i>	LV
Complet upstream_RT_FW	GGTGGGTGACGACGACATCT		LV

4.1.9. Enzymy

Restrikční endonukleázy (New England BioLabs (NEB))

NdeI
HindIII – HF
BglII
EcoRI – HF
DpnI
BamHI – HF
SalI
XbaI
EcoRV – HF
PstI

DNA polymerázy

Taq-Purple DNA polymeráza (Top-Bio)
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB)

Ostatní

T4 DNA ligasa (NEB)
Lysozym (Sigma-Aldrich)
Turbo DNase I (Invitrogen)
M-MuLV RT (NEB)

4.1.10. Bioinformatické nástroje

4.1.10.1. Software a internetové aplikace

BioRender – internetový nástroj pro tvorbu vědeckých ilustrací (<https://www.biorender.com>).

BLAST – Nástroj pro vyhledávání homologních sekvencí využívající zvolenou anotovanou databázi (např. GenBank, NCBI Reference Sequence project).

CLC Main Workbench 6.8.1 – software pro analýzu a vizualizaci sekvencí.

Igor Pro 6.3. – software pro analýzu a vizualizaci naměřených dat.

iTOL v6.9 – nástroj pro zobrazení a úpravu fylogenetických stromů (<https://itol.embl.de>);(254) .

MAFFT version 7.526 – program pro vícenásobné sekvenční přiložení (sequence alignment) aminokyselinových, či nukleotidových sekvencí (255).

MassLynx v.4.1 – program pro vyhodnocení dat z LC-MS analýzy.

Mendeley 1.19. 8 – program pro správu vědeckých publikací a tvorbu citací.

ModelTest-NG v0.1.7 – nástroj pro výběr nejlepšího modelu pro fylogenetickou analýzu (256).

OligoAnalyzer™ – Nástroj pro analýzu a charakterizaci oligonukleotidů včetně predikce sekundárních struktur a tvorby dimerů (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Operon mapper – nástroj pro predikci operonů (https://biocomputo.ibt.unam.mx/operon_mapper) (257).

PASIFIC – nástroj pro predikci alternativních struktur mRNA potenciálně zapojených v cis-regulaci genové exprese (<https://www.weizmann.ac.il/molgen/Sorek/PASIFIC>); (258).

RAxML-NG v.1.2.2 – program pro fylogenetickou analýzu velkých souborů dat (259).

TrimAl v1.4.rev15 – nástroj pro automatické ořezání vícenásobných sekvenčních zarovnání (260).

uORF4u – Nástroj pro analýzu 5' nepřekládané oblasti a predikci uORF zapojených v regulaci exprese testovaného proteinu (<https://server.atkinson-lab.com/uorf4u>); (261).

WebFlaGs – Nástroj pro analýzu konzervovanosti genomového okolí zájmového genu (262).

CHROMuLAN v0.91 – program pro sběr a analýzu spektrofotometrických dat.

4.1.10.2. Databáze

GenBank – databáze sekvencí (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

StrepDB – databáze obsahující seznam dostupných kosmidů pro kmen *S. coelicolor* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>).

Codon Usage Database – databáze obsahující druhově specifickou frekvenci výskytu jednotlivých kodónů (<https://www.kazusa.or.jp/codon>).

4.1.10.3. Použité chemikálie

Použité chemikálie v rámci této práce byly látky analytické čistoty, běžně dostupné na území České republiky. Seznam použitých chemikálií je uveden v Tab. 5.

Tabulka 5: Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Zkratka	Výrobce
40% Akrylamid/Bisakrylamid (37.5:1)	-	Merck
Adenosin trifosfát	ATP	Fermentas
Agaróza (elektroforéza)	-	Lonza
Albumin hovězího séra	BSA	NEB
Bakteriologický agar	-	Oxoid
Blotting-Grade Blocker	-	Bio-Rad
Bromfenolová modř	-	Bio-Rad
Deoxyadenosin trifosfát	dATP	NEB
Deoxycytidin trifosfát	dCTP	NEB
Deoxyguanosin trifosfát	dGTP	NEB
Deoxythymidin trifosfát	dTTP	NEB
Difco TM Nutrient Agar	DNA	BD
Dimetylsulfoxid	DMSO	NEB; Top-Bio
Dodecylsírán sodný	SDS	Sigma-Aldrich
Ethidium bromid	EtBr	Sigma-Aldrich
Glukóza	Glu	Lach-Ner

Glycerol	-	Lach-Ner
Glycin	-	Lachema
Heptahydrát síranu hořečnatého	MgSO ₄ · 7H ₂ O	AppliChem
Heptahydrát síranu manganatého	MnSO ₄ · 7H ₂ O	Merck
Heptahydrát síranu železnatého	FeSO ₄ · 7H ₂ O	Lach-Ner
Hovězí extrakt	-	BD
Hydrogenfosforečnan draselný	K ₂ HPO ₄	AppliChem
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner
Chlorid draselný	KCl	Lachema
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Imidazol		
Isopropanol	-	Lachema
Kvasničný extrakt	-	Oxoid
Kyselina etylendiamintetraoctová	EDTA	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková	HCl	Lach-Ner
Kyselina octová	CH ₃ COOH	Lach-Ner
Manitol	-	AppliChem
Merkaptoetanol	-	Serva
Metanol	MetOH	Lachema
Müller-Hinton broth	-	Oxoid
N, N, N', N' – tetramethylethylendiamin	TEMED	AppliChem
Nonidet P-40 oktylfenoxypolyethoxyethanol	NONIDET	Amresco
Octan draselný	CH ₃ COOK	Lach-Ner
Pepton	-	BD
Peroxodisíran amonný	APS	ICN Biomedicals
Phosphate buffered saline	PBS	Oxoid
Polyethylen glykol (M _r = 8000)	PEG	Sigma-Aldrich
Protease inhibitor cocktail tablets	-	Roche
Sacharóza	-	Lach-Ner
Síran amonný	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Síran hořečnatý	MgSO ₄	Lachema
Sladový extrakt	-	Oxoid
Sójová mouka	-	Paleta
Tris(hydroxymetyl)aminomethan	Tris	Fluka analytical
Trypton	-	BD
Uhličitan vápenatý	CaCO ₃	AppliChem

4.2. Metody

4.2.1. Podmínky kultivace a následného uschování mikrobiálních kultur

4.2.1.1. Kultivace a uchování kmenů *Escherichia coli*

Rutinní kultivace kmenů *E. coli* probíhala přes noc (16–18 hodin) při 37 °C na pevné půdě (LB agar), nebo v tekutém médiu (LB médium, SOC médium). Pro okysličení kultury byla tekutá média třepána při 200 RPM (otáček za min). Pro selekci buněk nesoucích vektor bylo do média přidáno příslušné antibiotikum. Pro dlouhodobé uchování byly kmeny *E. coli* setřeny z pevného média do 20% glycerolu připraveného v LB médiu a uchovány při -80 °C. Pro krátkodobé uschování byly narostlé kultury uchovávány na Petriho miskách obalené parafilmem při 4 °C.

4.2.1.2. Kultivace a uchování bakterií kmene *Actinobacteria*

Kultivace

Kultivace bakterií rodu *Streptomyces lincolnensis* a *Streptomyces coelicolor* probíhala na pevné půdě (MS agar, DNA agar, MH agar), či v tekutém médiu (YEME médium, AVM médium) při teplotě 30 °C. Doba kultivace byla závislá na použitém médiu. Na DNA agaru byly kultury kultivovány po dobu 1–4 dnů. Kultivace na MS agaru byla ovlivněna rychlostí sporulace rostoucích kmenů a průměrně se pohybovala v rozmezí 4-7 dnů. MH agar byl využíván při testování fenotypů kmenů a délka kultivace, která probíhala v rozmezí 3-11 dnů, byla ovlivněna příslušným typem experimentu. Tekuté médium bylo kultivováno při 220 RPM po dobu 24–48 hodin. Pro zajištění disperzního růstu v tekutém médiu byly použity buď prolamované Erlenmayerovy baňky nebo kovové pružiny. Pro inokulaci tekutého média byly používány naklíčené spory (viz Germinace spor).

Kultivace kmenů *Micrococcus luteus* DSM 20030 a *Kocuria rhizophila* CCM 552 probíhaly na pevném médiu. Kmen *M. luteus* DSM 20030 byl kultivován na nutrient agaru při 37 °C přes noc (kolem 24 hod) a *K. rhizophila* CCM 552 na B1 agaru při 37 °C přes noc (16–18 hod). Oba kmeny byly uchovány ve stejných podmínkách jako kmeny *E. coli*.

Ostatní použité kmeny byly kultivovány na pevném médiu (MS agar, GYM agar) při 30 °C po dobu 4-7 dnů. Použitá média pro jednotlivé kmeny jsou uvedena v Tab. 6. Zásobní sporové suspenze byly připraveny stejným způsobem jako pro kmeny *S. lincolnensis* a *S. coelicolor*.

Příprava sporové suspenze

Krátkodobé uchování kmenů probíhalo na pevném médiu při 4 °C jako v případě kmenů *E. coli*. Pro dlouhodobé uschování byly připraveny zásobní sporové suspenze (141). Spory byly setřeny sterilním vatovým tamponem z vysporulované kultury na MS agaru po 4–7 dnech kultivace při 30 °C a resuspendovány ve sterilní destilované vodě. K oddělení spor od zbylých nečistot, jakými jsou zbytky agaru, byla suspenze přefiltrována přes sterilní vatový filtr. Spory byly peletovány pomocí centrifugace (1 500 g, 15 min, 4 °C). Pelet byl resuspendován ve 20% glycerolu. Vzniklá sporová suspenze byla rozdělena do alikvót o objemu 50 µl. Vzniklé zásobní sporové suspenze byly uchovávány při -80 °C.

Germinace spor

Germinace spor byla provedena dle publikovaného protokolu (141). Objem zásobní sporové suspenze nutné pro inokulaci média na $OD_{450} \approx 0.03-0.05$ byl centrifugován (1 500 g, 15 min, 4 °C) pro odstranění glycerolu, který by mohl snížit životaschopnost spor při jejich zahřátí. Spory byly resuspendovány v TES pufru a následně inkubovány při 50 °C po dobu 10 min pro indukci klíčení spor. Ke sporám bylo následně přidáno stejné množství 2x GM média o pokojové teplotě (RT). Suspenze byla inkubována při 37 °C (300 RPM) po dobu 2-3 hodin. Naklíčené spory byly použity jako inokulum.

Tabulka 6: Použitá média pro vybrané zástupce kmene *Actinobacteria*

Kmen	Médium
<i>Amycolatopsis keratiniphila</i> subsp. <i>keratiniphila</i> NRRL B-24117	GYM agar
<i>Kitasatospora phosalacinea</i> CCM 4152	MS agar, GYM agar
<i>Streptomyces albus</i> J1074	GYM agar
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC 39897	MS agar, GYM agar
<i>Streptomyces ambofaciens</i> OSC2	MS agar
<i>Streptomyces antibioticus</i> ISP 5234	GYM agar
<i>Streptomyces avermitilis</i> DSM 46492	GYM agar
<i>Streptomyces catenulae</i> DSM 40258	MS agar
<i>Streptomyces caelestis</i> ATCC 15084 (DSM 40084)	MS agar
<i>Streptomyces globisporus</i> DSM 40991	MS agar
<i>Streptomyces griseoflavus</i> NRRL B-5312	GYM agar
<i>Streptomyces griseoflavus</i> Tu4000	MS agar
<i>Streptomyces griseus</i> CCM 3178	MS agar
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>limoneus</i> KCTC 1717	GYM agar
<i>Streptomyces lividans</i> OS45.6	MS agar
<i>Streptomyces niveus</i> DSM 40088	MS agar
<i>Streptomyces prasinus</i> NRRL B-12521	GYM agar
<i>Streptomyces scabrissporus</i> DSM 41855	GYM agar
<i>Nocardiosis prasina</i> DSM 43845	MS agar
<i>Nocardia carnea</i> CCM 2756	MS agar
<i>Nocardia tenerifensis</i> DSM 44704	MS agar

4.2.1.3. Kultivace *Clitopilus passeckerianus*

Kultivace kmenů *Clitopilus passeckerianus* probíhala na TSA nebo Malt extract agaru (ME) při teplotě 28 °C. Kmeny byly uchovávány na zparafilmovaných Petriho miskách s ME agarem při 4 °C a pravidelně přeočkovávány.

4.2.2. Transformace bakteriálních kmenů *Escherichia coli*

Cílem transformace je vnesení exogenní DNA do buňky. Pro úspěšné přijetí této cizorodé DNA se recipientní buňky musí nacházet ve stavu tzv. kompetence. U kmenů *E. coli* lze tento stav navodit uměle kultivací v médiu obsahující Ca^{2+} , či Mg^{2+} ionty do exponenciální fáze růstu. K zvýšení úspěšnosti transformace přispívá také přítomnost glukózy v kultivačním médiu. V této práci byla použita transformace tepelným šokem a elektroporace.

4.2.2.1. Transformace tepelným šokem

Transformace tepelným šokem byla použita k propagaci plazmidů a transformaci ligační směsi při přípravě nových vektorů. Využívány byly kmeny *E. coli* XL1-Blue a *E. coli* JM109. Příprava kompetentních buněk pro transformaci tepelným šokem vychází z dříve publikovaného protokolu (263).

Při přípravě kompetentních buněk byl používán předchlazený materiál a buňky byly drženy v chladu. Zvýšení teploty vedlo ke snížení efektivity transformace. Zároveň s nimi bylo manipulováno šetrně, neboť jsou citlivé na mechanické poškození (263).

Příprava kompetentních buněk

1. Příprava inokula
 - Kolonie získaná ze zásobní buněčné suspenze byla zaočkována do 5 ml LB média. Při kultivaci kmenu *E. coli* XL1-Blue byl do média přidán tetracyklín o konečné koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
 - Buněčná suspenze byla kultivována přes noc při 37°C a 200 RPM.
2. Kultivace buněk
 - Do doplněného LB média (médiu A), které bylo předem vytemperované na teplotu 37°C , o objemu 100 ml byl přidán 1 ml přes noc narostlé kultury. Pro kmen *E. coli* XL1-Blue bylo médium doplněno tetracyklinem na finální koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
 - Buněčná suspenze byla kultivována při 37°C a 200 RPM do dosažení OD_{600} (optické denzity) $\approx 0,4$.
3. Promytí buněk a příprava alikvót
 - Po dosažení požadované OD_{600} byla kultura chlazená na ledu po dobu 10 minut.
 - Buněčná suspenze byla centrifugována (1 500 g, 15 min, 4°C) a vzniklý buněčný pelet byl šetrně resuspendován v 1 ml vychlazeného média A.
 - Vzniklá homogenní buněčná suspenze byla naředěna 5 ml vychlazeného Média pro uchovávání kompetentních buněk a rozdělena do alikvót o objemu 100 μL .
 - Kompetentní buňky byly buď okamžitě použity k transformaci, nebo uschovány při -80°C .

Transformace

1. Inkubace kompetentních buněk s vnášenou DNA
 - K alikvótě kompetentních buněk byla přidána plazmidová DNA (50–100 ng), nebo ligační směs (1–15 µl). Pokud byly použity zamražené kompetentní buňky, nechaly se před přidáním DNA rozpustit na ledu.
 - Komponenty byly promíchány poklepem.
 - Buněčná suspenze byla inkubována na ledu po dobu 25–30 minut, aby došlo k adhezi vnášené DNA na povrch buněk.
2. Teplotní šok
 - Transformační směs byla vystavena teplotnímu šoku (42 °C, 1 min).
 - Buněčná suspenze byla zchlazena na ledu po dobu 2 minut.
3. Exprese rezistenčního fenotypu a kultivace
 - K buňkám bylo přidáno 800 µl SOC média.
 - Suspenze byla kultivována (37 °C, 200 RPM) bez selekčních antibiotik, aby došlo k expresi plazmidem kódované rezistence, po dobu 1 hodiny.
 - Kultura byla vyseta na LB agar s přidavkem příslušného selekčního antibiotika a inkubována při 37 °C přes noc.

4.2.2.2. Transformace elektroporací

Tato metoda je většinou účinnější než transformace tepelným šokem, neboť je založena na principu vzniku přechodných pórů v membráně elektrickým pulzem. V této práci byla hlavně využívána k vnášení plazmidů do kmene *E. coli* ET12567/pUZ8002. Takto připravené kmeny byly následně použity pro mezidruhovou konjugaci. Dále je nepostradatelná pro transformaci velkých DNA molekul jako jsou kosmidy LK6 a 7G01. Využívána byla také pro transformaci ligační směsi při přípravě nových plazmidů.

Příprava kompetentních buněk

1. Příprava inokula
 - Kolonie získaná ze zásobní buněčné suspenze byla zaočkována do 5 ml LB média. Dle použitého kmene bylo médium doplněno antibiotiky – pro kmen *E. coli* XL1-Blue byl přidán tetracyklín (10 µg.ml⁻¹), pro kmen *E. coli* ET12567/pUZ8002 byl přidán CAM a kanamycin (KAN), oba ve finální koncentraci 25 µg.ml⁻¹.
 - Buněčná suspenze byla kultivována přes noc při 37 °C a 200 RPM.
2. Kultivace buněk
 - K zaočkování 10 ml SOC média bylo použito 100 µl připraveného inokula.
 - Buněčná suspenze byla kultivována při 37 °C a 200 RPM do dosažení OD₆₀₀ ≈ 0,4.

3. Promytí buněk a příprava alikvót

- Po dosažení požadované OD_{600} byla kultura chlazená na ledu po dobu 10 minut. Dále byly buňky chlazeny.
- Buněčná suspenze byla centrifugována (1 500 g, 10 min, 4 °C) a vzniklý buněčný pelet byl dvakrát promyt 20 ml vychlazeného 10% glycerolu.
- Buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml vychlazeného 10% glycerolu a rozdělen do alikvót o objemu 25 μ L.
- Kompetentní buňky byly buď okamžitě použity k transformaci, nebo uschovány při -80 °C.

Transformace

1. Inkubace kompetentních buněk s DNA

- K alikvótě kompetentních buněk byla přidána vnášená DNA (minimálně 100 ng) v maximálním objemu 2 μ l.
- Suspenze byla opatrně promíchána poklepem na mikrozkuhavku.
- Transformační směs byla inkubována na ledu po dobu 20 minut, aby došlo k adhezi DNA na povrch buněk.
- Suspenze byla přenesena do vychlazených elektroporačních kyvet. Případné vzduchové bubliny byly odstraněny poklepem na kyvetu.

2. Elektrický pulz

- Pro elektrický pulz byl použit MicroPulser Electroporator (BIO-RAD).
- Podmínky elektroporace byly zvoleny dle manuálu výrobce v závislosti na typu použité kyvety (0,1 cm, nebo 0,2 cm) – program Ec1 (18 kV/cm), nebo Ec2 (12,5 kV/cm).

3. Expres rezistenčního fenotypu a kultivace

- Okamžitě po elektrickém pulzu byl k buněčné suspenzi přidán 1 ml vychlazeného LB média. Při delší prodlevě dochází k snížení účinnosti transformace.
- Inokulum bylo kultivováno (37 °C, 200 RPM) pro expresi rezistenčního fenotypu po dobu 1 hodiny.
- Kultura byla vyseta na LB agar doplněný o příslušné selekční antibiotikum a inkubována přes noc při 37 °C.

4.2.3. Meziidruhov^á konjugace

V této práci byla pro přenos plazmidové DNA do rodu *Streptomyces* využita meziidruhov^á konjugace, která je účinnější než transformace protoplastů. Jako donorový kmen byl použit nemetylující kmen *E. coli* ET12567/pUZ8002, který obchází restriční systém akceptorového kmene a tím zvyšuje účinnost konjugace (264).

1. Příprava donorového kmene

- Plazmidová DNA určená pro přenos do kmenů *S. lincolnensis*, *S. coelicolor* M145 a *S. coelicolor* M1154 a od nich odvozených kmenů byla elektroporací vnesena do buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002.
- Transformované buňky byly vysety na LB agar se selekčními antibiotiky (25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CAM pro selekci *dam* mutace, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ KAN pro selekci plazmidu pUZ8002 a antibiotikum pro udržení přenášeného plazmidu).
- Kultivace probíhala při teplotě 37 °C po dobu 16–18 hodin.
- Do 10 ml LB média doplněného o 0,1% glukózu byla zaočkována kolonie získaná po transformaci vnášeného plazmidu do kmene *E. coli* ET12567/pUZ8002. Kultivace probíhala při 37 °C a 200 RPM přes noc. Kvůli ztrátě rezistence bylo pracováno v triplikátech.
- Do čerstvého LB média doplněného o glukózu a selekční antibiotika (viz předchozí bod) o objemu 10 ml bylo přeneseno 100 μl přes noc narostlého inokula.
- Kultura byla kultivována při 37 °C (200 RPM) do dosažení $\text{OD}_{600} \approx 0,4$.
- Po dosažení požadované OD_{600} byla buněčná kultura stočena (1 500 g, 15 min, 4 °C) a promyta pro odstranění antibiotik, která by mohla inhibovat růst akceptorového kmene. Výsledný buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml LB média.

2. Příprava akceptorového kmene

- V průběhu promývání donorového kmene bylo 10 μl sporové suspenze akceptorového kmene přeneseno do 500 μl YT média a inkubováno při 50 °C po dobu 10 minut za účelem indukce klíčení spor.

3. Konjugace na MS agaru

- Zchladlá sporová suspenze akceptorového kmene byla smíchána s 500 μl promyté kultury kmene *E. coli*. Vzniklá směsná kultura byla okamžitě stočena (13 000 g, 1 min, RT).
- Pelet tvořený sporami a buňkami *E. coli* byl resuspendován ve zbylém médiu, které zůstalo po odstranění supernatantu, a zaočkováno na MS agar s přísadkou 10 mM MgCl_2 .
- Inkubace probíhala přes noc při 30 °C po dobu 16–20 hodin.

4. Selektivní kultivace transkonjugantů

- MS agar byl převrstven 1 ml sterilní dH_2O doplněné o nalidixovou kyselinu (25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) zajišťující inhibici růstu kmene *E. coli* a antibiotikem pro selekci přenášeného plazmidu.
- Miska byla dále kultivována při 30 °C dalších 5 dnů.
- Narostlé kolonie byly přeočkovány na čerstvý MS agar obsahující příslušná selekční antibiotika pro potvrzení úspěšného vnesení plazmidu do akceptorového kmene.

4.2.4. Metody práce s DNA

4.2.4.1. DNA elektroforéza v agarosovém gelu

Pro separaci nukleových kyselin byla použita horizontální elektroforéza v 1% (w/v) agarosovém gelu připraveném v 1x TAE pufru. Elektroforéza probíhala při stálém napětí 3–5 V/cm v 1x TAE pufru. Pro vizualizaci DNA pod UV světlem byl použit 0,005% (w/v) ethidium bromid (EtBr) přidáný do gelu. Analyzované vzorky byly před nanesením na gel smíchány s 10x DNA vzorkovým pufrům. Jako standard byl použit 1Kb Plus DNA ladder v objemu 5 μ l.

4.2.4.2. Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu

Pro purifikaci DNA fragmentu určité velikosti z agarosového gelu byla použita komerční souprava Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Stejný kit byl využit také k přečistění PCR a restrikčních reakcí.

Po rozdělení vzorku DNA elektroforézou byl požadovaný DNA fragment manuálně vyříznut z agarosového gelu pod UV světlem. Následovala extrakce DNA z gelu podle manuálu výrobce.

4.2.4.3. Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byly využity dvě komerční soupravy: Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) a NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel), které se lišily svým využitím. NucleoBond® Xtra Midi/Maxi byl používán v případech, kdy bylo potřeba docílit vyšších koncentrací izolovaných plazmidů pro jejich dlouhodobé uchování a pro izolaci kosmidů. Vstupní objem kultury pro následnou izolaci bylo 100 ml.

Pro ostatní účely byl využíván Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Vstupní objem kultury pro izolaci tímto kitem byl pouze 5 ml. V obou případech purifikace plazmidové DNA bylo postupováno dle příslušného protokolu výrobce.

4.2.4.4. Izolace chromozomální DNA

Pro izolaci genomové DNA (gDNA) kmenů *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 a *Streptomyces coelicolor* M145 byla použita komerčně dostupná izolační souprava Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Izolace gDNA byla provedena podle manuálu výrobce a získané vzorky sloužily jako templáty pro amplifikaci genů *sco6720*, *sco6742* a *slinc7152* pomocí PCR.

Bakteriální kultura byla pěstována v YEME médiu o objemu 15 ml a následně byla centrifugována (13 000 g, 1 min, RT). Získaný pelet byl resuspendován v 480 μ l 50 mM EDTA a 120 μ l lysozymu (10 mg.ml⁻¹). Po inkubaci při 37 °C po dobu 60 minut za účelem rozrušení buněčné stěny byla provedena lyze buněk, následovaná štěpením RNA pomocí RNázy A. Poté byly vysráženy proteiny, které byly odstraněny centrifugací (16 000 g, 3 min, RT). Genomová DNA byla ze získaného supernatantu precipitována alkoholem a rehydratována ve 100 μ l dH₂O.

4.2.4.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Při přípravě komplementačních plazmidů a vektorů pro konstitutivní expresi testovaných genů byla použita PCR reakce, při které došlo k amplifikaci požadovaného genu a přidání restrikčních míst. Pro tyto reakce byla, z důvodu její nízké chybovosti, použita polymeráza Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). Kvůli vysokému podílu GC páru v templatové DNA byl u této polymerázy využíván komerčně připravený pufr optimalizovaný pro tento typ templatů. Dále byla tato metoda použita pro ověření úspěšnosti ligace. U ověřovací PCR reakce byla využita polymeráza Taq-Purple DNA polymeráza (1 U.μl⁻¹; Top-Bio).

Amplifikace genu *lmrA*

Pro amplifikaci genu *lmrA* byly využity primery LmrAForpIJ10257 a LmrAREvpIJ10257 (Tab. 4). Podmínky reakce a složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 7 a Tab. 8. Objem reakce byl 50 μl. Úspěšnost PCR reakce byla následně ověřena pomocí DNA elektroforézy.

Tabulka 7: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genů *lmrA* a *lmrB* – Složení reakční směsi.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
5x GC pufr	10,0 μl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U.μl ⁻¹)	0,5 μl
Templatová DNA - LK6 (c = 740 ng.μl ⁻¹)	0,5 μl
100 μM Primery	á 0,5 μl
10 mM dNTP	1,0 μl
100% DMSO	2,5 μl
dH ₂ O	34,5 μl

Tabulka 8: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genu *lmrA* – Podmínky PCR reakce.

Teplota	Čas	Fáze reakce	Počet cyklů
98 °C	1 min	Úvodní denaturace	1
98 °C	10 s	Denaturace	
70 °C	30 s	Nasedání primerů	35
72 °C	45 s	Extenze	
72 °C	10 min	Finální extenze	1
4 °C	∞	Chlazení	

Amplifikace genu *lmrB*

Pro amplifikaci genu *lmrB* bylo použito stejné složení reakční směsi jako u PCR reakce určené pro amplifikaci genu *lmrA* (Tab. 7). Podmínky reakce se mírně lišily (Tab. 9). Pro amplifikaci byly využity primery LmrBForpIJ10257 a LmrBRevpiIJ10257 (Tab. 4). Úspěšnost PCR reakce byla také následně ověřena pomocí DNA elektroforézy.

Tabulka 9: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genu *lmrB* – Podmínky PCR reakce.

Teplota	Čas	Fáze reakce	Počet cyklů
98 °C	1 min	Úvodní denaturace	1
98 °C	10 s	Denaturace	35
70 °C	30 s	Nasedání primerů	
72 °C	60 s	Extenze	
72 °C	10 min	Finální extenze	1
4 °C	∞	Chlazení	

Amplifikace genu *lmrC* s promotorovou oblastí *ermE**

Pro amplifikaci genu *lmrC* s promotorovou oblastí *ermE** z plazmidu pLV018 byly využity primery ermLmrCpIJ6902F a ermLmrCpIJ6902R (Tab. 4). Použité podmínky a složení reakční směsi pro tuto reakci je uvedeno v Tab. 10 a Tab. 11. Objem reakce byl 50 μ l. Úspěšnost PCR reakce byla následně ověřena pomocí DNA elektroforézy.

Tabulka 10: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genu *lmrC* s promotorovou oblastí *ermE – Složení reakční směsi.**

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
5x GC pufr	10,0 μ l
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U. μ l ⁻¹)	0,5 μ l
Templátová DNA – pLV018	0,5 μ l
100 μ M Primery	á 0,5 μ l
10 mM dNTP	1,0 μ l
dH ₂ O	37 μ l

Tabulka 11: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genu *lmrC* s promotorovou oblastí *ermE – Podmínky PCR reakce.**

Teplota	Čas	Fáze reakce	Počet cyklů
98 °C	1 min	Úvodní denaturace	1
98 °C	30 s	Denaturace	35
60 °C	30 s	Nasedání primerů	
72 °C	90 s	Extenze	
72 °C	10 min	Finální extenze	1
4 °C	∞	Chlazení	

Amplifikace genu *sco6720*

Pro amplifikaci genu *sco6720* byly využity primery Sco6720pIJFW a Sco6720pIJREV (Tab. 4). Jako templátová DNA byla v této reakci použita genomová DNA (gDNA) vyizolovaná z bakterie *S. coelicolor* M145. Podmínky PCR reakce a složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 12 a Tab. 13. Objem reakce byl 50,5 μ l. Úspěšnost PCR reakce byla následně ověřena pomocí DNA elektroforézy.

Tabulka 12: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genů *sco6720* a *sco6742* – Složení reakční směsi.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
5x GC pufr	10,0 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U.µl ⁻¹)	0,5 µl
Templátová DNA – gDNA <i>S. coelicolor</i> M145	1,0 µl
100 µM Primery	á 0,5 µl
10 mM dNTP	1,5 µl
100% DMSO	2,5 µl
dH ₂ O	34 µl

Tabulka 13: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genů *sco6720* a *sco6742* – Podmínky PCR reakce.

Teplota	Čas	Fáze reakce	Počet cyklů
98 °C	90 s	Úvodní denaturace	1
98 °C	30 s	Denaturace	35
70 °C	30 s	Nasedání primerů	
72 °C	2 min	Extenze	
72 °C	10 min	Finální extenze	1
15 °C	∞	Chlazení	

Amplifikace genu *sco6742*

Podmínky PCR reakce i složení reakční směsi pro amplifikaci genu *sco6742* bylo stejné jako při amplifikaci genu *sco6720* (Tab. 12; Tab. 13) jen s využitím primerů Sco6742pIJFW a Sco6742pIJREV (Tab. 4). Úspěšnost PCR reakce byla také následně ověřena pomocí DNA elektroforézy.

Ověřovací koloniová PCR

Koloniová PCR byla využita v rámci této práce k rychlému ověření úspěšnosti inserce genu do plazmidu. Princip byl stejný jako u běžné PCR reakce jen na místo vyizolované templátové DNA se přidal malý kousek napěstovaného testovaného bakteriálního kmene. Pro lepší zpřístupnění gDNA byla protažena úvodní denaturace a do reakce byl přidáván detergent – NONIDET.

Pro přípravu konstruktů byly v této práci použity dva vektory – pIJ10257 a pIJ6902. Pro ověření vložení genu do vektor pIJ10257 byly využívány testovací primery testpIJ10257FWnew a testpIJ10257REV. Pro vektor pIJ6902 pak primery testpIJ6902FW a testpIJ6902REV (Tab. 4).

Do připravené reakční směsi o celkovém objemu 50 µl byl pomocí sterilního dřevěného párátko přenesen kousek přes noc narostlého testovaného kmene. Kmeny byly kultivovány při 37 °C na LB agaru s příslušným selekčním antibiotikem. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 14. Podmínky PCR reakce byly pro obě sady primerů stejné a jsou uvedeny v Tab. 15. Pro snadnější analýzu úspěšnosti přípravy konstruktů byla do sady PCR reakcí přidávána reakce s příslušným vyizolovaným prázdným plazmidem a jako negativní kontrola reakce bez templátové DNA.

Tabulka 14: Podmínky ověřovací koloniové PCR reakce – Složení reakční směsi.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x reakční pufr	5,0 µl
Taq-Purple DNA polymeráza (1 U.µl ⁻¹)	1,0 µl
100 µM Primery	á 0,5 µl
10 mM dNTP	1,0 µl
100% DMSO	2,5 µl
NONIDET	0,5 µl
dH ₂ O	39 µl

Tabulka 15: Podmínky ověřovací koloniové PCR reakce – Podmínky PCR reakce.

Teplota	Čas	Fáze reakce	Počet cyklů
98 °C	10 min ⁺	Úvodní denaturace	1
65 °C	pauza	Přidání DNA polymerázy	
94 °C ⁺⁺	45 s	Denaturace	
55 °C	45 s	Nasedání primerů	35
72 °C	90 s	Extenze	
72 °C	10 min	Finální extenze	1
15 °C ⁺⁺⁺	∞	Chlazení	

Pozn. ⁺ Délka úvodní denaturace byla 10 min nebo 12 min. Tato změna neměla na výtěžnost reakce vliv ⁺⁺ V denaturačním kroku byla použita buď teplota 94 °C, nebo 98 °C. Tato změna neměla na výtěžnost reakce vliv. ⁺⁺⁺ Pro zchlazení vzorků byla použita buď uvedená teplota 15 °C, nebo 4 °C.

4.2.4.6. Místně specifická mutagenese

Pro zavedení bodových mutací do genu *lmrC*, vedoucích ke záměně kyseliny glutamové (E) na glutamin (Q) v konzervovaném motivu DEPT, byla provedena místně specifická mutagenese podle návodu komerční soupravy QuikChange® (Stratagene) s využitím vlastních komponent – DNA polymeráza, restriční endonukleáza DpnI, pufrů a primerů (265, 266). Metoda využívá primery s požadovanou bodovou záměnou, která je zavedena do templátového plazmidu pomocí PCR reakce.

Jako templát pro PCR reakci byl použit plazmid pLV020. Pro zavedení bodové mutace na pozici G499C byly použity primery Lmr(C)G499C-For a Lmr(C)G499C-Rev, zatímco pro změnu v místě G1453C primery Lmr(C)G1453C-For a Lmr(C)G1453C-Rev (Tab. 4). Pro amplifikaci byla využita Phusion® High-Fidelity DNA polymeráze. PCR reakce je následována štěpením templátového plazmidu pomocí restriční endonukleázy DpnI, která rozpoznává metylovanou a hemimetylovanou DNA (rozeznávaná sekvence: 5'-Gm⁶ATC-3') a odstraňuje ji, zatímco nově nasynthetizovaná DNA zůstává zachována. Po inaktivaci restriční endonukleázy (80 °C, 20 min) bylo 15 µl PCR reakce transformováno do buněk *E. coli* XL1-Blue tepelným šokem. Následně byly připravené plazmidy ověřeny. Složení PCR reakce je uvedeno v Tab. 16. Průběh celé místně specifické mutagenese je uveden v Tab. 17. Reakce byly připraveny ve dvou variantách, kdy v první byly použity primery Lmr(C)G1453C-For a Lmr(C)G1453C-Rev a ve druhé kombinace všech čtyřech primerů (Lmr(C)G499C-For, Lmr(C)G499C-Rev, Lmr(C)G1453C-For a Lmr(C)G1453C-Rev).

Tabulka 16: Podmínky PCR reakce pro místně specifickou mutagenezi – Složení reakční směsi.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
5x GC pufr	10,00 μ l
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (2 U. μ l ⁻¹)	1,25 μ l
10 mM dNTP	2,00 μ l
100 μ M Primery	á 2,50 μ l
100% DMSO	2,50 μ l
Templátová DNA – pLV020 (ng. μ l ⁻¹)	0,50 μ l
dH ₂ O	28,75 μ l

Tabulka 17: Podmínky reakce pro místně specifickou mutagenezi

Teplota	Čas	Fáze	Počet cyklů
95 °C	5 min	Úvodní denaturace	1
68 °C	pauza	Přidání DNA polymerázy	
95 °C	30 s	Denaturace	18
55 °C	1 min	Nasedání primerů	
72 °C	8 min	Extenze	
4 °C	Pauza	Přidání DpnI (1,25 μ l)	1
37 °C	75 min	Restrikční reakce	
80 °C	20 min	Inaktivace DpnI	
4 °C	∞	Chlazení	

4.2.4.7. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Restrikční endonukleázy rozeznávají specifické palindromické sekvence na dvouvláknové DNA (dsDNA), ve kterých dochází k rozštěpení DNA. V této práci byly restrikční endonukleázy využity k linearizaci vektorů pIJ10257 a pIJ6902, ke štěpení amplifikovaných úseků obsahujících geny *lmrA*, *lmrB*, *ermE*-lmrC*, *sco6720*, *sco6742* a k ověření připravených konstruktů. Celkový objem reakce byl optimalizován v závislosti na účelu následného použití a koncentraci DNA vzorku.

V případě přípravy fragmentů pro následnou ligaci pomocí T4 DNA ligázy, které předcházelo přečištění restrikční reakce pomocí komerční soupravy Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), se objem reakce pohyboval mezi 50–100 μ l. Pro ověřovací reakce byl použit objem 20 μ l. Složení restrikční směsi odpovídalo doporučení výrobce pro použité endonukleázy (Tab. 18). Reakční podmínky byly optimalizovány podle specifických požadavků jednotlivých enzymů a jejich následného použití (Tab. 19). Amplifikované úseky byly nejprve přečištěny pomocí Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) a poté podrobeny štěpení.

Tabulka 18: Obecné složení restrikčních směsí

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x reakční pufr	1/10 finálního objemu
Restrikční enzym	2,5 U/1µg DNA
DNA	Dle účelu
dH ₂ O	Doplněno do finálního objemu

Tabulka 19: Podmínky restrikční reakce pro jednotlivé enzymy

Restrikční endonukleáza	Štěpení		Inaktivace	
	Teplota	Čas [hod]	Teplota	Čas [min]
BamHI – HF	37 °C	5–10	X	X
BglII	37 °C	4	X	X
EcoRI – HF	37 °C	3 (10) ⁺	65 °C	20
EcoRV – HF	37 °C	10	65 °C	20
HindIII – HF	37 °C	4	80 °C	20
NdeI	37 °C	15	65 °C	20
PstI	37 °C	10	80 °C	20
SalI	37 °C	10	65 °C	20
XbaI	37 °C	10	65 °C	20

Pozn. ⁺ změna délky reakce v závislosti na použití. Delší reakce byla použita pro ověřovací reakce.

4.2.4.8. Ligace DNA

Pro přípravu nových konstruktů byla v rámci této práce použita klasická klonovací metoda založená na spojení kohézních homologních konců pomocí fosfodiesterové vazby, kterou katalyzuje T4 DNA ligáza (NEB). Použité molární poměry inzertu k vektoru byly 3:1 (pro geny *lmrA*, *lmrB*, *ermE*^{*}-*lmrC*) a 5:1 (pro geny *sco6720* a *sco6742*). Do reakce bylo přidáno 100 ng vektoru. Pro geny *sco6720* a *SCO6742* bylo toto množství zvýšeno na 200 ng. Inzert byl v negativní reakci nahrazen destilovanou vodou (dH₂O). Složení ligační směsi o celkovém objemu 20 µl je uvedeno v Tab. 20. Ligace probíhala při 16 °C po dobu 16 hodin a byla následována inaktivací T4 DNA ligázy (65 °C, 10 min). Ligační směs byla buď přímo transformována pomocí elektroporace, nebo tepelným šokem do kompetentních buněk *E. coli* JM109, nebo XL-1 Blue, nebo uschována při -20 °C. Transformanty byly selektovány na LB agaru, který byl doplněn vhodným selekčním antibiotikem.

Tabulka 20: Složení ligační směsi

Složení ligační směsi	Množství na 1 reakci
10x T4 DNA ligační pufr	2,0 µl
Vektor	100–200 ng
Inzert	3:1–5:1
100 mM ATP	0,2 µl
T4 DNA ligáza	1,0 µl
dH ₂ O	do 20,0 µl

4.2.4.9. Sekvence DNA

Sekvence DNA byla provedena buď firmou GATC Biotech nebo Eurofins Genomics. Vzorky byly připraveny dle doporučení využité společnosti. Primery použité k sekvenaci jsou uvedeny v Tab. 4. Získaná data byla analyzována pomocí programu CLC Main Workbench 6.8.1. V rámci této práce byla sekvence DNA využita pro ověření připravených konstruktů.

4.2.5. Metody práce s RNA

4.2.5.1. Izolace celkové RNA

Izolace celkové RNA z kmenů *S. coelicolor* M145 a Δ TiaA byla provedena z buněčných kultur sklizených ve 42. hodině kultivace (30 °C, 220 RPM) v YEME médiu. Kmeny byly pěstovány v přítomnosti a absenci TIA ($c = 0,03 \text{ mg.l}^{-1}$). Pro zaočkování média byly použity germinizované spory.

1. Narostlé kultury byly sklizeny centrifugací (1500 g, 15 min, 4 °C). Získaný buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml RNA protect Solution (Qiagen) a inkubován při 25 °C po dobu 5 minut.
2. Buňky byly následně centrifugovány (1500 g, 15 min, 4 °C) a vzniklý pelet byl resuspendován v 250 µl TE⁻¹ pufru.
3. Buněčná suspenze byla smíchána se skleněnými kuličkami (průměr 0,1 mm) v poměru 2:1 a lyze byla provedena pomocí FastPrep-24TM (MP Biomedicals) při podmínkách – 1x60s, 6 pohybů za sekundu.
4. Po lyzi buněk byla provedena vlastní izolace RNA za použití TRIzolTM Reagent (Invitrogen) dle manuálu výrobce.
 - K lyzátu bylo přidáno 700 µl TRIzolu a vzorek byl pečlivě promíchán za využití vortexu. Následně byla směs inkubována 5 min při RT.
 - Ke vzorku bylo přidáno 200 µl chloroformu a po promíchání byla směs inkubována při RT po dobu 2 min.
 - Roztok byl centrifugován (12 000 g, 15 min, 4 °C) a vzniklá vodná fáze byla přesunuta do nové mikrozkušavky.
 - K vodné fázi bylo přidáno 500 µl isopropanolu a vzorek byl opatrně promíchán a inkubován při RT po dobu 5 min.

- Po centrifugaci (12 000 g, 15 min, 4 °C) byl vzniklý pelet opláchnut 1 ml 75% etanolu. Přidaný etanol byl odstraněn pomocí další centrifugace (12 000 g, 10 min, 4 °C). Po odebrání supernatantu se zbylý etanol nechal odpařit.
- Vysušený pelet byl resuspendován v 100 µl dH₂O zbavené RNáz.

4.2.5.2. Enzymatické odstranění DNA z celkové RNA

Pro odstranění kontaminující DNA byly vzorky s izolovanou RNA ošetřeny pomocí Turbo DNase I (Invitrogen). Pro ochranu RNA byl do reakce přidán inhibitor RNáz (RiboGuard™). Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 21. Reakční směs byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut.

Tabulka 21: Složení reakční směsi pro enzymatické odstranění DNA z RNA vzorků

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x reakční pufr – TURBO™ DNase Buffer	10 µl
Turbo DNase I	5 µl
RiboGuard™	1 µl
Celková RNA	84 µl

Po odstranění DNA ze vzorků byla provedena izolace RNA za použití TRIzol™ Reagent (Invitrogen). Izolace probíhala podobně jako je uvedeno v Kap. 4.2.5.1. Byly jen použity jiné objemy látek. Vzorek byl smíchán s 300 µl TRIzolu a pečlivě promíchán za využití vortexu. Po 5 minutách inkubace při RT bylo ke směsi přidáno 100 µl chloroformu a po promíchání byla směs inkubována při RT 2 minuty. Po centrifugaci (12 000 g, 15 min, 4 °C) byla vzniklá vodní fáze přesunuta do nové mikrozkušavky. Zde bylo přidáno 200 µl isopropanolu a vzorek byl opatrně promíchán a inkubován při RT po dobu 5 minut. Po centrifugaci (12 000 g, 15 min, 4 °C) byla precipitovaná RNA opláchnuta 1 ml 75% etanolu. Přidaný etanol byl odstraněn pomocí další centrifugace (12 000 g, 10 min, 4 °C). Po odebrání supernatantu byl zbylý etanol ponechán k odpaření. Suchý pelet byl resuspendován v 20 µl dH₂O zbavené RNáz.

Čistota a koncentrace získané RNA byla stanovena pomocí spektrofotometru (NanoDrop™, DeNovix). Pro kontrolu integrity byly vzorky nanášeny na 2% (w/v) agarosový gel. Podmínky RNA elektroforézy jsou podobné k těm uvedeným v (Kap. 4.2.4.1.). Před použitím byla elektroforetická vana důkladně opláchnuta a byl aplikován přípravek pro inaktivaci RNáz (PCR Clean™ DNA & RNA Decontamination Spray). Získané RNA vzorky byly následně použity pro RT-PCR.

4.2.5.3. Reverzní transkripce RNA a následná PCR (RT-PCR)

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu informace obsažené v RNA do DNA prostřednictvím enzymu reverzní transkriptázy (RNA-dependentní DNA polymerázy). Takto vzniklá DNA se označuje jako komplementární DNA (cDNA) a v rámci RT-PCR slouží jako templát pro následnou PCR reakci. Tímto způsobem lze ověřit přítomnost testované sekvence.

Pro ověření, zda jsou geny *tiaAL* a *tiaA* transkribovány společně, byly navrženy primery Compleat upstream_RT_FW a Compleat upstream_RT_REV (Tab. 4). Reverzní transkripce byla provedena s použitím

reverzní transkriptázy M-MuLV (NEB) a primeru Complet upstream_RT_REV. Vzorky RNA byly před použitím naředěny na koncentraci 10 ng.μl⁻¹.

1. Příprava cDNA

- Nejprve byla připravena první část reakční směsi dle Tab. 22. Reakce byly provedeny v triplicátech. Jako pozitivní kontrola byla připravena reakce, ve které byl místo RNA použit kosmid 7G01. Negativní kontrola obsahovala místo RNA ddH₂O.

Tabulka 22: Složení reakční směsi – 1. část

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
RNA	1,0 μl
Primer	2,0 μl
10 mM dNTP	1,0 μl
ddH ₂ O (zbavená RNáz)	6,0 μl

- Připravená směs byla inkubována při 65 °C po dobu 5 minut a následně zchlazena na ledu.
- Po ochlazení bylo ke směsi přidáno 10 μl druhé části reakční směsi (Tab. 23).

Tabulka 23: Složení reakční směsi – 2. část

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x reakční pufr	2,0 μl
M-MuLV RT (200U/μl)	1,0 μl
RNaseOUT™ (inhibitor RNáz)	0,5 μl
ddH ₂ O (zbavená RNáz)	6,5 μl

- Celá reakce byla následně inkubována při 25 °C po dobu 5 minut. Poté byla reakční směs inkubována při teplotě 42 °C po dobu 1 hodiny. V tomto čase dochází k syntéze cDNA. Nakonec došlo k inaktivaci enzymu při 65 °C po dobu 20 minut.

2. PCR amplifikace cDNA

- Připravená cDNA sloužila jako templát pro následnou PCR reakci. Složení a podmínky této PCR reakce jsou uvedeny v Tab. 24 a Tab. 25. Výsledky amplifikace byly analyzovány pomocí elektroforézy na 2% (w/v) agarosovém gelu.

Tabulka 24: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci cDNA

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x reakční pufr	2,0 µl
Taq-Purple DNA polymeráza (1 U.µl ⁻¹)	0,4 µl
Templátová cDNA	0,5 µl
10 µM Primery	á 1,0 µl
10 mM dNTP	0,2 µl
dH ₂ O	14,9 µl

Tabulka 25: Podmínky PCR amplifikaci cDNA

Teplota	Čas	Fáze reakce	Počet cyklů
96 °C	3 min	Úvodní denaturace	1
96 °C	30 s	Denaturace	
63 °C	30 s	Nasedání primerů	25
72 °C	60 s	Extenze	
72 °C	10 min	Finální extenze	1
15 °C	∞	Chlazení	

4.2.6. Metody práce s proteiny

4.2.6.1. Proteinová elektroforéza – SDS-PAGE

Tato metoda umožňuje separaci denaturovaných proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. V experimentální části byl použit 8% a 16% polyakrylamidový gel, jehož složení je uvedeno v Tab. 26. Jako standard molekulových hmotností byl použit BlueElf Prestained Protein Marker (Jena Bioscience) v objemu 5 µl. Elektroforéza probíhala v první fázi při napětí 80 V, které bylo po přechodu vzorků do separačního gelu zvýšeno na 180 V. Před nanesením na gel byly analyzované vzorky smíchány s 2x SDS-PAGE vzorkovým pufrům a inkubovány při 98 °C po dobu 10 minut. Takto připravené vzorky byly buď ihned naneseny na gel v objemu 10–25 µl, nebo uchovány při teplotě -80 °C pro pozdější analýzu. Po ukončení separace byl gel buď obarven, nebo použit k přenosu proteinů na membránu pro následnou imunodetekci (Western blot).

Tabulka 26: Složení SDS-PAGE gelu

Složky gelu	Separační gel		Zaostřovací gel
	8%	16%	
30% akrylamid	1,35 ml	2,65 ml	83,25 µl
1,5 M Tris-HCl, pH8,8	1,25 ml	1,25ml	X
0,5 M Tris-HCl, pH6,8	X	X	156,25 µl
5% SDS	0,1 ml	0,1 ml	12,5 µl
dH ₂ O	2,3 ml	1 ml	373 µl
TEMED	25 µl	25 µl	3,13 µl
30% APS	2,5 µl	2,5 µl	0,31 µl

4.2.6.2. Barvení SDS–PAGE gelu

Pro vizualizaci separovaných proteinů byl gel vložen na 10 minut do nádoby obsahující barvicí roztok – Coomassie. Gel byl následně opláchnut malým množstvím odbarvovacího roztoku (Destain). Pro úplné odstranění nenavázaného barviva byl gel dvakrát po 10 minutách promyt čerstvým odbarvovacím roztokem a následně odbarvován přes noc. Odbarvování bylo provedeno při RT za neustálého míchání na kývačce, což umožnilo efektivnější odstranění přebytečného barviva.

4.2.6.3. Western blot a imunodetekce proteinů

Tato metoda byla využita k detekci proteinu LmrC v buněčných lyzátech kmenů *S. lincolnensis* a při jeho heterologní expresi v kmenech *S. coelicolor* prostřednictvím specifické králičí polyklonální protilátky proti proteinu LmrC (GenScript USA, Inc.). Dále byla tato metoda použita pro detekci proteinu LmrC a proteinu S7 malé ribozomální podjednotky v experimentech frakcionace buněk, sacharózového gradientu, kopurifikace ribozomů s LmrC a při purifikaci LmrC. Postup detekce proteinů byl stejný, lišil se pouze způsob přípravy vzorků před nanesením na SDS-PAGE gel.

Příprava buněčných lyzátů pro imunodetekci

Kultivace kmenů *S. lincolnensis* pro získání buněk pro následnou imunodetekci probíhala při 30 °C a 220 RPM. Sporové suspenze testovaných kmenů byly germinovány a použity k inokulaci 20 ml YEME média. Průběh kultivace byl přizpůsoben testovaným otázkám.

Pro stanovení vlivu antibiotik na indukci produkce LmrC, byla v 8. hodině kultivace přidána antibiotika (LIN (4 µg ml⁻¹), CLI (0.5 µg ml⁻¹), PIIA (4 µg ml⁻¹), TIA (0.125 µg ml⁻¹), ERY (0.5 µg ml⁻¹), PIA (4 µg ml⁻¹), CAM (4 µg ml⁻¹) a CARB (4 µg ml⁻¹)). Po dalších 14 hodinách kultivace byly buněčné kultury stočeny (4 000 g, 10 min, 4 °C).

V případě analýzy počátku produkce proteinu LmrC po přidání antibiotik byla antibiotika (LIN nebo CLI) přidána v 8. hodině kultivace, nebo již na jejím začátku s postupným odebíráním vzorku. Kultivace byla ukončena v 20. hodině. Následné zpracování vzorků probíhalo stejným způsobem.

Buněčné pelety byly promyty Roztokem I (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) a následně resuspendovány v Roztoku II (50 mM Tris-HCl, 1× inhibitor proteas (Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) pH 8.0) Vlastní lyze buněk byla provedena pomocí sonikace (3 × 40 s) na přístroji UP200S Hielscher Ultrasonic GmbH. Mezi jednotlivými pulzy byly vzorky chlazeny. Po sonikaci byly vzorky smíchány s 2x SDS-PAGE vzorkovým pufrem a inkubovány při 98 °C po dobu 10 minut. Takto připravené vzorky byly nachystány na nanesení na gel.

Detekce proteinu LmrC

Proteiny separované pomocí SDS-PAGE byl přeneseny na PVDF (polyvinylidendifluorid) membránu pomocí polosuchého přenosu (15 V, 45 min) za použití přístroje Trans-Blot® SD Semi-Dry Cell (Bio-Rad). Před samotným přenosem byla membrána aktivována ponořením do metanolu na 15 sekund a následně inkubována v přenosovém pufru po dobu 10 minut. Po ukončení blotování byl gel dodatečně obarven (viz Kap. 4.2.6.2.) pro ověření účinnosti přenosu proteinů na membránu.

Membrána byla po ukončení přenosu inkubována přes noc při 4 °C v blokovacím roztoku (5% (w/v) Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad) v PBS-Tween pufru (1x PBS, 0,05% Tween-20)). Následovalo promytí

v PBS-Tween pufru a inkubace s primární protilátkou (1:5000) při RT po dobu 1 hodiny. Protilátka byla naředěna v 1% (w/v) Blotting-Grade Blocker připraveném v PBS-Tween pufru. Po inkubaci byla membrána třikrát promyta čerstvým PBS-Tween pufrům (každé promytí trvalo 15 minut), aby došlo k odstranění nespecificky navázané primární protilátky. Následně byla membrána inkubována s monoklonální anti-králičí IgG sekundární protilátkou (1:2000) po dobu 1 hodiny při RT. Sekundární protilátka byla naředěna stejným roztokem jako primární protilátka. Po odmytí nespecificky navázané sekundární protilátky byl proteinu LmrC detekován pomocí substrátu Immobilon™ Western chemiluminescent HRP Substrate (Merck) na přístroji ChemiDoc MP (Bio-Rad). Detekce probíhala podle návodu výrobce. Během jednotlivých inkubací byl vzorek míchán na kývačce pro účinnější odmyvání složek.

Detekce proteinu S7

Jednotlivé kroky detekce proteinu S7 byly podobné postupu pro detekci proteinu LmrC. Rozdíly spočívaly v podmínkách přenosu proteinů na PVDF membránu (15V, 15 min), použitím ředění primární protilátky proti proteinu S7 (1:1000) a v zařazení dalšího promývacího kroku po inkubaci s primární protilátkou.

4.2.6.4. Purifikace proteinu LmrC

Protokol pro purifikaci proteinu LmrC vychází z podmínek zavedených v laboratoři Antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky pro purifikaci ARE1 proteinu Vga_{ALC}.

Heterologní produkce LmrC

Heterologní produkce proteinu LmrC byla testována v kmenech *E. coli* BL21 (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3)/pGroES, které byly transformovány expresním plazmidem pET-42b(+)-lmrC. Transformanty byly selektovány na LB agar s KAN (50 mg.l⁻¹) při 37 °C přes noc. Ráno byly buňky zaočkovány do LB média se selekčním antibiotikem (KAN (50 mg.l⁻¹)) a kultivovány při 37 °C do OD₆₀₀ ≈ 0,9 (± 0,1), kdy byla indukována produkce LmrC pomocí 1 mM IPTG. Před přidáním induktoru byl odebrán vzorek sloužící jako negativní kontrola. V rámci práce byly testovány tři podmínky indukce: 37 °C, 90 minut; 25 °C 4 hodiny; 18 °C 21 hodin. Po optimalizaci probíhala indukce v kmeni *E. coli* BL21 (DE3)/pGroES za podmínek 37 °C po dobu 90 minut. Po indukci byla kultura centrifugována (3 000 g, 15 min, 4 °C) a vzniklý buněčný pelet byl uschován při -80 °C.

Lyze

Buněčný pelet byl resuspendován v sonikačním pufru (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM Imidazol, 1% Triton, 1 mM PEFA) a lyzován sonikací (3 × 40 s) pomocí přístroje UP200S Hielscher Ultrasonic GmbH. Mezi jednotlivými pulzy byl vzorek chlazen. Po sonikaci byl lyzát ošetřen 1,5 μl benzonázy (40U/ml, Sigma-Aldrich) a inkubován při RT po dobu 30 minut, aby došlo k degradaci nukleových kyselin. Následně byl ke vzorku přidán 1 mg protamin sulfátu a směs byla opět inkubována při RT po dobu 30 minut. Po této inkubaci byl lyzát centrifugován (16 000 g, 30 min, 4 °C). Vzniklý supernatant byl následně použit buď k nanesení na ekvilibrovanou kolonu nebo pro analýzu na SDS-PAGE gelu.

Metaloafinitní chromatografie

Purifikace proteinu LmrC, který byl na svém C-konci fúzován s histidinovou kotvou, byla provedena manuálně pomocí metaloafinitní chromatografie za využití peristaltické pumpy. Kolona HisTrap TM HP (GE Healthcare Life Sciences) o objemu 1 ml byla nejprve promyta sterilní vodou v objemu odpovídající 5násobku objemu kolony (5 CV) a následně ekvilibrována sonikačním pufrem (5 CV). Připravený vzorek byl nanesen na kolonu a promyt sonikačním pufrem (5 CV), aby se odstranily nespecificky navázané proteiny. Eluce proteinu LmrC probíhala krokově za použití pufru s postupně se zvyšující koncentrací imidazolu (1mM, 10mM, 50mM, 100mM a 250mM), přičemž složení pufru bylo identické se sonikačním pufrem. V každém elučním kroku byla kolona promyta 5 CV. Eluční frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a imunodetekcí k potvrzení přítomnosti a čistoty LmrC.

4.2.7. Analýza produkce linkomycinu pomocí LC-MS

4.2.7.1. Kultivace *Streptomyces lincolnensis* pro stanovení linkomycinové produkce

Pro studium vlivu rezistenčních proteinů LmrA, LmrB a LmrC na produkci linkomycinu byly zásobní spory testovaných kmenů (*S. lincolnensis*, ΔA , ΔB , ΔC , *S. lincolnensis* + C_c) germinizovány a využity k zaočkování 50 ml YEME média v prolamovaných Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml. Kultivace probíhala za stálého třepání (200 RPM) při teplotě 30 °C po dobu 40–42 hodin. Z narostlé kultury bylo 2,5 ml přeneseno do 47,5 ml čerstvého AVM média. Kultivace pokračovala dále za stejných podmínek (30 °C, 200 RPM) po dobu 120 hodin. Po ukončení kultivace byla kultura centrifugována (4 000 g, 10 min, 4 °C) a získaný supernatant byl použit pro extrakci LIN.

4.2.7.2. Extrakce linkomycinu

K extrakci LIN byl využit 1 ml supernatantu z 42hodinové nebo 160hodinové kultivace. Extrakce na pevné fázi byla provedena na koloně Oasis HLB 3 ml, 60mg (Waters, USA). Před vlastní extrakcí byla kolona kondicionována 3 ml metanolu a následně ekvilibrována 3 ml MilliQ vody. Na takto připravenou kolonu byl nanesen vzorek s upraveným pH $\approx 9,0$ (úprava pomocí 30% (v/v) NH₄OH). Kolona byla následně promyta 3 ml MilliQ vody. Zachycené látky byly eluovány 1,5 ml 80% metanolu. Získaný eluát byl odpařen při 42 °C na vakuové odparce (SpeedVacTM, Eppendorf). Vzniklý pelet byl resuspendován ve 150 μ l 50% metanolu. Po centrifugaci (12 045 g, 5 min, RT) byl vzorek 10x naředěn 50% (v/v) metanolem a podroben analýze za využití kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS analýza).

4.2.7.3. LC-MS analýza

K analýze vzorků byl využit systém Acquity UPLC (Waters) vybavený DAD detektorem (typ 2996; rozsah absorbance 194–600 nm) a hmotnostním spektrometrem LCT Premier XE. Separace probíhala na koloně Acquity UPLC CSH C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m; Waters) při teplotě 40 °C. Na kolonu bylo dávkováno 5 μ l analyzovaného vzorku. Pro separaci byla zvolena dvojfázová mobilní fáze, kde fázi A tvořil 1 mM mravenčan amonný (pH 9) a fázi B roztok acetonitrilu. Separace probíhala s využitím lineárního gradientového programu s průtokem 0,4 ml·min⁻¹ (čas [min]/%B) – 0/5; 1,5/5; 12,5/58. Po skončení gradientu následovalo promytí kolony (1,5 min, 100%B) a její ekvilibrace (1,5 min 5%B).

Množství LIN ve vzorcích bylo stanoveno pomocí UV detekce při vlnové délce 194 nm. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí roztoků o známé koncentraci LIN v rozpětí 3,78–125 mg.l⁻¹. Příprava těchto roztoků spočívala v přidání LIN do extraktu kultivačního média získaného z kultivace neprodukčního kmene *S. lincolnensis* Δ lmbD. Zpracování těchto roztoků probíhalo identickým postupem jako u analyzovaných vzorků. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka (korelační koeficient $r^2 = 0,995$, přesnost 10%) s limitem kvantifikace 7,56 mg.l⁻¹. Pro analýzu vzorků s koncentrací LIN pod limitem kvantifikace byla využita citlivější MS detekce (Tab. 27), při níž byl sledován specifický iont o hodnotě m/z 407,2. Data byla zpracována v programu MassLynx v.4.1.

Tabulka 27: Nastavení podmínek MS detekce

Podmínky	Nastavené hodnoty
Pracovní režim	„W“
Napětí na kapiláře	2800 V
Napětí na vstupu do analyzátoru	40 V
Teplota dusíku	350 °C
Průtok dusíku	800 l.h ⁻¹
Průtok dusíku u vstupu do analyzátoru	50 l.h ⁻¹
Teplota iontového zdroje	120 °C
Doba skenu	0,15 s
Pauza mezi skeny	0,01 s

4.2.8. Stanovení citlivosti bakteriálních kmenů

V této práci byly použity dvě metody testování citlivosti kmenů *S. lincolnensis* a *S. coelicolor* vůči vybraným antibiotikům – agarová diluční metoda a diskový difuzní test.

4.2.8.1. Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda byla využita ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Hodnota MIC byla definována jako nejnižší antibiotická koncentrace, při které nedocházelo k viditelnému růstu testovaného bakteriálního kmene. Testování probíhalo na Petriho miskách s MH agarem obsahujícím postupně rostoucí koncentraci testovaných antibiotik. Testovanými antibiotiky byly LIN (0,5–16384 μ g.ml⁻¹), CLI (0,25–2048 μ g.ml⁻¹), TIA (0,125–512 μ g.ml⁻¹), PIIA (4–64 μ g.ml⁻¹), PIA (4–64 μ g.ml⁻¹), ERY (0,125–128 μ g.ml⁻¹), TELI (0,25–128 μ g.ml⁻¹), CARB (0,25–128 μ g.ml⁻¹), CAM (4–128 μ g.ml⁻¹), TET (1–256 μ g.ml⁻¹) a PURO (16–512 μ g.ml⁻¹). Rozpětí koncentrací bylo upravováno podle testovaných kmenů. Pro každé měření byl připraven čerstvý zásobní roztok testovaného antibiotika. Pro antibiotikum LIN byl používán zásobní roztok o koncentraci 250 mg.ml⁻¹, pro ostatní antibiotika pak 10 mg.ml⁻¹. Použitá rozpouštědla odpovídala konkrétním antibiotikům (Tab. 3).

1. Příprava testovacích Petriho misek s MH agarem
 - Byl připraven čerstvý zásobní roztok testovaného antibiotika, který byl dle potřeby rozředěn na nižší koncentrace.

- Byly připraveny pracovní roztoky antibiotik o objemu 1 ml dle Tab. 28.
- Připravené 1 ml roztoky antibiotik byly smíchány s MH agarem vytemperovaným na 55 °C do finálního objemu 20 ml. Po důkladném promíchání byl agar nalit do připravených Petriho misek o průměru 8 cm. Příprava probíhala ve vzestupné řadě koncentrací antibiotik. Jako kontrolní misky byly použity 2 misky bez antibiotik a po jedné misce se selekčními antibiotiky, které odpovídaly testovaným kmenům (hygromycin (40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), apramycin (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a KAN (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)).
- Po ztuhnutí agaru byly misky vysušeny v laminárním boxu pro lepší očkování inokula

2. Příprava inokula

- Ze zásobních sporových suspenzí byla připravena inokula o zákalu 0,5–1 McFarlandovy stupnice (McF) jejich rozředěním ve sterilní H_2O . Spory byly drženy v chladu, aby nedošlo k jejich naklíčení.
- Připravená inokula byla přenesena do mikrotitrační destičky v pořadí odpovídajícím testovaným miskám a setům testovaných antibiotik.
- Multikanálovou pipetou bylo postupně nanášeno 5 μl každé sporové suspenze, a to opět od nejnižší po nejvyšší koncentraci. Jako první byla zaočkována miska bez antibiotika, poté následovaly testované misky se vzestupnou řadou koncentrací. Nakonec byly zaočkovány zbylé kontrolní misky, přičemž poslední miskou byla vždy miska bez antibiotik.
- Nanášená inokula se nechala v laminárním boxu vsáknout, aby při manipulaci s miskami nedošlo k vzájemné kontaminaci vzorků.

3. Kultivace a odečtení výsledků

- Kultivace probíhala po dobu 5 dnů při teplotě 30 °C
- Následně došlo k analýze růstu a stanovení hodnoty MIC

V případě stanovení hodnoty MIC u mycelií narostlých v YEME nebo AVM médiu byla metodika stejná. Rozdíl byl pouze v přípravě inokula, kde bylo místo spor použité narostlé mycelium. Kultury byly vzájemně standardizovány na hodnotu $\text{McF} \approx 2$.

Tabulka 28: Ředění antibiotik pro přípravu testovací sady pro stanovení hodnot MIC

Zásobní koncentrace [mg.ml ⁻¹]	Antibiotikum [μl]	dH ₂ O [μl]	MH agar [ml]	Finální koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Log ₂
250	1310	0	19	16384	14
	655	345	19	8192	13
	328	672	19	4096	12
	164	836	19	2048	11
	82	918	19	1024	10
	41	959	19	512	9
10	512	488	19	256	8
	256	744	19	128	7
	128	872	19	64	6
	64	936	19	32	5
	32	968	19	16	4
	16	984	19	8	3
	8	992	19	4	2
0,1	400	600	19	2	1
	200	800	19	1	0
	100	900	19	0,5	-1
	50	950	19	0,25	-2
	25	975	19	0,125	-3

4.2.8.2. Diskový difuzní test

Tato metoda je založena na odečtení inhibiční zóny vytvořené kolem antibiotického disku. V této práci byly použity buď komerčně dostupné disky (Oxoid), nebo mnou připravené disky obsahující 30 μg TIA. Pro jejich přípravu bylo na disk aplikováno 25 μl dH₂O obsahující odpovídající množství antibiotika. Přebytná voda se nechala odpařit.

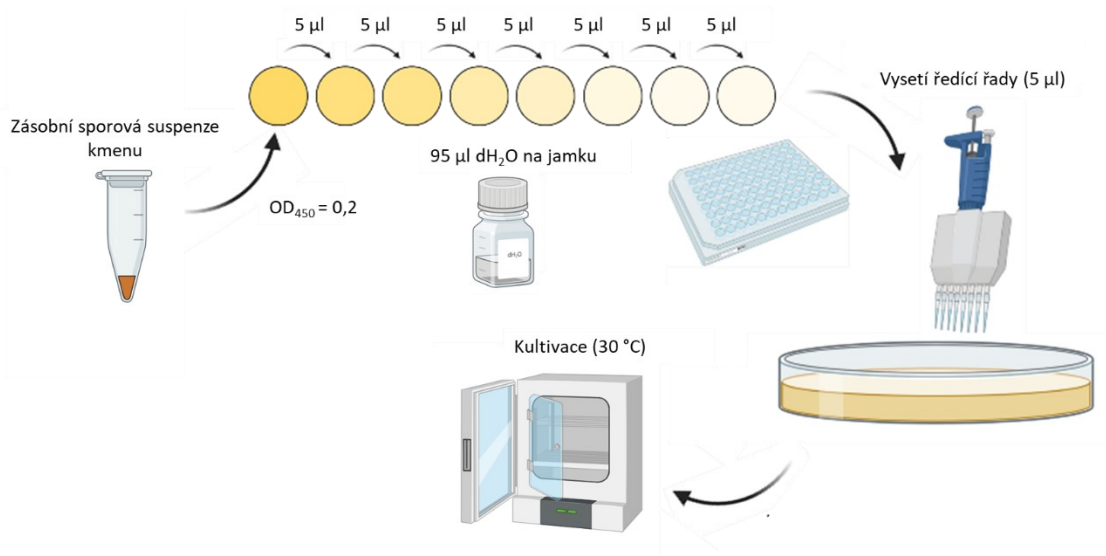
Spory testovaného kmene byly naředěny ve sterilní dH₂O na hodnotu McF ≈ 0,5. Takto připravená sporová suspenze byla rovnoměrně zočkováána na plotnu s MH agarem. Přebytné inokulum bylo odsáté a půda se nechala usušit. Následně byly pomocí jehly na předem vybraná místa umístěny antibiotické disky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 5-6 dní.

4.2.9. Kapkový test

Kapkový test (drop assay) slouží ke stanovení inhibičního efektu testovaných látek nebo kultivačních podmínek ovlivňujících růst testovaných kmenů. Princip metody spočívá v nanesení sériového ředění analyzovaného kmene na pevné médium. V této práci byl kapkový test využíván k posouzení inhibičního efektu ATPáza deficientních variant proteinu LmrC (tzv. EQ mutant) a bližší fenotypické analýze rezistence vybraných kmenů vůči antibiotikům.

Zásobní sporová suspenze testovaného kmene byla naředěna na $OD_{450} = 0,2$. Suspenze byla následně naředěna v pětinasobném sériovém ředění. Připravená ředící řada spor byla nanesena na připravené Petriho misky s testovaným agarem. Objem sporové suspenze použitý k zaočkování byl 5 μ l (Obr. 23).

V této práci byly testované kmeny očkované buď na MH agar nebo MM agar. V závislosti na konkrétním experimentu mohl být agar doplněn o testované antibiotikum, induktor (theofylin (Theo)), nebo jejich kombinaci. Zaočkované Petriho misky byly kultivovány při 30 °C. Délka kultivace byla stanovena podle podmínek konkrétního experimentu v průměru se pohybovala mezi 2–5 dny. Jednotlivá měření byla buď odečítána průběžně spolu s fotodokumentací, nebo byla provedena v konkrétní den.



Obrázek 23: Schématické znázornění přípravy kapkového testu. Obrázek připraven pomocí nástroje BioRender.

4.2.10. Sledování ACT produkce

Pro sledování zahájení produkce ACT indukované ribozom-vazebnými antibiotiky a posouzení vlivu ABCF proteinů na tuto indukci byla produkce ACT monitorována na základě změny zabarvení kultur v průběhu kultivace. Kultivace byla provedena v 6jamkové destičce na MH agaru (MP Biomedicals) doplněném o testovaná antibiotika (CLI (0,03 $mg.l^{-1}$), TIA (0,03 $mg.l^{-1}$), ERY (0,03 $mg.l^{-1}$)) a v kontrolní podmínce bez antibiotik. Do každé jamky bylo nalito 5 ml agaru. Po ztuhnutí agaru byl jeho povrch vysušen. Sporové suspenze testovaných kmenů byly naředěny sterilní dH_2O na $OD_{450} = 0,2$ a následně zaočkovány do středu jamky v objemu 10 μ l. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 11 dní. V průběhu kultivace byla denně zaznamenávána změna produkce ACT skrze změnu zbarvení kultur.

4.2.11. Společná kultivace kmenů *Streptomyces* a *Clitopilus*

Pro zkoumání interakce mezi kmeny *Streptomyces* (*S. coelicolor*, *S. lincolnensis*, *S. griseoflavus* Tu4000, *S. niveus* DSM40088, *S. caelestis* a *S. ambofaciens*) a *C. passeckerianus* (CCBAS738 a 739) byla provedena společná kultivace na TSA a ME agaru.

Kmeny *Clitopilus* byly inokulovány na TSA nebo ME agar v přítomnosti nebo absenci TIA o koncentraci 0,03 $mg.l^{-1}$. Po 20 dnech kultivace při 28 °C byly za aseptických podmínek vyříznuty agarové bločky o velikosti 8 mm a přeneseny na novou Petriho misky obsahující stejný typ agaru, na kterém byla houba původně kultivována. Sporové suspenze testovaných kmenů *Streptomyces* byly naředěny na $OD_{450} = 0,2$ a

podle experimentálního designu inokulovány na připravené Petriho misky s agarovým diskem obsahujícím houbu. Jako negativní kontrola byl použit prázdný agarový bloček. Společná kultivace probíhala v teplotě 28 °C po dobu 12 dní s pravidelným monitorováním vzájemné interakce.

4.2.12. Mikroskopické pozorování rodu *Streptomyces*

4.2.12.1. Mikroskopické pozorování morfologie mycelia *Streptomyces lincolnensis*

Vliv proteinu LmrC na sporulaci *S. lincolnensis* byl sledován pomocí světelné mikroskopie. Protokol pro přípravu preparátů vycházel z práce Kieser T. et al. (141). Do MS agaru byla po zaočkování bakteriální kultury vložena sterilní krycí sklíčka pod úhlem menším než 45°, což umožnilo uzavření Petriho misky. Pro sterilizaci krycích sklíček byl použit denaturovaný etanol. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C pod dobu 4 dnů. Během růstu se vzdušné mycelium *Streptomyces* rozrostlo na povrch krycích sklíček, která byla následně použita k přípravě mikroskopických preparátů. Preparáty byly připraveny přiklopením krycího sklíčka s narostlým myceliem na podložní sklíčko s kapkou sterilní dH₂O. Pozorování bylo provedeno na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX41 vybaveném kamerou Olympus D73 při zvětšení 400x.

4.2.12.2. Fluorescenční mikroskopie

Funkčnost translační fúze proteinu LmrC s fluorescenčním proteinem mCherry byla analyzována pomocí fluorescenční mikroskopie. Mikroskopické preparáty byly připraveny identickým postupem popsaným pro světelnou mikroskopii. Analýza byla provedena na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX41 vybaveném kamerou Olympus D73 při zvětšení 400x. Fluorescenční protein mCherry byl excitován při vlnové délce 575 nm.

4.2.13. *In vitro* translační systém

4.2.13.1. Příprava translačního lyzátu *Enterococcus faecalis*

Pro přípravu bezbuněčného translačního lyzátu byl použit postup pro přípravu lyzátu pro kmen *Bacillus subtilis* (267). Protokol byl optimalizován pro mikroorganismus *E. faecalis*.

1. Příprava buněčné kultury

- Kmen *E. faecalis* OG1RF byl rozočkován ze zásobní konzervy na BHI agar a inkubován při 37 °C přes noc.
- Získaná kolonie byla zaočkována do 50 mL BHI média a kultivována při 37 °C a 200 RPM přes noc.
- Pro hlavní kultivaci bylo připraveno šest paralelních kultur. Připraveným inokulem bylo zaočkováno 400 ml čerstvého vytemperovaného BHI na OD₆₀₀ ≈ 0,05.
- Kultury byly inkubovány při 37 °C a 200 RPM do dosažení OD₆₀₀ = 1,5 (cca 3 hodiny růstu)
- Bakteriální suspenze byla centrifugována (10 000 RPM (rotor JLA 10.500), 5 min, 4 °C).
- Získaný pelet byl dvakrát promyt předchlazeným 1x 12S lyzačním pufrem (60 mM glutamát draselný, 10 mM Tris-acetát, 14 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT a 0,5 mM PMSF, pH 8,2). První promytí proběhlo ve 100 ml 1x 12S lyzačního pufru. Po centrifugaci (10 000 g; 10 min; 4 °C) byl vzorek promyt 50 ml 1x 12S lyzačního pufru a centrifugován (5 000 g, 30 minut 4 °C).

- Výtěžek biomasy byl kolem 6,5 g.
2. Lyze buněk
- Buněčný pelet byl resuspendován v 20 ml předchlazeného 1x 12S lyzačního pufru.
 - Suspenze byla lyzována ve vysokotlakém homogenizátoru (Stansted Fluid Power SFPH-10) při tlaku 2,2 bar v chlazeném prostředí. Proces byl opakován jedenkrát.
3. Odsolení lyzátu
- Odstanění buněčných zbytků bylo provedeno dvoustupňovou centrifugací. V prvním kroku byla po centrifugaci (3 000 g, 10 min, 4 °C) odebrána vrchní část supernatantu. Odebraný vzorek byl podroben druhé centrifugaci (14 000 g, 10 min, 4 °C), kdy byla opět odebrána vrchní část.
 - Odsolení lyzátu bylo provedeno na ekvilibrované koloně Zeba™ Spin Desalting column 7K (ThermoFisher) dle manuálu výrobce – Pomocí centrifugace byl odstraněn uchovávací roztok a kolona byla třikrát ekvilibrována 5 ml 1x 12S lyzačního pufru. Poté byl nanesen vzorek. Podmínky centrifugace byly 1 000 g, 2 min, 4 °C.
 - Měření celkové koncentrace proteinu v lyzátu bylo provedeno pomocí metody dle Bradfordové (pro kalibrační křivku (korelační koeficient $r^2 = 0,9911$) byl použit BSA) a byly stanoveny hodnoty A_{260} a A_{280} .
 - Lyzát byl rozdělen po 400 μ l a uchováván při -80 °C.

4.2.13.2. Příprava translačního lyzátu *Streptomyces lincolnensis*

Příprava odsoleného lyzátu pro kmen *S. lincolnensis* vycházela z výše popsaného postupu, přičemž byly optimalizovány kultivační podmínky, aby lépe vyhovovaly tomuto kmeni. Kultivace probíhala v YEME médiu při teplotě 30 °C a 220 RPM. Lišilo se také množství připraveného inokula (20 ml YEME média) použitého k zaočkování finálního objemu (400 ml YEME média). Kultura byla zaočkována na $OD_{450} \approx 0,05$ a po 15 hodinách kultivace byla zcentrifugována (10 000 g, 10 min, 4 °C). Další kroky přípravy lyzátu probíhaly identicky jako u kmene *E. faecalis*.

4.2.13.3. Příprava *in vitro* translačního systému pro *Enterococcus faecalis* – optimalizovaný protokol

In vitro translační systém byl připraven smícháním odsoleného lyzátu s reakční směsí v poměru 1:1. Reakční směs obsahovala 12 mM $Mg(OAc)_2$, 90 mM HEPES (pH 8,2), 30 mM K_2HPO_4 (pH 7,22), 135 mM glutamátu draselného, 120 mM NH_4OAc , 30 $mg \cdot mL^{-1}$ PEG-8000, 1,8% (w/v) glukosy, 3 mM DTT, 3 mM každé z 20 aminokyselin, 0,1 mM kyseliny folinové, 3,5 mM ATP, 2,55 mM GTP, CTP a UTP, 3 $\mu g \cdot mL^{-1}$ plazmidu pIVEX2.3MCs FFluc a 1,5 μM rekombinantní T7 RNAP. Celkový objem reakce byl 30 μ l. Připravená směs byla inkubována při 37 °C a 500 RPM po dobu 45 minut. Následně bylo 10 μ L reakční směsi smícháno s 50 μ L činidla Steady-Glo Luciferase Assay (Promega) při RT. Luminiscence byla následně měřena na přístroji GloMax 20/20 Luminometer (Promega).

4.2.14. Ribozomální profil

4.2.14.1. Ribozomální profil pro detekci LmrC na ribozomech

1. Příprava buněčné kultury

Spory testovaných kmenů byly germinovány a inokulovány do YEME média. Velikost kultury byla optimalizována dle následného využití připravených buněk – 250 ml YEME média bylo použito pro kopurifikační experimenty a 70 ml pro ribozomální profil. Kultivace probíhala při 30 °C a 220 RPM po dobu 17 hodin. Následně byla indukována produkce LmrC nebo jeho ATPáza deficientní varianty LmrC_{EQ12} přidáním Theo (finální koncentraci 6mM). Současně s indukcí byl k vybraným kulturám přidán LIN (*S. coelicolor* M1154 (finální koncentrace 0,25 mg.l⁻¹), *S. coelicolor* M145 (finální koncentrace 8 mg.l⁻¹)). Indukce probíhala 3–4 hodiny a kultury byly následně centrifugovány (1 500 g, 20 min, 4 °C). Získaný buněčný pelet byl uchován při -80 °C. Lyze buněk a následné zpracování vzorků bylo provedeno Mgr. Jakubem Lenartem Ph.D, kterému jsem v případě potřeby asistovala, a to buď pomocí Emulsiflexu C3 (Avestin), nebo FastPrepu-24TM (MP Biomedicals). V případě kopurifikace proteinu LmrC s ribozomy spolupracovala na této části také Mgr. Jana Veselá.

2. Příprava sacharózového gradientu

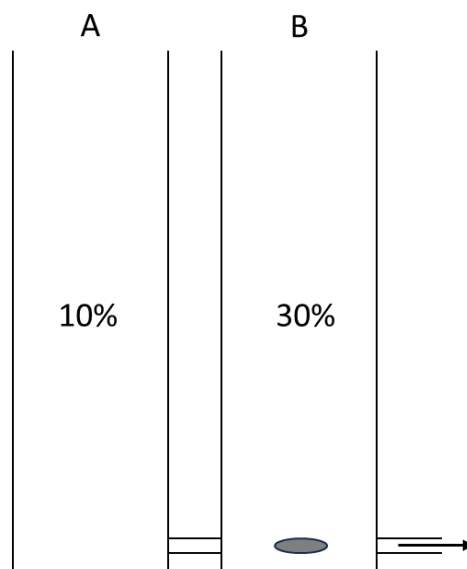
Pro analýzu ribozomálního profilu byl připraven lineární sacharózový gradient (10%–30% (w/v)) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT (pH 7,7). Gradient byl vytvořen pomocí nástroje Hoefer SG50 (schéma je znázorněno na Obr. 24). Roztoky byly nanесeny do příslušných rezervoárů a gradient byl připraven jejich pomalým mísením. Připravené gradienty byly vychlazeny a stabilizovány při 4 °C po dobu minimálně dvou hodiny.

3. Separace a analýza

Koncentrace celkové RNA ve vzorcích byla stanovena pomocí QubitTM RNA HS (Invitrogen). Vzorky byly naředěny na jednotnou koncentraci a nanесeny na připravený gradient. Separace probíhala pomocí ultracentrifugace (20 000 RPM (rotor SW41Ti (Beckman)), 18 hod, 4 °C).

Ribozomální profily byly analyzovány pomocí manuálního frakcionátoru připojeného k peristaltické pumpě a UV-VIS detektoru (LCD 5000-PiKRON). Absorbance byla měřena při 260 nm a zaznamenána programem CHOMuLAN 0.91. Gradient byl rozdělen do 1 ml frakcí.

K jednotlivým frakcím bylo přidáno 100 μl 100% kyseliny trichloroctové (TCA). Vzorky byly inkubovány přes noc při -20 °C a následně centrifugovány (15 000 g, 10 min, 4 °C). Vzniklý sediment byl dvakrát promyt 100 μl předmraženého acetonu. Po poslední centrifugaci byl zbylý aceton samovolně odpařen a pelet resuspendován v 50 μl 8M močoviny. Vzorky byly smíchány s 3x SDS-PAGE vzorkovým pufrem, zahřáty na 98 °C po dobu 10 minut a analyzovány pomocí SDS-PAGE s následnou imunodetekcí.



Obrázek 24: Schématické znázornění nástroje Hoefer SG50. Při přípravě sacharózového gradientu byly do rezervoárů naneseny roztoky o uvedených koncentracích. Šedivě je znázorněno malé magnetické míchadlo, které zajišťovalo mísení roztoků.

4.2.14.2. Ribozomální profil translačního lyzátu

Aktivita odsoleného translačního lyzátu pro *in vitro* translační systém byla po rozmražení na ledu analyzována pomocí 7%–35% (w/v) sacharózového gradientu. Gradient byl připraven v lyzačním pufru obsahujícím 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 50mM NH₄Cl, 8mM MgCl₂, 0,5mM PMSF a 1mM DTT. Do ultracentrifugační zkumavky byl nejprve nanesen 7% roztok sacharózy, který byl následně podvrstven 35% roztokem. Vytvoření lineárního gradientu bylo provedeno automaticky pomocí přístroje Biocomp Gradient Station (BioComp Instruments) dle doporučeného programu výrobce.

Na vychlazený 7%–35% sacharózový gradient byly naneseny 3 A₂₆₀ jednotky vzorku. Separace byla provedena ultracentrifugací (35 000 RPM (SW41Ti (Beckman), 3 hod, 4 °C). Ribozomální profil byl následně analyzován měřením absorbance při 260 nm a 280 nm pomocí přístroje Biocomp Gradient Station.

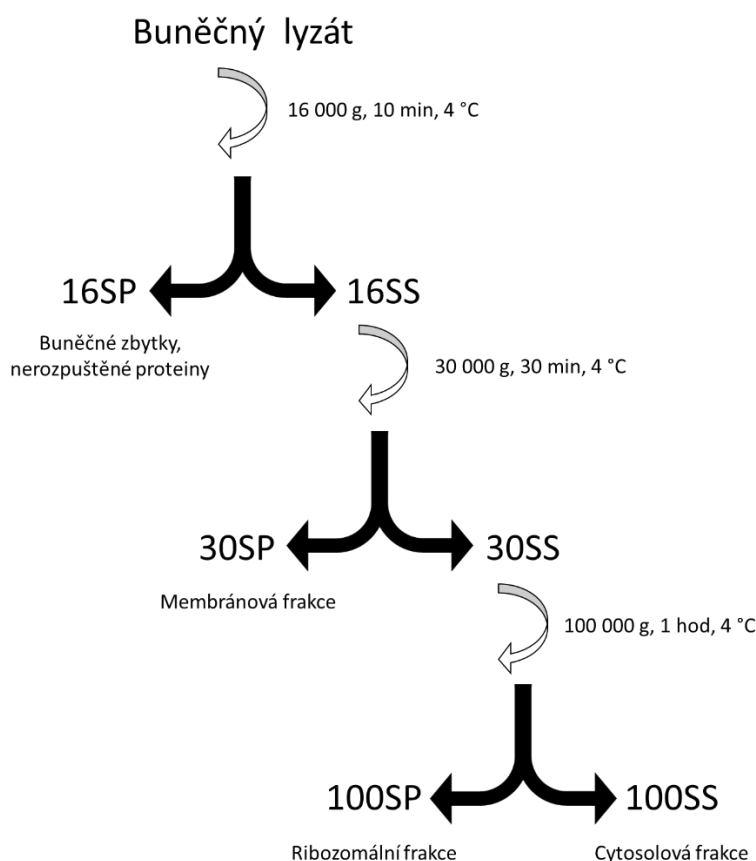
4.2.15. Subcelulární frakcionace a analýza distribuce LmrC

V rámci této práce byla provedena separace buněčných komponent pomocí postupné centrifugace za účelem stanovení lokalizace proteinu LmrC a jeho ATPáza deficientní varianty LmrC_{EQ12}. Pro experimenty byly použity kmeny *S. lincolnensis* + C_C, *S. coelicolor* M1154 + C_i, *S. coelicolor* M1154 + C_{EQ12i}, *S. coelicolor* M145 + C_i, *S. coelicolor* M145 + C_{EQ12i}. Jako negativní kontrola byly použity kmeny nesoucí prázdný plazmid pIJ10257.

Kultivace zahrnovala dvě fáze. Primární kultivace byla zahájena inokulací 20 ml YEME média germinovanými spory testovaného kmene na OD₄₅₀ ≈ 0.05. Kultura byla inkubována po dobu 24 hodin při 30 °C a 220 RPM. Následně byla připravena sekundární kultura inokulací 1 l YEME média primární kulturou. Kultivace probíhala za stejných podmínek (30 °C, 220 RPM) po dobu 24 hodin. Následně byla produkce LmrC nebo jeho ATPáza deficientní varianty LmrC_{EQ12} indukována přidáním Theo do finální koncentrace 3 mM. Po indukcii byly kultury inkubovány dalších 6 hodin. Kultivace probíhala buď za standardních podmínek

bez přídavku LIN, nebo v přítomnosti subinhibiční koncentrace LIN (*S. coelicolor* M1154 (finální koncentrace 0,25 mg.l⁻¹), *S. coelicolor* M145 (finální koncentrace 8 mg.l⁻¹)), nebo s přídavkem 1 mM ATP. Po ukončení kultivace byla buněčná suspenze centrifugována (4 000 g, 10 min, 4 °C) a vzniklý buněčný pelet byl uschován při -80 °C.

Buněčné pelety byly rozmrazeny a promyty Roztokem I. Následně byly buňky resuspendovány v Roztoku II. Buněčná lyze byla provedena pomocí sonikace (3 × 40 s) na přístroji UP200S Hielscher Ultrasonic GmbH. Mezi jednotlivými cykly byly vzorky chlazeny na ledu. Získaný lyzát byl frakcionován sérií centrifugačních kroků dle schématu uvedeného na Obr. 25. Vzniklé pelety byly rychle opláchnuty Roztokem II a následně resuspendovány v 2x SDS-PAGE vzorkovém pufru. Vzorky supernatantu byly smíchány s 2x SDS-PAGE vzorkovým pufrům. Všechny vzorky byly denaturovány při 98 °C po dobu 10 minut. V takto připravených vzorcích byla analyzována přítomnost proteinu LmrC a jeho variant spolu s ribozomálním proteinem S7 pro ověření jejich koexistence ve stejných buněčných frakcích. Množství vzorku nanesených na gel bylo odvozeno od procesu jejich přípravy zachovávající vzájemné poměry.



Obrázek 25: Schématické znázornění subcelulární frakcionace buněčného lyzátu.

4.2.16. Fylogenetická analýza ARE5 ABCF proteinů

V této analýze se vycházelo z publikované databáze fylogenetické analýzy ABCF proteinů (25). Do tohoto souboru dat byly doplněny sekvence ARE5 proteinů z bakteriálních kmenů zkoumaných v této dizertační práci, pokud ve výchozím souboru chyběly. Doplnující sekvence byly identifikovány pomocí nástroje BlastP (dotazovaná sekvence: TiaA (NP_624946.1)). Aminokyselinové sekvence byly převedeny do FASTA formátu pomocí připraveného skriptu v jazyce Bash. Pro takto připravenou databázi bylo v programu

MAFFT 7.526 (255) provedeno mnohočetné přiřazení sekvencí metodou FFT-NS-i. Poté byly odstraněny pozice obsahující více než 60% mezer za využití nástroje TrimAl v1.4.rev15 (260). Následně byly vyřazeny sekvence, které byly buď identické, nebo obsahovaly více než 45% mezer. Finální databáze obsahovala 401 sekvencí o 538 pozicích.

Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximální pravděpodobnosti (ML–Maximum Likelihood) v programu RAxML–NG v.1.2.2 (259). Pro analýzu byl použit substituční model LG+I+G4, vybraný pomocí nástroje ModelTest–NG v.0.1.7 (256). Statistická podpora topologie stromu byla určena bootstrapovou analýzou s 200 opakováními (s parametrem –seed 568317). Výsledný fylogenetický strom byl vizualizován a upraven v internetovém nástroji iTOL v.6.9 (254). Pro finální úpravu byl použit program GIMP 2.10.

5. Výsledky

Experimentální část této práce přímo navazuje a rozšiřuje data získaná v rámci mé diplomové práce a dělí se do tří částí. První se zabývá úlohou ARE5 proteinu LmrC v biosyntetické draze LIN u *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Tato část je shrnuta v publikaci „Beyond Self-Resistance: ABCF ATPáza LmrC Is a Signal-Transducing Component of an Antibiotic-Driven Signaling Cascade Accelerating the Onset of Lincomycin Biosynthesis” (Koběřská M. et al. 2021; (172)). Článek je přiložen k dizertační práci jako Příloha 1. Druhá část rozšiřuje poznatky získané o ARE5 ABCF proteinech na organismus *Streptomyces coelicolor* M145. Získané výsledky jsou součástí druhé publikace s názvem „ABCF Protein-Mediated Resistance Shapes Bacterial Responses to Antibiotic Based on Their Type and Concentration” (Koběřská M. et al 2025; Příloha 2; (268)). Poslední část se zaměřuje na optimalizace týkající se metodiky, která měla být použita buď pro budoucí *in vitro* experimenty, které se měly týkat charakterizace jednotlivých subdomén proteinu LmrC, nebo sloužit k určení buněčné lokalizace proteinu LmrC a jeho interakce s ribozomy.

5.1. Úloha proteinu LmrC v rezistenční fenotypu producenta linkomycinu

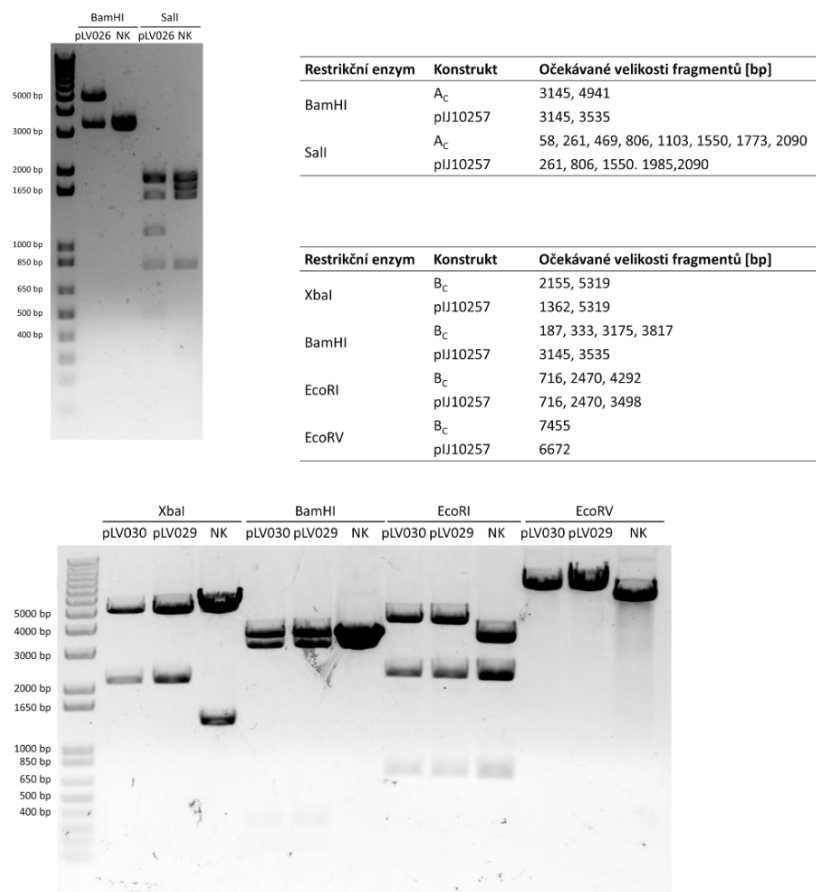
Gen pro protein LmrC je situován na konci BGC pro syntézu linkomycinu u *S. lincolnensis* ATCC 25466 (Obr. 11A). Spolu s ním jsou v klastru lokalizovány dva další rezistenční geny – *lmrA* a *lmrB*. V dřívějších pracích byla na základě heterologní exprese potvrzena rezistenční funkce MFS transportéru LmrA a monometyltransferázy LmrB (Kap. 2.2.3; (179)). Také pro LmrC bylo v heterologním hostiteli *Streptomyces lividans* TK23 pozorováno zvýšení rezistence k LIN (164). Přesný příspěvek jednotlivých proteinů k celkové úrovni rezistence producenta však testován nebyl. Úloha jednotlivých proteinů v ochraně *S. lincolnensis* před produkovaným antibiotikem je maskována rezistencí udílenou ostatními rezistenčními proteiny. Proto byla pro odhalení úrovně, kterou jednotlivé rezistenční proteiny přispívají k celkové rezistenci kmene, připravena ucelená sada bakteriálních jednoduchých a vícenásobných delečních mutantů a komplementovaných kmenů, která nám umožnila charakterizaci všech tří proteinů zapojených v udílení rezistence.

5.1.1. Příprava bakteriálních kmenů a konstruktů

Pro přípravu sady bakteriálních kmenů byly využity kmeny s inaktivovanými rezistenčními geny. Tyto kmeny byly dříve vytvořeny v naší laboratoři Mgr. Markétou Koběřskou Ph.D. pomocí metody REDIRECT PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2); (242) využívající λ -RED rekombinační systém optimalizovaný pro použití v bakteriálním rodě *Streptomyces*. Příprava inaktivovaných kmenů, konkrétně kmenů ΔA , ΔB , ΔC , ΔAB , ΔAC a ΔBC (Tab. 1), byla provedena Mgr. Markétou Koběřskou Ph.D. V rámci této dizertační práce byly výše zmíněné kmeny komplementovány *in trans* za použití komplementačních plazmidů.

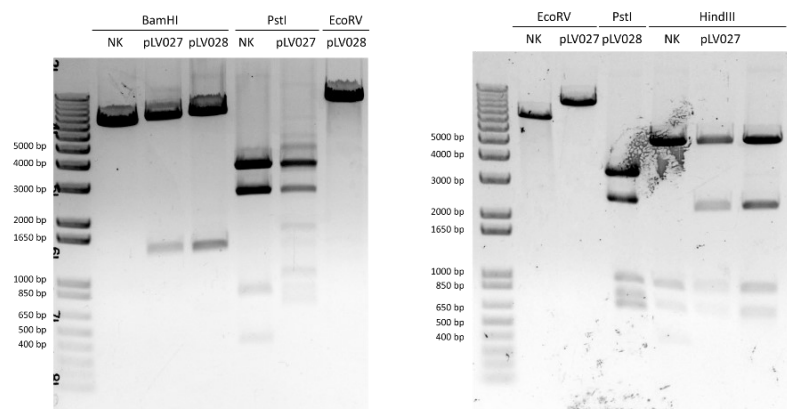
Pro komplementaci delečních mutantů byl využit dříve připravený plazmid pLV018 konstitutivně exprimující gen *lmrC* (dále značen jako C_C). Nově byl připraven konstrukt pLV026, zajišťující konstitutivní expresi genu *lmrA* (dále značen A_C) a plazmid pLV030 nesoucí gen *lmrB* (dále značen B_C). Pro přípravu těchto konstruktů byly geny *lmrA* a *lmrB* amplifikovány z kosmidu LK6 pomocí navržených primerů LmrAForpIJ10257, LmrARevIpIJ10257, LmrBForpIJ10257 a LmrBRevIpIJ10257 (Tab. 4). Primery ve své 5'koncové části obsahovaly sekvenci rozeznávanou buď endonukleázou NdeI, nebo HindIII. Vzniklé PCR

produkty o velikostech 1473 bp a 857 bp byly vloženy do linearizovaného integrativního vektoru pIJ10257 pod kontrolu konstitutivního promotoru *ermE** přes restrikční místa NdeI a HindIII za použití T4 DNA ligázy (Kap. 4.2.4.8.). Úspěšnost ligace byla ověřena koloniovou PCR (Kap. 4.2.4.5.) a po izolaci plazmidové DNA (Kap. 4.2.4.3.) i prostřednictvím restrikční analýzy (Kap. 4.2.4.7; Obrázek 26). Následně byla správnost sekvence inzertu potvrzena sekvenačně (Kap. 4.2.4.9.). Spolu s plazmidem pLV030 byla připravena a ověřena jeho identická kopie označená jako pLV029.



Obrázek 26: Ověřovací restrikční analýza plazmidů pLV026, pLV029 a pLV030. DNA elektroforéza (1% (w/v) agarosový gel) vzniklých fragmentů po ověřovací restrikční analýze za využití endonukleáz BamHI, Sall, XbaI, EcoRI a EcoRV. Předpokládané délky fragmentů jsou uvedeny v tabulce. Jako negativní kontrola (NK) byl využit prázdný plazmid pIJ10257.

Aby bylo možné vložit dva geny do jednoho bakteriálního kmene, bylo potřeba připravit plazmid, který se vkládá do jiného místa v chromosomu. Gen *lmrC* byl amplifikován včetně promotorové oblasti z plazmidu pLV018 (Kap. 4.2.4.5.) a vložen do vektoru pIJ6902. Vektor pIJ6902 je odvozený od jiného bakteriofága (ΦC31) a je tedy kompatibilní s plazmidy pIJ10257, pMS81 a od nich odvozených komplementačních vektorů, které v sobě nesou integrázu z bakteriofága ΦBT1 (130, 249). Pro amplifikaci byly využity primery *ermLmrCpIJ6902F* a *ermLmrCpIJ6902R* (Tab. 4). Amplifikovaný úsek byl vložen mezi restrikční místa EcoRI a BglII. Správnost získaného konstruktů byla ověřena restrikční analýzou (Obr. 27) s následnou sekvenací. Vzniklý konstrukt pLV028 je dále značen jako C_{C2}. Spolu s plazmidem pLV028 byla připravena a ověřena jeho identická kopie označená jako pLV027.



Restrikční enzym	Konstrukt	Očekávané velikosti fragmentů [bp]
BamHI	C _{C2}	1414, 7656
	pIJ6902	7120
PstI	C _{C2}	670, 716, 806, 972, 2576, 3346
	pIJ6902	404, 806, 2576, 3346
HindIII	C _{C2}	727, 973, 2371, 5007
	pIJ6902	425, 727, 973, 5007
EcoRV	C _{C2}	9062
	pIJ6902	7120

Obrázek 27: Ověřovací restrikční analýza plazmidů pLV027 a pLV028. DNA elektroforéza (1% (w/v) agarosový gel) vzniklých fragmentů po ověřovací restrikční analýze za využití endonukleáz BamHI, PstI, HindIII a EcoRV. Předpokládané délky fragmentů jsou uvedeny v tabulce. Jako negativní kontrola (NK) byl využit prázdný plazmid pIJ10257.

Konstrukty připravené v rámci této dizertační práce doplňují dříve připravené komplementační plazmidy (Kap. 4.1.3; (269)). Pro vnesení vektorů do recipientních kmenů byla využita metoda mezidruhové konjugace (Kap. 4.2.3.). Plazmidy byly prostřednictvím mezidruhové konjugace vloženy i do heterologního hostitele *Streptomyces coelicolor* M1154 citlivého k linkosamidovým antibiotikům a *Streptomyces coelicolor* M145. Seznam připravených bakteriálních kmenů v rámci této části práce je uveden v (Tab. 29). Tyto kmeny doplnily dříve vzniklé kmeny připravené v rámci mé diplomové práce (*S. lincolnensis* + C_C, *S. lincolnensis* + pMS81, *S. lincolnensis* + pIJ10257, ΔB + B_n, ΔB + pMS81, ΔBC + B_n, ΔBC + C_n, ΔBC + pMS81, *S. coelicolor* M1154 + C_C, *S. coelicolor* M1154 + pIJ10257). Tím došlo k přípravě ucelené sady bakteriálních kmenů vhodné k posouzení vlivu jednotlivých rezistenčních proteinů k celkové rezistenci kmene.

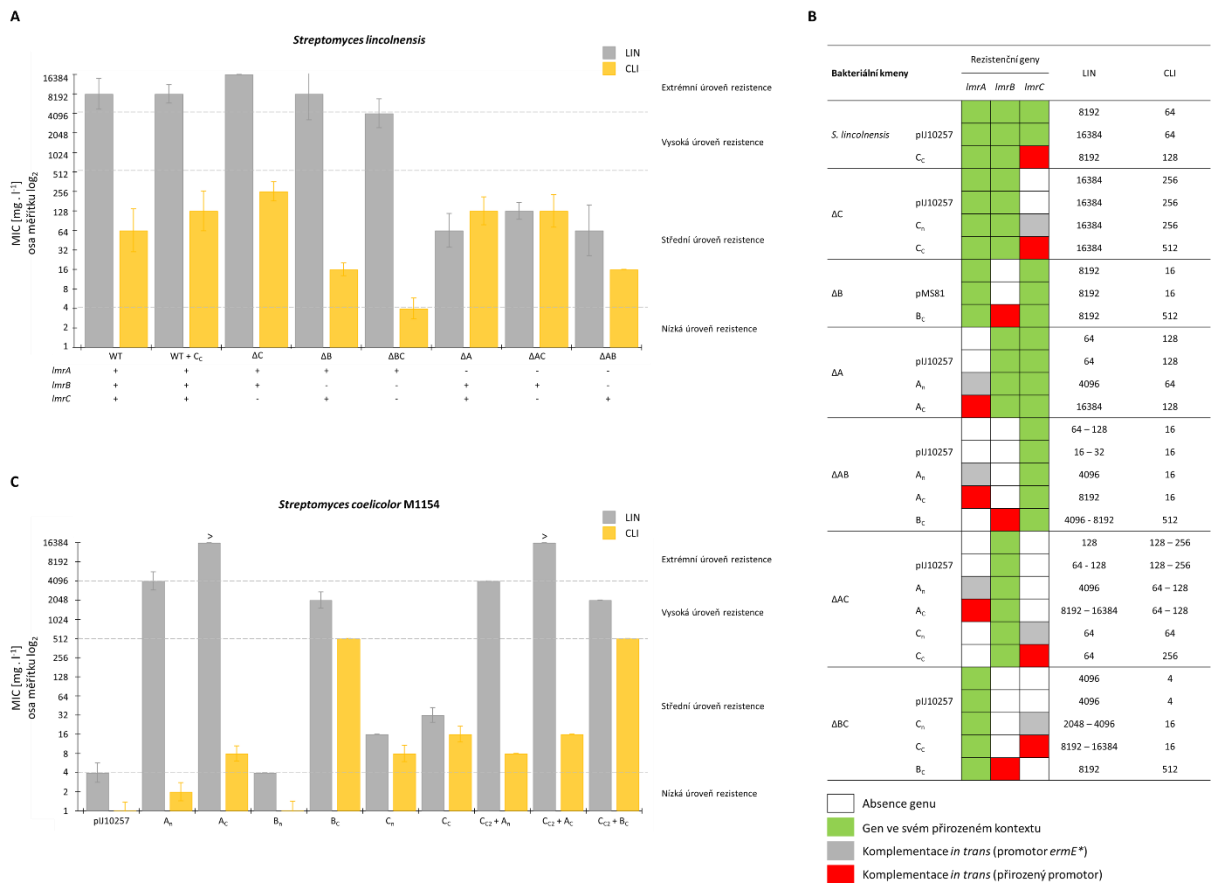
Tabulka 29: Seznam připravených bakteriálních kmenů

Bakteriální kmen	Charakteristika	Konjugovaný plazmid	Recipientní kmen
<i>S. lincolnensis</i> + Ac (BN3697)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257:: <i>lmrA</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV026	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
<i>S. lincolnensis</i> + Bc (BN3698)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257:: <i>lmrB</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV030	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
<i>S. lincolnensis</i> + pIJ10257 + pIJ6902 (BN3741)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257, Hyg ^r) (pIJ6902, Apra ^r)	pIJ6902	BN3536
ΔA + A _n (BN3545)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r (pMS81:: <i>lmrA</i> s 1,330 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV012	BN3024
ΔA + Ac (BN3539)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrA</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV026	BN3024
ΔA + pMS81 (BN3661)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r (pMS81, Hyg ^r)	pMS81	BN3024
ΔA + pIJ10257 (BN3656)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r (pIJ10257, Hyg ^r)	pIJ10257	BN3024
ΔB + Bc (BN3692)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrB</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrB</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV030	BN3002
ΔB + Cc (BN3515)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrB</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrC</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV018	BN3002
ΔC + C _n (BN3580)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pMS81:: <i>lmrC</i> s 1,281 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV017	BN3001
ΔC + Cc (BN3583)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrC</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV018	BN3001
ΔC + pIJ10257 (BN3577)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257, Hyg ^r)	pIJ10257	BN3001
ΔC + pMS81 (BN3574)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pMS81, Hyg ^r)	pMS81	BN3001
ΔAB + A _n (BN3619)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r Δ <i>lmrB</i> ::FLP (pMS81:: <i>lmrA</i> s 1,330 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV012	BN3021
ΔAB + Ac (BN3615)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r Δ <i>lmrB</i> ::FLP (pIJ10257:: <i>lmrA</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV026	BN3021
ΔAB + B _n (BN3621)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r Δ <i>lmrB</i> ::FLP (pMS81:: <i>lmrB</i> s 86 bp dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV013	BN3021
ΔAB + Bc (BN3617)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r Δ <i>lmrB</i> ::FLP (pIJ10257:: <i>lmrB</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV030	BN3021
ΔAB + pMS81 (BN3565)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r Δ <i>lmrB</i> ::FLP (pMS81, Hyg ^r)	pMS81	BN3021
ΔAB + pIJ10257 (BN3650)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrA</i> ::Apra ^r Δ <i>lmrB</i> ::FLP (pIJ10257, Hyg ^r)	pIJ10257	BN3021
ΔBC + Bc (BN3690)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrB</i> ::FLP Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrB</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV030	BN3008
ΔBC + pIJ10257 (BN3563)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrB</i> ::FLP Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257, Hyg ^r)	pIJ10257	BN3008

Δ AC + A _n (BN3682)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ lmrA::Apra ^r Δ lmrC::FLP (pMS81::lmrA s 1,330 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV012	BN3018
Δ AC + A _c (BN3686)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ lmrA::Apra ^r Δ lmrC::FLP (pIJ10257::lmrA pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV026	BN3018
Δ AC + C _n (BN3684)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ lmrA::Apra ^r Δ lmrC::FLP (pMS81::lmrC s 1,281 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV017	BN3018
Δ AC + C _c (BN3688)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ lmrA::Apra ^r Δ lmrC::FLP (pIJ10257::lmrC pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV018	BN3018
Δ AC + pMS81 (BN3666)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ lmrA::Apra ^r Δ lmrC::FLP (pMS81, Hyg ^r)	pMS81	BN3018
Δ AC + pIJ10257 (BN3670)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ lmrA::Apra ^r Δ lmrC::FLP (pIJ10257, Hyg ^r)	pIJ10257	BN3018
<i>S. coelicolor</i> M1154 + A _n (BGD3557)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pMS81::lmrA s 1,330 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV012	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + B _n (BGD3559)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pMS81::lmrB s 86 bp dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV013	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + C _n (BGD3561)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pMS81::lmrC s 1,281 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV017	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + A _c (BGD3592)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257::lmrA pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV026	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + B _c (BGD3623)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257::lmrB pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV030	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + C _{c2} (BGD3594)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ6902::lmrC pod kontrolou ermEp, Apra ^r)	pLV028	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + A _c + C _{c2} (BGD3606)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ6902::lmrC pod kontrolou ermEp, Apra ^r) (pIJ10257::lmrA pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV028	BGD3592
<i>S. coelicolor</i> M1154 + B _c + C _{c2} (BGD3610)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ6902::lmrC pod kontrolou ermEp, Apra ^r) (pIJ10257::lmrB pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV028	BGD3623
<i>S. coelicolor</i> M1154 + A _n + C _{c2} (BGD3652)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ6902::lmrC pod kontrolou ermEp, Apra ^r) (pMS81::lmrA s 1,330 kb dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV012	BGD3594
<i>S. coelicolor</i> M1154 + B _n + C _{c2} (BGD3654)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ6902::lmrC pod kontrolou ermEp, Apra ^r) (pMS81::lmrB s 86 bp dlouhou oblastí předcházející gen, Hyg ^r)	pLV013	BGD3594
<i>S. coelicolor</i> M1154 + pMS81 (BGD3558)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pMS81, Hyg ^r)	pMS81	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + pIJ6902 (BGD3596)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ6902, Apra ^r)	pIJ6902	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M145 + C _c (BGD3604)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257::lmrC pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV018	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + B _c (BGD3721)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257::lmrB pod kontrolou ermEp, Hyg ^r)	pLV030	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + pIJ10257 (BGD3598)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257, Hyg ^r)	pIJ10257	<i>S. coelicolor</i> M145

5.1.2. Stanovení citlivosti

Pro určení podílu jednotlivých rezistenčních proteinů na celkové odolnosti *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 k linkosamidům byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) k LIN a jeho semisyntetickému derivátu CLI pomocí agarové diluční metody na standardním MH agaru (Kap.4.2.8.1.). Pro každý kmen byla provedena minimálně tři nezávislá měření.



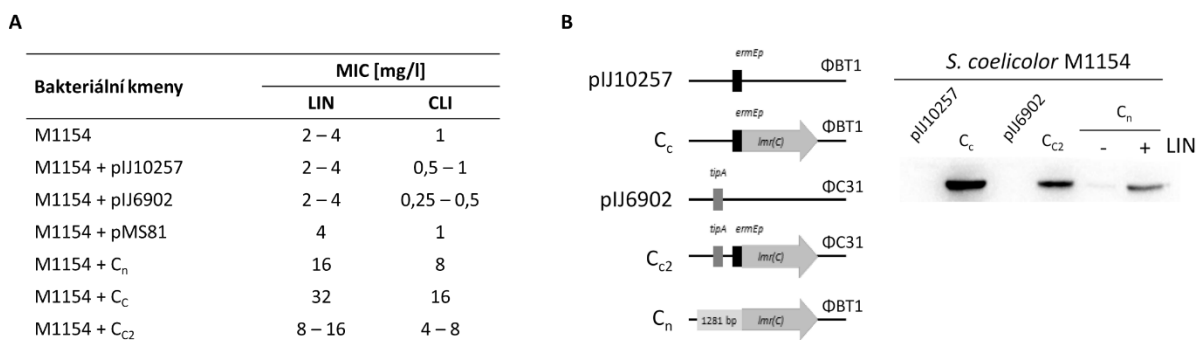
Obrázek 28: Naměřené hodnoty MIC. (A) Graf ukazující stanovené hodnoty MIC pro LIN (šedá) a CLI (žlutá) u kmenů *S. lincolnensis* ATCC 25466 (WT), *S. lincolnensis* ATCC 25466 + *C_c* (WT + *C_c*) a delečních mutantů. (B) Tabulka ukazující naměřené hodnoty MIC pro testované kmeny *S. lincolnensis* včetně jejich komplementací. (C) Graf ukazující stanovené hodnoty MIC pro LIN (šedá) a CLI (žlutá) při konstitutivní expresi genů *lmrA*, *lmrB* a *lmrC* v heterologním hostiteli *S. coelicolor* M1154.

Všechny kmeny nesoucí gen *lmrA* měly velmi vysokou až extrémní úroveň rezistence vůči LIN, rezistence ke CLI se však nezměnila (Obr. 28A). Jeho absence (ΔA , ΔAB , ΔAC) byla naopak doprovázena významným snížením hladiny rezistence ($MIC_{LIN} = 64-128 \text{ mg.l}^{-1}$). Toto snížení nebylo významně ovlivněno tím, jaký ze zbylých rezistenčních proteinů byl přítomen. Pozorovaný fenotyp byl potvrzen i komplementací mutant příslušnými geny pod kontrolou přirozeného i konstitutivního promotoru (Obr. 28B). Protein LmrA významně zvyšoval rezistenci pouze k LIN také při heterologní expresi v citlivém hostiteli *S. coelicolor* M1154, a to neohledě na skutečnost, zda byl exprimován z konstitutivního nebo přirozeného promotoru (Obr. 28C). Dle očekávání MIC hodnoty kmene nesoucího konstrukt s přirozenou expresí byly nižší než při konstitutivní expresi, ale stále dosahovaly velmi vysokých hodnot ($MIC_{LIN} = 4096 \text{ mg.l}^{-1}$). Hladinu rezistence udílenou LmrA neovlivňovala ani přítomnost *lmrC*. Na základě stanovených MIC hodnot pro oba

linkosamidy předpokládáme, že LmrA je vysoce specifickým LIN transportérem, který je v zásadě dostačující pro ochranu producenta před produkovaným antibiotikem.

Protein LmrB vykazoval vysokou hladinu rezistence vůči oběma testovaným linkosamidům pokud byl konstitutivně produkován v *S. coelicolor* M1154 (B_C , $C_{C2} + B_C$; Obr. 28C). Avšak v přirozeném kontextu významně přispíval, na rozdíl od proteinu LmrA, jen k rezistenci vůči CLI (Obr. 28A). Rezistence ke CLI byla v deleční mutantě ΔAC , kde byl aktivní jen gen *lmrB*, srovnatelná s WT (*S. lincolnensis*). Při komplementaci *lmrB* pod konstitutivním promotorem se rezistence, v závislosti na konkrétním kmeni, zvýšila až na hodnoty 256–512 mg.l⁻¹. Naopak při komplementaci plazmidem nesoucím 86 bp nekódující úsek předcházející gen *lmrB* (B_n), nedošlo k nárůstu rezistence ani v citlivém heterologním hostiteli *S. coelicolor* M1154 ($MIC_{LIN} = 4$ mg.l⁻¹, $MIC_{CLI} = 1$ mg.l⁻¹) ani k obnovení rezistenčního fenotypu WT u *S. lincolnensis*. Dle uspořádání genů v BGC pro linkomycín (Obr. 38) lze předpokládat, že *lmrB* je prepisován spolu s geny *lmbX*, *lmbY* a *lmbU* z promotoru před genem *lmbU*. Tento předpoklad potvrzuje i rozložení predikovaných operonů v rámci BGC (163). Následně byl tento předpoklad ověřen Mgr. Vladimírem Vimbergem Ph.D. pomocí RT-PCR (172).

Heterologní produkce LmrC vedla ke střední úrovni rezistence k LIN i CLI (Obr. 28C). V kontextu BGC však LmrC přispíval k celkové rezistenci pouze zanedbatelně. Porovnání kmenů (ΔA vs. ΔAC a ΔB vs. ΔBC) ukázalo, že LmrC udílí nižší úroveň rezistence než proteiny LmrA a LmrB. Samotná delece genu *lmrC* (ΔC) vedla k nepatrnému zvýšení rezistence k oběma testovaným antibiotikům. Při stanovení MIC byly použity tři konstrukty exprimující gen *lmrC* buď z přirozeného promotoru nebo z konstitutivního promotoru *ermE** (C_n , C_C a C_{C2}). Pro ověření, že konstrukty C_C a C_{C2} s konstitutivní expresí vedou k podobné úrovni rezistence, byla opět použita agarová diluční metoda. Pro porovnání byl použit citlivý heterologní hostitel *S. coelicolor* M1154 (Obr. 29A). Vložení prázdných vektorů nemělo na míru rezistence vliv či vedlo k nepatrnému zvýšení citlivosti. K nejvyššímu nárůstu rezistence došlo u kmene *S. coelicolor* M1154 + C_C . Oba zbylé konstrukty vykazovaly nepatrně nižší míru rezistence k oběma linkosamidům. Produkce proteinu LmrC byla u jednotlivých kmenů ověřena pomocí specifické protilátky proti proteinu LmrC (Obr. 29B). K vyšší míře exprese docházelo u kmene *S. coelicolor* M1154 + C_C , což odpovídalo stanoveným MIC. Nižší míra produkce proteinu LmrC u kmenů *S. coelicolor* M1154 + C_{C2} a *S. coelicolor* M1154 + C_n v porovnání s *S. coelicolor* M1154 + C_C odrážela nižší hodnoty MIC. U kmene *S. coelicolor* M1154 + C_{C2} byla produkce LmrC mírně vyšší než u *S. coelicolor* M1154 + C_n , ale pravděpodobně nedostatečná k významnému ovlivnění hodnot MIC.



Obrázek 29: Porovnání konstruktů exprimujících gen *lmrC*. (A) Stanovené hodnoty MIC pro LIN a CLI u kmenu *S. coelicolor* M1154 obsahující různé varianty vektorů použitých pro expresi genu *lmrC*, nebo příslušný prázdný vektor. Hodnoty stanoveny pomocí agarové diluční metody. (B) Imunoblot znázorňující rozdílnou míru produkce proteinu LmrC u různých konstruktů. Nanáška byla normalizována pomocí SDS-PAGE. Detekce proteinu LmrC byla provedena dvojkrokovou imunodetekcí za využití specifické protilátky proti proteinu LmrC. V levé části jsou schematická znázornění použitých vektorů pro expresi genu *lmrC*.

Z výše stanovených MIC hodnot se zdá, že LmrC není pro odolnost producenta klíčový. Přesto je v rámci LIN BGC konzervovaný. To napovídá, že LmrC je i přes svou nízkou schopnost udílet rezistenci k LIN a CLI u *S. lincolnensis* důležitý. Výše stanovené hodnoty MIC byly získány zaočkováním sporové suspenze. Tyto výsledky nemusí přesně odrážet situaci během produkce LIN. Můžou spíš vypovídat o schopnosti spor klíčit v přítomnosti antibiotik. Pro ověření, zda stanovené rezistence odráží i vlastnosti rostoucího mycelia, byla pro WT a všechny deleční mutanty (*S. lincolnensis*, ΔA , ΔB , ΔC , ΔAB , ΔAC a ΔBC) stanovena MIC mycelia různého stáří – odebraného po 42 hodinách a po 162 hodinách kultivace. Metodika testování citlivostí byla identická s předešlým případem, jen místo sporové suspenze bylo použité mycelium narostlé v tekutém médiu. Hodnoty MIC získané pro mycelia vykazovaly stejné tendence pozorované pro sporové suspenze. Dále bylo zjištěno, že se rezistence kmenů zvyšuje v průběhu produkční fáze (162 hodin) oproti časnější růstové fázi (42 hodin).

5.1.3. Specifita antibiotické rezistence zprostředkovaná LmrC

Proteiny ARE5 skupiny ABCF jsou známé svou schopností udílet rezistenci k LS_{AP} antibiotikům. Síla rezistence se liší mezi jednotlivými proteinovými zástupci a není pro všechny antibiotické třídy stejná. Například varianty proteinu VgaA (ARE1 podrodina) vykazují odlišnou míru rezistence k jednotlivým LS_{AP} antibiotikům, přestože se na aminokyselinové úrovni příliš neliší (230).

Pro objasnění schopnosti proteinu LmrC udílet rezistenci k jednotlivým antibiotickým skupinám byly u vybraných kmenů *S. lincolnensis* a *S. coelicolor* stanoveny hodnoty MIC pro antibiotika pokrývající celou škálu antibiotických tříd, ke kterým ARE ABCF proteiny udílí rezistenci – linkosamidy (LIN a CLI), streptograminy A (PIIA) a B (PIA), pleuromutiliny (TIA), makrolidová antibiotika (ERY, telitromycin (TELI), amfenikoly (CAM) a puromycin (PURO) spadající mezi aminonukleosidová antibiotika. Tyto antibiotika byla doplněna o tetracyklín (TET) a kontrolní karbenicilin (CARB), který inhibuje syntézu buněčné stěny. MIC hodnoty byly stanoveny pomocí agarové diluční metody.

Testování ukázalo, že konstitutivní exprese *lmrC* v organismu *S. coelicolor* M145 měla také za následek zvýšení rezistence vůči linkosamidovým antibiotikům (Obr. 30A). U ostatních testovaných antibiotik nebyly zaznamenány významné změny rezistenčního fenotypu, a to ani po deleci genu *lmrC*, jeho nadprodukcí, či heterologní expresi v kmenech *S. coelicolor* M145 a *S. coelicolor* M1154. *S. lincolnensis* je v porovnání

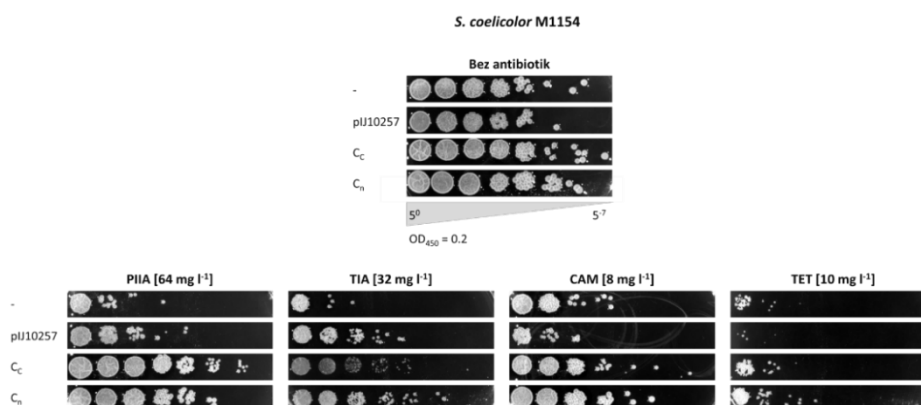
s kmeny *S. coelicolor* výrazně citlivější k TIA. Delece genu *lmrC* ani jeho konstitutivní exprese ovšem nevedla k výrazné změně rezistence k tomuto antibiotiku, což může být způsobeno přítomností genu *slinc7152* v genomu bakterie *S. lincolnensis*, který kóduje druhý ARE5 ABCF protein. Potenciální schopnost LmrC udílet rezistenci k TIA je pak při jeho heterologní expresi maskována vysokou úrovní rezistence hostitelského kmene.

Prostřednictvím kapkového testu (Kap. 4.2.9.) bylo pro kmen *S. coelicolor* M1154 detekováno slabé zlepšení růstu v přítomnosti PIIA u kmenů exprimujících *lmrC* (Obr. 30B). V případě TIA je toto zlepšení sporné. Pro CAM a TET zlepšení růstu detekováno nebylo.

A

Bakteriální kmeny	MIC [mg · l ⁻¹]										
	50S										30S
	LS ₂ P			MS _B			PhO		PURO	TET	CARB
	LIN	CLI	PIIA	TIA	ERY	TELI	PIA	CAM			
<i>S. lincolnensis</i>	8192	64	ND	2 – 4	32 – 64	4	ND	32	ND	16 – 32	8
	pIJ10257	16384	64	ND	2	32 – 64	ND	ND	32	ND	16
ΔC	16384	256	>64	2 – 4	32 – 64	16	>64	32	64	16 – 32	8
	pIJ10257	16384	256	>64	2 – 4	32 – 64	16	ND	32 – 64	64	16 – 32
	C _C	16384	512	>64	2 – 4	32 – 64	4	ND	16 – 32	ND	16
	C _n	16384	256	ND	1 – 2	64	16	ND	32	ND	16 – 32
M145	16 – 32	8 – 16	>64	128 – 256	8 – 16	4	16	64	64	32 – 64	>128
	pIJ10257	16 – 32	8 – 16	>64	256	8 – 16	4	16 – 32	64	32 – 64	>128
	C _C	128	32 – 64	>64	256	8 – 16	4	32	64	ND	64
M1154	2 – 4	0,5	>64	128 – 256	2 – 4	0,5	8	16	<16	4 – 8	>128
	pIJ10257	4	1	>64	128 – 256	2 – 4	0,5	16	16 – 32	<16	8 – 16
	C _C	32	16	ND	64 – 128	<4	0,5	ND	16 – 32	ND	8 – 16
	C _n	16	8	ND	128	2 – 4	1	ND	32	ND	16

B



Obrázek 30: Charakterizace rezistenčního fenotypu proteinu LmrC. (A) Tabulka ukazující stanovené hodnoty MIC pro testovaná antibiotika. ND – hodnota nebyla určena. (B) Kapkové testy pro porovnání citlivostí kmenů *S. coelicolor* M1154, *S. coelicolor* M1154 + pIJ10257, *S. coelicolor* M1154 + C_C a *S. coelicolor* M1154 + C_n přes ovlivnění jejich růstu v přítomnosti antibiotik. Kmeny byly vysety na MH agar v pětinasobném sériovém ředění sporových suspenzí od počáteční hodnoty OD₄₅₀ = 0,2.

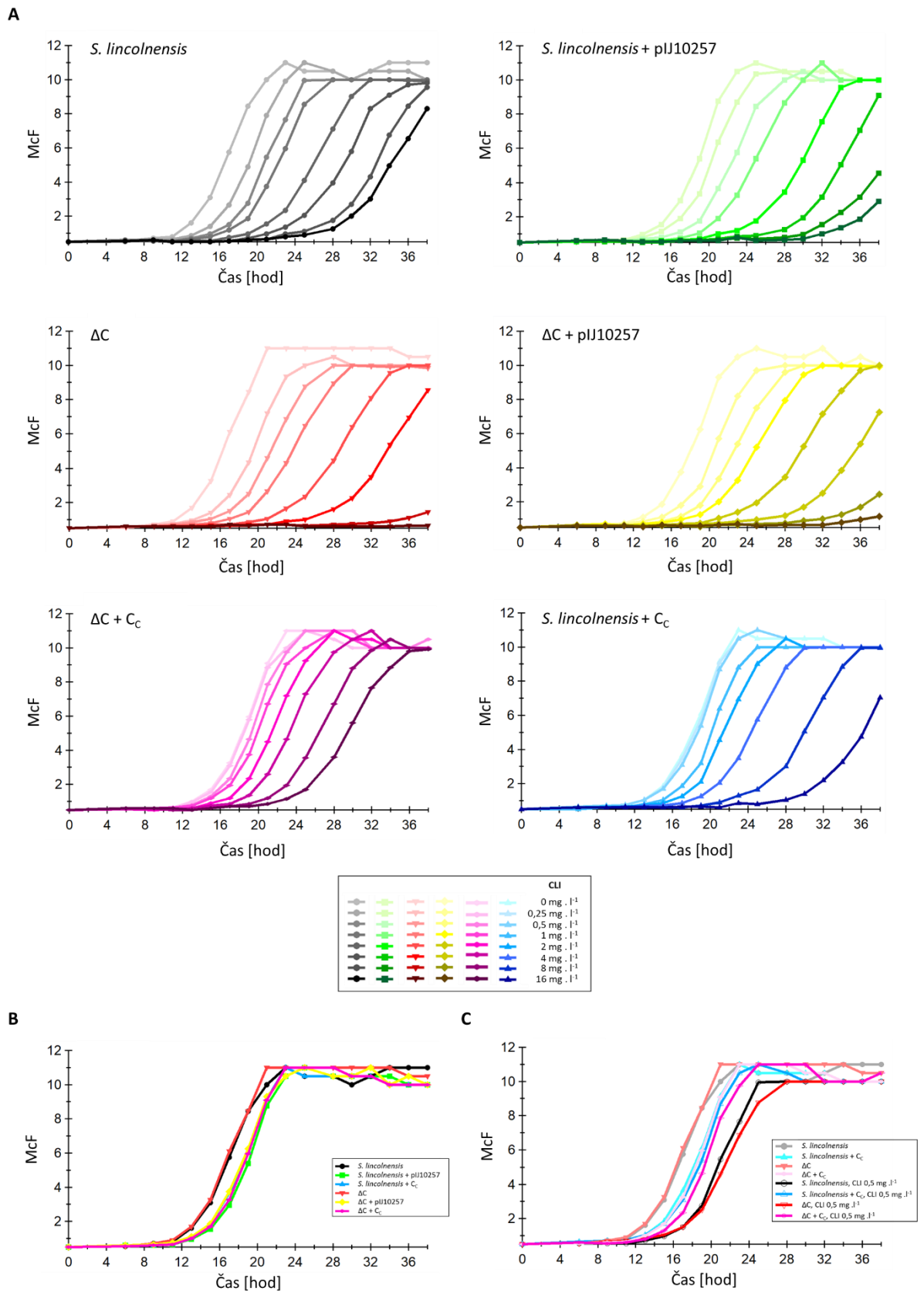
Získaná data nasvědčují tomu, že hlavními proteiny zajišťujícími rezistenci k linkosamidovým antibiotikům u producenta LIN jsou proteiny LmrA a LmrB. Protein LmrC udílí jen střední hladinu rezistence k linkosamidovým antibiotikům a k celkové rezistenci *S. lincolnensis* tedy nepřispívá. Na základě kapkových testů udílí LmrC slabou úroveň rezistence k PIIA. Protože se míra udílené rezistence mycelia v průběhu času vyvíjí, je možné, že role LmrC bude významnější v časnější růstové fázi.

5.2. Ovlivnění bakteriálního růstu v přítomnosti proteinu LmrC a jeho variant

Pro sledování vlivu proteinu LmrC na bakteriální růst a jeho možné role v růstové fázi předcházející produkci LIN, byl monitorován růst bakteriálních kmenů v subinhibičních koncentracích CLI (0–16 mg·l⁻¹)

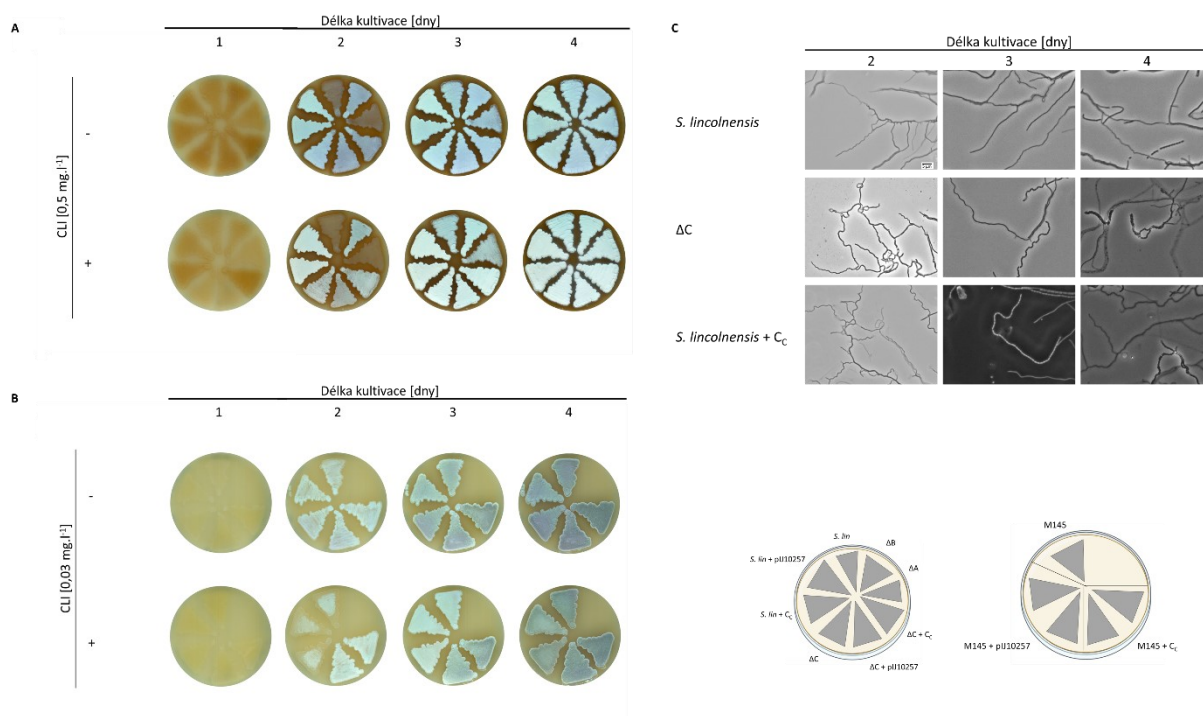
v YEME médiu. Testovanými kmeny byly *S. lincolnensis* (WT), *S. lincolnensis* + pIJ10257, *S. lincolnensis* + C_C, ΔC , ΔC + pIJ10257 a ΔC + C_C.

Při vyšších koncentracích CLI došlo u kmenů s inaktivovaným genem *lmrC* (ΔC , ΔC + pIJ10257) k prodloužení lag fáze přestože celková úroveň rezistence byla dokonce vyšší než u WT ($MIC_{CLI} = 256 \text{ mg.l}^{-1}$; Obr. 31). V absenci CLI neměla samotná delece genu *lmrC* na růst vliv (Obr. 31). Naopak vložení plazmidů (pIJ10257 a C_C) do *S. lincolnensis* a ΔC mělo vliv na délku lag fáze. Při nízkých koncentracích CLI (0,5 mg.l⁻¹) bylo však prodloužení lag fáze způsobené vložení vektoru zanedbatelné v porovnání s vlivem antibiotika. Konstitutivní exprese *lmrC* pomáhala bakterií překonat negativní vliv CLI, což eliminovalo prodloužení lag fáze pozorované u kmenů WT a ΔC (Obr. 31).



Obrázek 31: Vliv proteinu LmrC na růst kmenů *S. lincolnensis*. (A) Růstové křivky kmenů *S. lincolnensis* (WT), *S. lincolnensis* + pIJ10257, *S. lincolnensis* + C_c, ΔC, ΔC + pIJ10257 a ΔC + C_c v subinhibičních koncentracích CLI (0-16 mg.l⁻¹). (B) Porovnání růstových křivek testovaných kmenů v absenci CLI (C) Porovnání růstových křivek testovaných kmenů v přítomnosti CLI (0,5 mg.l⁻¹) a v absenci CLI.

Vliv LmrC na růst *S. lincolnensis* a *S. coelicolor* byl monitorován také na pevném médiu. Analýza byla provedena na MS agaru, který umožňuje sledovat tvorbu vzdušného mycelia a sporulaci (Obr. 32A). Při subinhibiční koncentraci CLI ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) vykazovaly kmeny *S. lincolnensis* s konstitutivní expresí genu *lmrC* výraznější nárůst oproti ostatním testovaným kmenům, který se v průběhu kultivace vyrovnal. Při heterologní expresi *lmrC* v *S. coelicolor* M145 bylo dle zbarvení mycelia detekované dřívější formování spor, které je vizuálně pozorovatelné šedým zbarvením. Výrazné posunutí sporulace nebylo mikroskopicky potvrzeno pro kmeny *S. lincolnensis* (Obr. 32B). Množství spor bylo u kmenu *S. lincolnensis* v porovnání s kmenem *S. lincolnensis* + C_C nižší, ale rozdíl nebyl dostatečně průkazný.



Obrázek 32: Vliv proteinu LmrC na růst a sporulaci kmenů *S. lincolnensis* a *S. coelicolor* na MS agaru. (A) Porovnání rychlosti růstu a sporulace u kmenů *S. lincolnensis*, *S. lincolnensis* + pIJ10257, *S. lincolnensis* + C_C , ΔA , ΔB , ΔC , ΔC + pIJ10257 a ΔC + C_C . Kultivace probíhala na MS agaru při 30°C po dobu 4 dní v přítomnosti ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) a absenci CLI. (B) Porovnání rychlosti růstu a sporulace u kmenů *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* + pIJ10257, *S. coelicolor* + C_C . Kultivace probíhala na MS agaru při 30°C po dobu 4 dní v přítomnosti ($0,03 \text{ mg.l}^{-1}$) a absenci CLI. (C) Mikroskopická inspekce průběhu sporulace u kmenů *S. lincolnensis*, *S. lincolnensis* + C_C a ΔC . Snímky pořízeny mikroskopem Olympus BX41 při zvětšení 400x. Měřítko odpovídá $5 \mu\text{m}$.

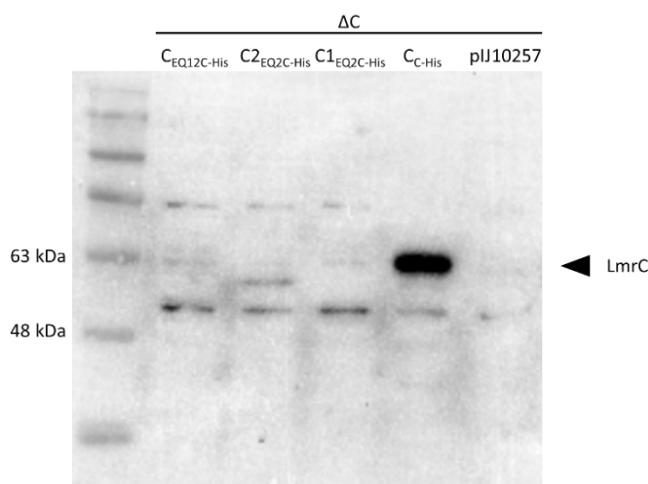
5.2.1. Vliv ATPáz deficientní varianty LmrC na bakteriální růst

ABCF proteiny, mezi které patří i LmrC, obsahují dvě NBD, které váží a hydrolyzují dvě molekuly ATP. Mutace kyseliny glutamové (E) na glutamin (Q) v konzervovaném motivu DEPT vede ke ztrátě schopnosti hydrolyzovat ATP, přičemž schopnost vazby ovlivněna není. Tyto ATPáza deficientní varianty ABCF proteinů, označované jako EQ mutanty, se pevněji vážou na ribozom a inhibují translaci (21, 185, 186). Pro možnost testování interakce proteinu LmrC s ribozomem a vlivu aktivity LmrC na pozorované fenotypy byly připraveny konstrukty konstitutivně exprimující EQ mutantní varianty proteinu.

5.2.2. Příprava konstruktů pro expresi ATPáza deficientních LmrC variant

Pro vytvoření mutantních variant byly do genu *lmrC* zavedeny bodové mutace na pozicích G499C (E167Q) a G1453C (E485Q) pomocí místně specifické mutagenese (Kap. 4.2.4.6.). Záměny byly zavedeny do plazmidu pLV020 za využití primerů Lmr(C)G499C-For, Lmr(C)G499C-Rev, Lmr(C)G1453C-For a Lmr(C)G1453C-Rev (Tab. 4). Úspěšnost přípravy konstruktů byla ověřena sekvenačně. Takto byl připraven konstrukt s jednou mutovanou doménou (E485Q) označený jako pLV024 (dále značen C_{EQ2C-His}) a konstrukt obsahující obě mutované domény (E167Q a E485Q) označený jako pLV025 (dále značen C_{EQ12C-His}). Připravené konstrukty byly pomocí mezidruhovové konjugace vneseny do recipientních kmenů *S. lincolnensis*, ΔC , *S. coelicolor* M1154 a *S. coelicolor* M145 (Tab. 30).

U takto připravených kmenů byla otestována jejich citlivost k linkosamidům a schopnost růstu. Při konstitutivní expresi EQ mutantních variant byly pomocí kapkových testů detekovány růstové defekty. Tento projev odpovídá výsledkům popsaným u proteinu EttA (186). Jednotlivé klony ovšem vykazovaly proměnlivý růstový i rezistenční fenotyp. Následná imunodetekce ukázala, že mutované varianty proteinu nebyly produkovány (Obr. 33). Provedená sekvenační analýza poté odhalila změny vedoucí k posunutí čtecího rámce a následnému vytvoření STOP kodónu (např. na pozici 102), či změny v promotorové oblasti pravděpodobně vedoucí k inhibici exprese.



Obrázek 33: Ověření produkce EQ mutantních variant proteinu LmrC u kmenů s jejich konstitutivní produkcí pomocí imunoblotu.
Pro detekci byla využita specifická protilátka proti proteinu LmrC

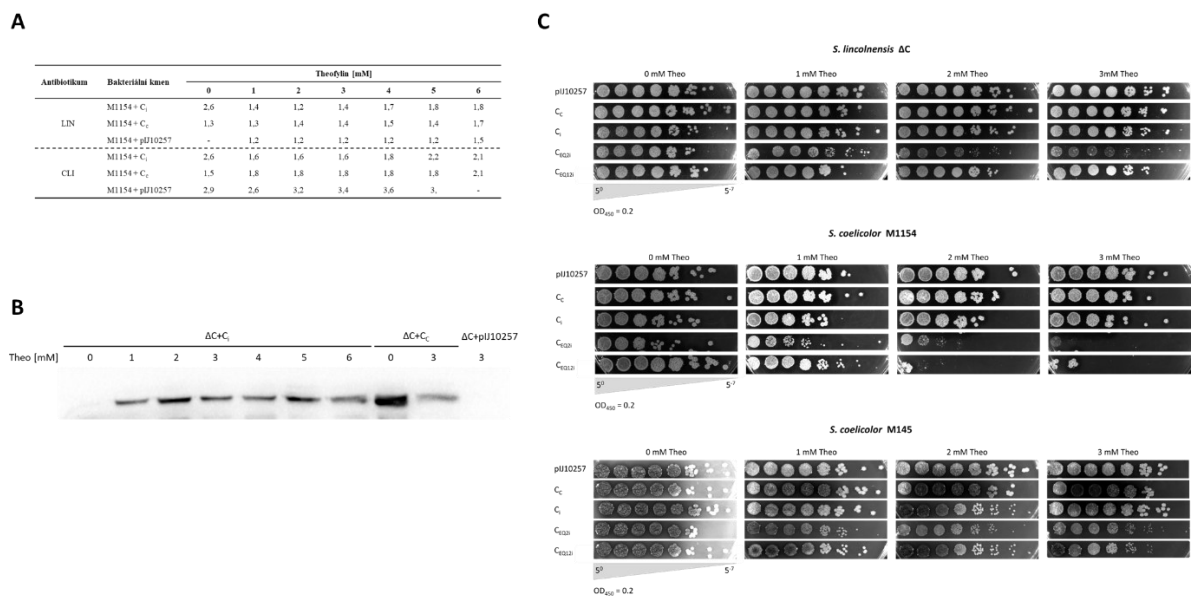
Z důvodů vysoké toxicity EQ mutant při jejich konstitutivní expresi provázené selekčním tlakem vedoucím k výše popsaným změnám zamezujícím produkci EQ mutantních variant proteinu LmrC byly připravené nové konstrukty s inducibilní expresí. Příprava nových konstruktů byla provedena Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou Ph.D. Konstrukty byly připraveny zavedením theofylinového (Theo) riboswitchu do připravených plazmidů pLV024 a pLV025 prostřednictvím PCR reakce. Vzniklé plazmidy nesou označení pGBN028 a pGBN030. Stejnou metodou byl připraven také konstrukt pGBN025 pro inducibilní expresi nemutované varianty proteinu LmrC. Plazmid pGBN025 byl odvozen od vektoru pLV018.

5.2.2.1. Optimalizace podmínek indukce

Nové plazmidy pGBN025 (dále značen C_i), pGBN028 (dále značen C_{EQ2i}) a pGBN030 (dále značen C_{EQ12i}) byly vneseny mezidruhovou konjugací do recipientních kmenů *S. lincolnensis*, ΔC, *S. coelicolor* M145 a *S. coelicolor* M1154. Přehled připravených kmenů je uveden v (Tab. 30).

Následně bylo provedeno testování optimální koncentrace induktoru (Theo) vhodného pro spuštění exprese. Optimalizace byla provedena pro konstrukt C_i přes porovnání míry udílené rezistence v porovnání k původní variantě C_c. K posouzení rezistence kmenů byl použit diskový difuzní test (Kap. 4.2.8.2.), doplněný dvojkrokovou imunodetekcí za využití specifické protilátky proti proteinu LmrC (Kap. 4.2.6.3.). Testované rozpětí induktoru bylo v koncentraci 1–6 mM.

Vyšší koncentrace induktoru (4–6 mM Theo) vedly ke zvýšení citlivosti k antibiotikům LIN a CLI (Obr. 34A). Tento efekt může být způsoben popsáním inhibičním efektem Theo na bakteriální růst (270). V těchto koncentracích navíc nebyla detekována zvýšená produkce proteinu (Obr. 34B). Naopak Theo v rozmezí 1–3 mM byl dostatečný pro indukcii produkce proteinu LmrC i zvýšení rezistence. Pro přesnější posouzení inhibičního vlivu Theo na růst byl proveden kapkový test s koncentracemi 0–3 mM. Jako optimální byla stanovena koncentrace 3mM. Tato koncentrace jen minimálně inhibovala bakteriální růst a byla přitom dostatečná pro viditelný inhibiční efekt EQ mutantní varianty proteinu LmrC u kmenu ΔC (Obr. 34C). Tento efekt byl při koncentraci 1 mM Theo detekován jen slabě.



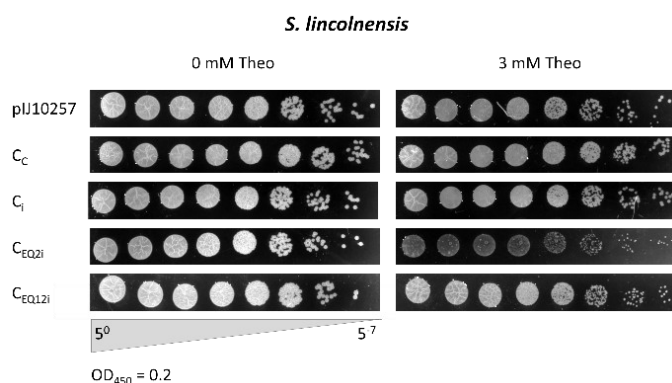
Obrázek 34: Optimalizace koncentrace induktoru pro expresi ATPáza deficientních variant proteinu LmrC. (A) Stanovení velikosti inhibičních zón pro LIN (64 μg) a CLI (32 μg) u kmenů *S. coelicolor* M1154 nesoucích plazmidy pIJ10257, C_c a C_i při různých koncentracích Theo (0-6 mM). (B) Analýza produkce proteinu LmrC pomocí imunoblotu v závislosti na koncentraci Theo (0-6mM). Kmen ΔC + pIJ1025 a ΔC + C_c sloužily jako negativní a pozitivní kontrola. Nanáška byla normalizována pomocí SDS-PAGE. (C) Kapkové testy pro posouzení inhibičního efektu ATPáza deficientních variant proteinu LmrC na růst kmenů ΔC, *S. coelicolor* M1154 a *S. coelicolor* M145. Kmeny byly vysety na MH agar v pětinasobném seriovém ředění sporových suspenzí od počáteční hodnoty OD₄₅₀ = 0,2.

Tabulka 30: Seznam připravených bakteriálních kmenů

Bakteriální kmen	Charakteristika	Konjugovaný plazmid	Recipientní kmen
<i>S. lincolnensis</i> + C _{EQ2C-His} (BN3524)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257:: <i>lmrC</i> _{G1453C} pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV024	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
<i>S. lincolnensis</i> + C _{EQ12C-His} (BN3519)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257:: <i>lmrC</i> _{G499C, G1453C} pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV025	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
<i>S. lincolnensis</i> + C _i (BN3706)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> , Hyg ^r))	pGBN025	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
<i>S. lincolnensis</i> + C _{EQ2i} (BN3709)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G1453C} , Hyg ^r))	pGBN028	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
<i>S. lincolnensis</i> + C _{EQ12i} (BN3712)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G499C, G1453C} , Hyg ^r))	pGBN030	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
ΔC + C _{EQ2C-His} (BN3527)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrC</i> _{G1453C} pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV024	BN3001
ΔC + C _{EQ12C-His} (BN3522)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrC</i> _{G499C, G1453C} pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV025	BN3001
ΔC + C _i (BN3640)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> , Hyg ^r))	pGBN025	BN3001
ΔC + C _{EQ2i} (BN3643)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G1453C} , Hyg ^r))	pGBN028	BN3001
ΔC + C _{EQ12i} (BN3646)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G499C, G1453C} , Hyg ^r))	pGBN030	BN3001
<i>S. coelicolor</i> M1154 + C _{EQ2C-His} (BGD3530)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257:: <i>lmrC</i> _{G1453C} pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV024	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + C _i (BGD3628)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> , Hyg ^r))	pGBN025	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + C _{EQ2i} (BGD3631)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G1453C} , Hyg ^r))	pGBN028	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + C _{EQ12i} (BGD3634)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G499C, G1453C} , Hyg ^r))	pGBN030	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M145 + C _{EQ2C-His} (BGD3602)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257:: <i>lmrC</i> _{G1453C} pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV024	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + C _{EQ12C-His} (BGD3600)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257:: <i>lmrC</i> _{G499C, G1453C} pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV025	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + C _i (BGD3700)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> , Hyg ^r))	pGBN025	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + C _{EQ2i} (BGD3702)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G1453C} , Hyg ^r))	pGBN028	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + C _{EQ12i} (BGD3704)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257 (Theo riboswitch:: <i>lmrC</i> _{G499C, G1453C} , Hyg ^r))	pGBN030	<i>S. coelicolor</i> M145

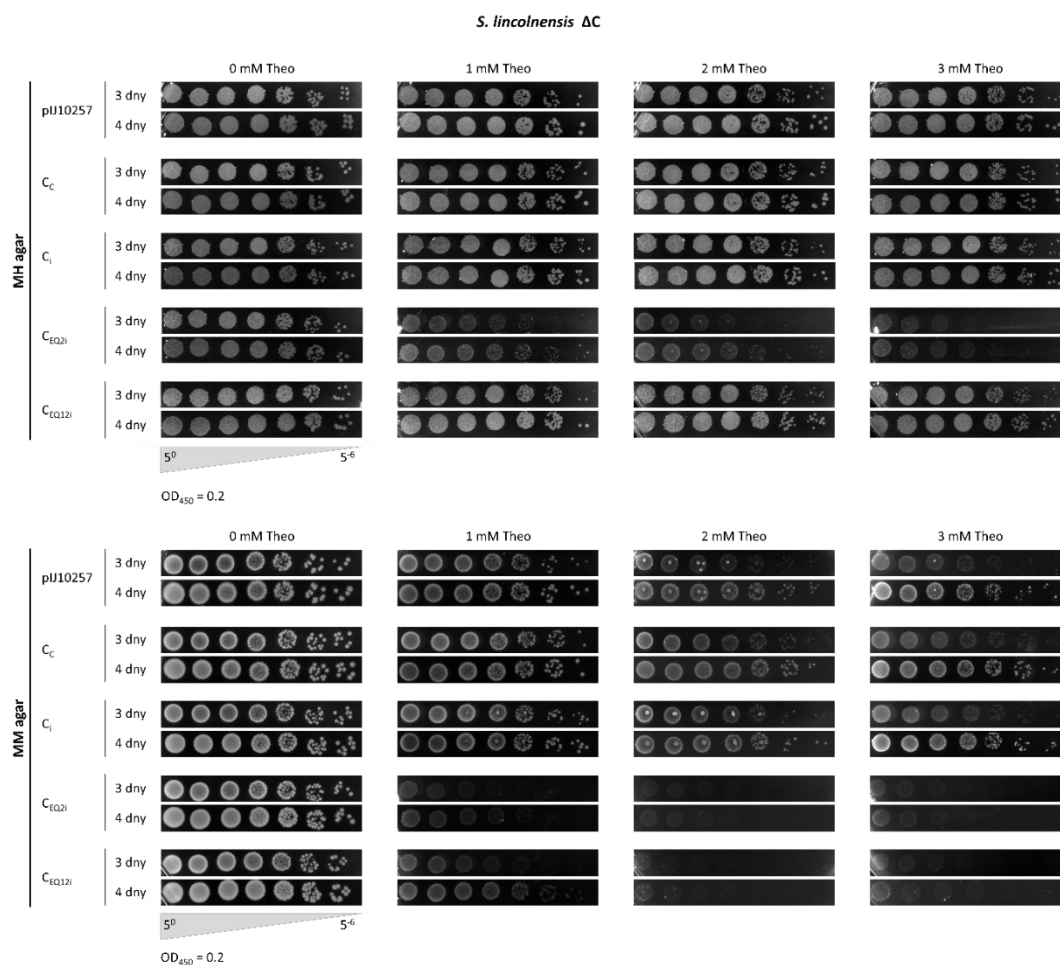
5.2.2.2. Charakterizace růstových defektů v přítomnosti EQ mutantních variant LmrC

Pozorované růstové defekty způsobené produkcí EQ mutantních variant proteinu LmrC se lišily v závislosti na použitém bakteriálním kmeni (Obr. 34C). U kmene ΔC byla produkce varianty proteinu LmrC, která si zachovala částečnou schopnost hydrolyzy ATP (C_{EQ2i}), spojena s růstovým defektem. V případě plně nefunkční varianty (C_{EQ12i}) nebyl růst ovlivněn. Podobný trend byl pozorován také u kmene *S. lincolnensis*, u kterého došlo k inhibici růstu jen ve spojitosti s produkcí varianty C_{EQ2i} (Obr. 35). V případě kmenů *S. coelicolor* M145 a *S. coelicolor* M1154 vedla produkce obou variant (C_{EQ2i} , C_{EQ12i}) k výrazným růstovým defektům (Obr. 34C).



Obrázek 35: Kapkový test EQ mutantních variant proteinu LmrC u kmene *S. lincolnensis*. Pro detekci růstových defektů způsobených EQ mutanty byly kmeny vysety na MH agar v pětinásobném sériovém ředění sporových suspenzí od počáteční hodnoty $OD_{450} = 0,2$.

Výše popsáné růstové defekty byly detekovány na MH agaru, což je bohaté médium poskytující bakteriím potřebné látky pro růst. V přirozených podmínkách jsou však bakterie často vystaveny nutričně chudšímu prostředí. Z tohoto důvodu byl růst porovnán i v podmínkách s limitovanými živinami ve dvou časových bodech (3 a 4 dny kultivace; Obr. 36). U kmene ΔC se při růstu na minimálním agaru (MM agar) projevil růstový defekt spojený s produkcí EQ mutantní varianty proteinu také u dvojité mutanty (C_{EQ12i}), a to i při nízké koncentraci induktoru (1 mM Theo). Při sledování růstu na MH agaru bylo detekováno zpomalení růstové rychlosti pro kmen $\Delta C + C_{EQ2i}$ i v přítomnosti 1 mM Theo, které po 5 dnech nebylo detekováno. Kmen v delším časovém horizontu dorostl kmen s prázdným vektorem (pIJ10257).

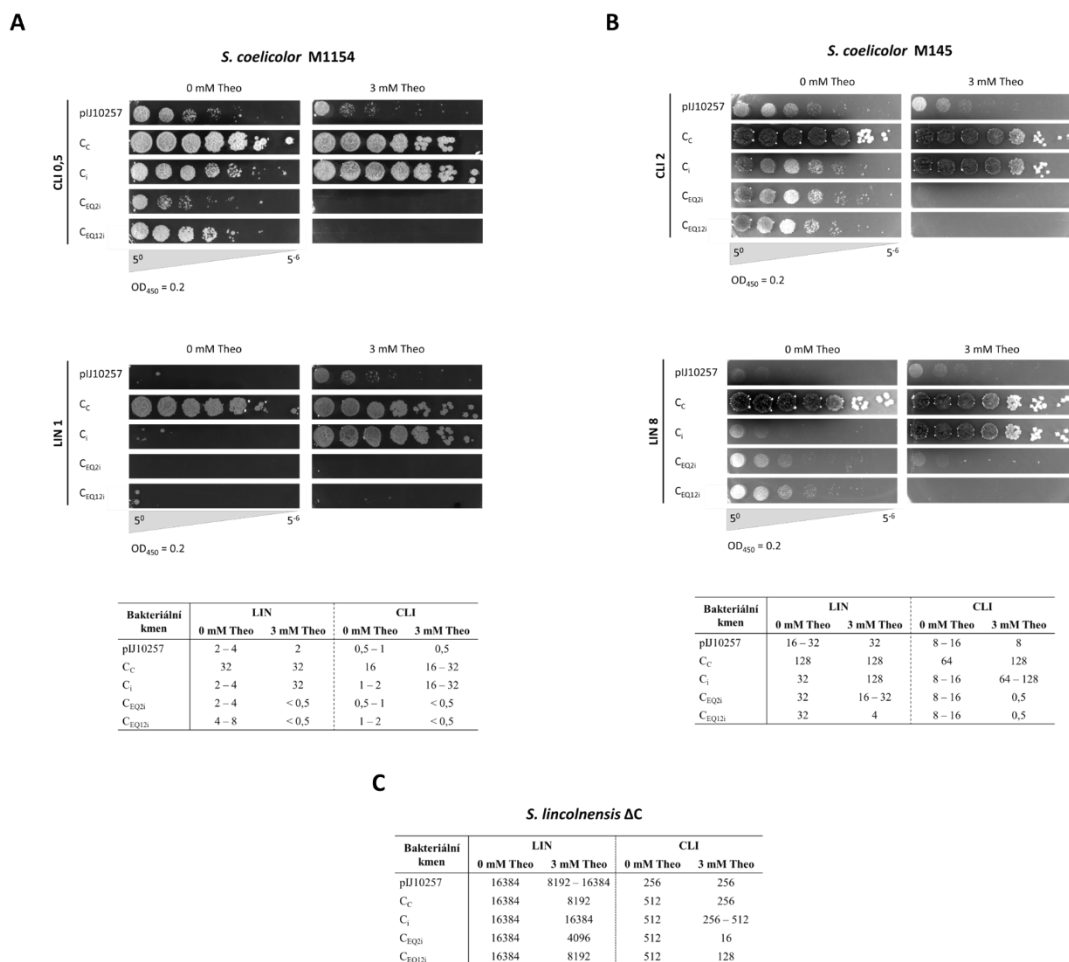


Obrázek 36: Kapkový test EQ mutantních variant proteinu LmrC u kmene ΔC . Porovnání růstu kmene ΔC exprimujícího ATPáza deficientní varianty proteinu LmrC na bohatém médiu (MH agar) a minimálním médiu (MM agar). Kmeny byly vysety v pětinasobném seriovém ředění sporových suspenzí od počáteční hodnoty $OD_{450} = 0,2$.

Ztráta schopnosti EQ mutant udílet rezistenci byla ověřena testováním citlivosti kmenů k LIN a CLI pomocí agarové diluční metody. U kmenů *S. coelicolor* M1154 (Obr. 37A) a *S. coelicolor* M145 (Obr. 37B) nesoucí nemutovanou variantu genu *lmrC* (C_I) byla po přidání induktoru (3 mM Theo) pozorována zvýšená rezistence vůči oběma antibiotikům. Hladina rezistence byla srovnatelná s kmeny konstitutivně exprimující nemutovaný gen *lmrC* (C_C). V absenci induktoru zůstaly kmeny citlivé. Naopak u kmenů exprimujících EQ mutantní varianty vedla kombinace růstových defektů v přítomnosti induktoru a ztráty schopnosti udílet rezistenci ke zvýšení citlivosti k antibiotikům. Tento trend byl pozorován také při růstu kmenů v přítomnosti antibiotik na pevné půdě v seriovém ředění v rámci kapkového testu. Inhibice funkce proteinu LmrC zavedením EQ mutací byla testována také u kmene ΔC (Obr. 37C). U tohoto kmene vysoká úroveň rezistence zprostředkovaná proteiny LmrA a LmrB překryla ztrátu funkce dvojitě mutanty (C_{EQ12i}) a došlo pouze k minimálnímu poklesu rezistence. Naopak v případě varianty C_{EQ2i} došlo k výraznému propadu rezistence daného kmene. Tato změna rezistence odpovídala pozorovaným růstovým defektům.

Tyto výsledky napovídají, že negativní efekt EQ mutant je druhově specifický a ovlivnitelný kultivačními, potažmo stresovými, podmínkami. Pro bakteriální kmen *S. lincolnensis* je částečné zachování

schopnosti hydrolyzy ATP u proteinu LmrC více škodlivé než jeho plná inhibice. Nepřímou to potvrzuje i pozorovaná vlastnost ABCF proteinů, u kterých obě ATP-vazebná místa nejsou ekvivalentní.



Obrázek 37: Vliv ATPáza deficientních variant proteinu LmrC na rezistenční fenotyp kmenů *Streptomyces*. Pro analýzu vlivu pozorované inhibice růstu způsobené EQ mutanty na celkovou odolnost kmenů *S. coelicolor* M1154 (A), *S. coelicolor* M145 (B) a ΔC (C) byly stanoveny hodnoty MIC pro LIN a CLI pomocí agarové diluční metody. V přítomnosti subinhibiční koncentrace LIN a CLI byly testované kmeny *S. coelicolor* vysety na MH agar v pětinašobném seriovém ředění sporových suspenzí od počáteční hodnoty OD₄₅₀ = 0,2.

5.3. Role proteinu LmrC v antibiotiky indukované produkci linkomycinu

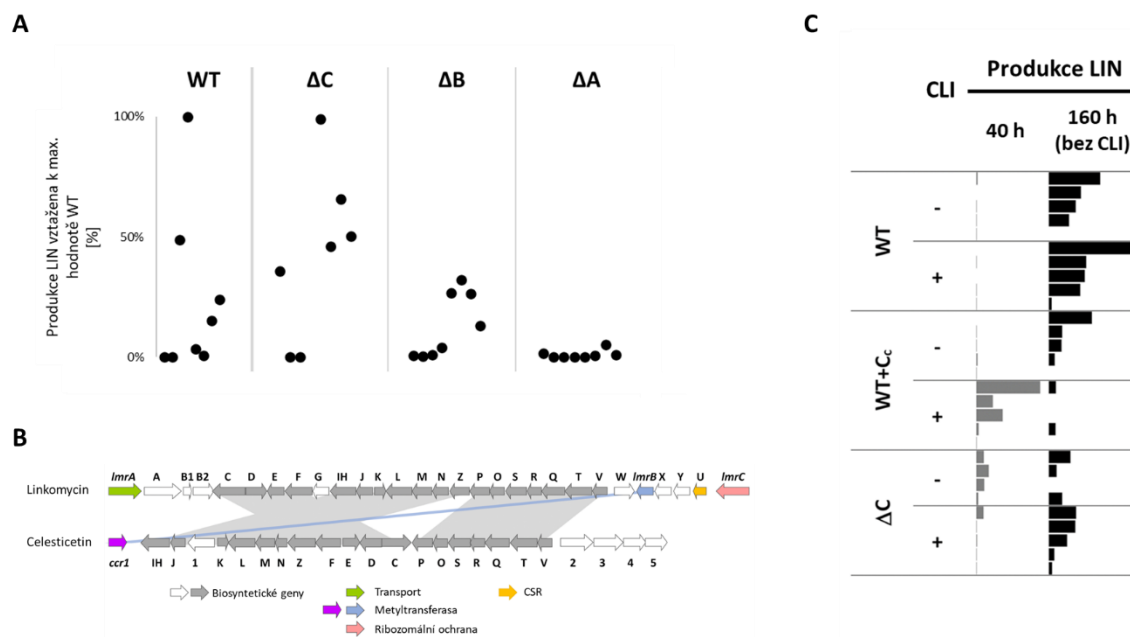
Rezistenční proteiny kódované v rámci BGC klastrů obvykle slouží k ochraně producenta před inhibičním účinkem produkovaného antibiotika. Jak bylo uvedeno v úvodu, producenti často spoléhají na kombinaci více mechanismů ochrany, tak jako to je v případě bakterie *S. lincolnensis* (12, 13). Na základě stanovených hodnot MIC pro LIN a CLI bylo zjištěno, že za vysokou úroveň rezistence této bakterie jsou zodpovědní MFS transportér LmrA a monometyltransferáza LmrB. Schopnost ARE5 proteinu LmrC udílet rezistenci naopak významně nepřispívá k celkové odolnosti kmene (Kap.5.1.2.).

Pro zjištění souvislosti mezi mírou rezistence a produkcí LIN byla testována schopnost WT (*S. lincolnensis*) a jednoduchých mutantních kmenů (ΔA, ΔB a ΔC) produkovat LIN. Produkce byla sledována chromatografickou analýzou (LC-MS) extraktu kultivačního média. Koncentrace LIN byly stanoveny pomocí kalibrační křivky připravené s použitím extraktu z neproduktivního kmene *S. lincolnensis* Δ*lmbD* (Kap. 4.2.7.). Stanovení produkce LIN bylo provedeno ve spolupráci s Mgr. Markétou Koběřskou

Ph.D., která následně spolu s Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou Ph.D. provedla i závěrečné vyhodnocení dat. Zaškolení do metodiky extrakce LIN z produkčního média a případnou asistenci při měření a vyhodnocení dat bylo zajištěno Mgr. Zdeňkem Kameníkem Ph.D.

Kmeny s vysokou až extrémní odolností vůči LIN byly zároveň schopny produkovat vyšší hladiny LIN (Obr. 38A; vztaženo k nejvyšší naměřené hodnotě pro WT). Konkrétně produkce kmene ΔC (disponující funkčními geny *lmrA* a *lmrB*, $MIC_{LIN} = 16384 \text{ mg.l}^{-1}$) byla srovnatelná s WT. V případě kmene ΔB (disponující funkčními geny *lmrA* a *lmrC*, $MIC_{LIN} = 8192 \text{ mg.l}^{-1}$) sice produkce nepřevyšovala 50% maximálně produkce WT, ale stále byla významná. Naopak u citlivého kmene ΔA (disponující funkčními geny *lmrB* a *lmrC*, $MIC_{LIN} = 64 \text{ mg.l}^{-1}$) byla produkce minimální, nebo pod detekčním limitem.

Stanovení produkce LIN bylo komplikováno její nestálostí, např. pro kmen *S. lincolnensis* (WT) nebyla v rámci některých měření detekována produkce LIN. Toto kolísání produkce nasvědčuje, že syntéza LIN může být kontrolována složitějšími regulačními interakcemi. Ve srovnání s BGC pro příbuzné linkosamidové antibiotikum celesticetin, produkované *Streptomyces caelestis*, obsahuje BGC pro LIN více nebiosyntetických genů (Obr. 38B). Kromě výše charakterizovaných rezistenčních genů *lmrA*, *lmrB* a *lmrC* je v klastru přítomen i regulační gen *lmbU*. Naproti tomu celesticetinový BGC obsahuje jediný nebiosyntetický gen *ccr1*, který kóduje monometyltransferasu homologní k proteinu LmrB. Stabilita produkce celesticetinu, která byla stanovena Mgr. Markétou Koběorskou Ph.D. (172), naznačuje jednodušší regulační systém v porovnání se syntézou LIN. U celesticetinu bylo spuštění produkce detekováno ve všech provedených měřeních.



Obrázek 38: Produkce LIN u *S. lincolnensis*. (A) Srovnání výtěžků produkce LIN u delečních mutantů s kmenem *S. lincolnensis* (WT). Získané hodnoty jsou normalizovány k maximální dosažené produkci WT. (B) Porovnání klastrů pro syntézu LIN a celesticetinu. (C) Sledování změny produkce LIN u kmenů *S. lincolnensis* (WT), *S. lincolnensis* + Cc a ΔC v reakci na přidání CLI. Měření produkce LIN bylo provedeno v kultivačním médiu získaném po 40 hodinové a 160 hodinové kultivaci.

Z nebiosyntetických proteinů kódovaných v BGC pro LIN zůstal protein LmrC s necharakterizovanou funkcí, a přitom s prokázaným spojením k LIN. Jeho vliv na produkci LIN byl tedy testován detailněji.

Experimenty byly provedeny na kmenech *S. lincolnensis* (WT), *S. lincolnensis* + C_C (WT + C_C) a ΔC. Každá varianta byla testována v pěti replikátech. Antibiotika, jako signální molekuly, hrají klíčovou roli při synchronizaci chování bakteriálních populací a indukci produkce sekundárních metabolitů (6). Proto byla produkce LIN zkoumána ve dvou časových bodech - 40 hodin a 160 hodin kultivace. Tyto časové body odpovídají přeočkování kmenů z YEME média do produkčního AVM média (40. hodina) a ukončení kultivace v AVM médiu (160. hodina). Experiment byl proveden v přítomnosti a absenci subinhibiční koncentrace CLI (c = 0,5 mg.l⁻¹) přidaného v první fázi kultivace. Pro tyto časové body kultivace (+ 2 hodiny) byly navíc stanoveny hodnoty MIC pro mycelia (Kap. 5.1.2.).

V případě stanovení produkce ve 40. hodině – tedy před začátkem přirozeného nástupu (viz WT), došlo k detekci produkce LIN v přítomnosti CLI u kmene s konstitutivní expresí genu *lmrC* (Obr. 38C). Slabá indukce produkce byla detekována i u kmene ΔC. V tomto případě, ale byla produkce nižší a byla narušena reakce na přidaný CLI. Přítomnost proteinu LmrC tedy ovlivňuje produkci LIN v časně fázi kultivace, která je narušena v kmenu ΔC. Produkce ovšem není na přítomnosti proteinu LmrC závislá. Pro regulační ABCF proteiny byla popsána jejich úloha jako translačních regulátorů fungujících v PTC. LIN je antibiotikum vázající se na stejné místo.

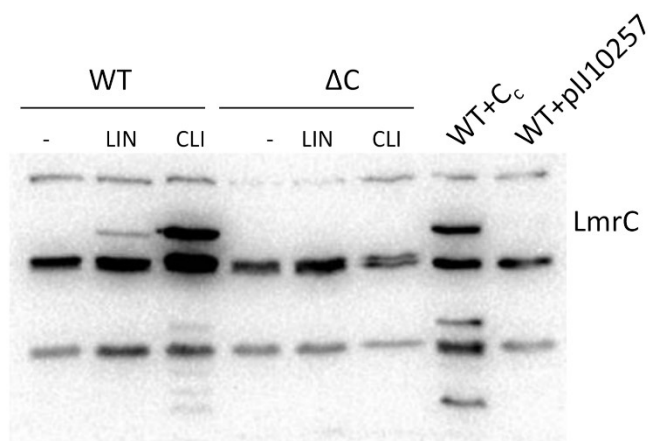
Buňky sklizené ve 40. hodině kultivace, ze které byly stanoveny produkce, byly podrobeny proteomické analýze. Analýza byla provedena v laboratoři Hmotnostní spektrometrie (BIOCEV, Přírodovědecká fakulta UK) Mgr. Karlem Harantem a Mgr. Pavlem Talackem, kultury pro analýzu byly připraveny Mgr. Markétou Koběorskou Ph.D. Následné analýzy byly provedené Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou Ph.D. Výsledky proteomické analýzy byly v souladu s produkčními daty. Analýza potvrdila vliv CLI na produkci vybraných proteinů u *S. lincolnensis* (WT), mezi kterými byl protein LmrC. Produkce proteinu LmrC indukovaná LIN je viditelná i na imunoblotu pro plazmid s přirozeným promotorem (Obr. 29B) a je dále rozebrána v následující Kap. 5.4. Na přítomnost CLI reagovala také produkce proteinu LmrA a bylo detekováno zvýšení proteinů kódovaných v operonu *lmbUXY-lmrB*. Produkce LmrC v reakci na CLI byla potvrzena na transkripční úrovni pomocí RT-PCR Mgr. Vladimírem Vimbergem Ph.D.. Dále bylo pomocí RT-PCR zjištěno, že LmrC ovlivňuje expresi genu *lmbU*. Pro tento experiment provedeny Mgr. Vladimírem Vimbergem Ph.D. byly použity komplementační kmeny ΔC + C_i a ΔC + C_{EQ12i} (172). Na výsledcích uvedených v tomto odstavci, které navazují na produkční data, jsem se přímo nepodílela.

5.4. Indukce produkce proteinu LmrC LSAP antibiotiky

V předchozích kapitolách bylo ukázáno, že exprese *lmrC* reaguje na přítomnost LIN a CLI (Obr. 29B a zmíněná proteomická a RT-PCR data). Pro ARE ABCF proteiny byl popsán mechanismus regulace exprese prostřednictvím ribozomem řízené atenuce (212, 230). Pomocí bioinformatických nástrojů PASIFIC (258) a NNPP (271) byl v 5'UTR regionu predikován uORF a dvě alternativní konformace mRNA zajišťující regulaci. Tyto predikce byl následně potvrzeny také experimentálně Mgr. Markétou Koběorskou Ph.D. a Mgr. Vladimírem Vimbergem Ph.D. (172).

Pro objasnění specifity indukce produkce proteinu LmrC byla sledována jeho hladina produkce v přítomnosti různých antibiotik. Mezi testovaná antibiotika patřily linkosamidy (LIN a CLI), pleuromutiliny (TIA), streptograminy A (PIIA) a B (PIA), makrolidy (ERY), amfenikoly (CAM) a kontrolní karbenicilin

(CARB). Detekce LmrC byla provedena pomocí imunoblotu se specifickou protilátkou proti LmrC. Byly provedeny tři nezávislá měření a došlo k ověření specifčnosti protilátky i v přítomnosti LIN a CLI (Obr. 39).

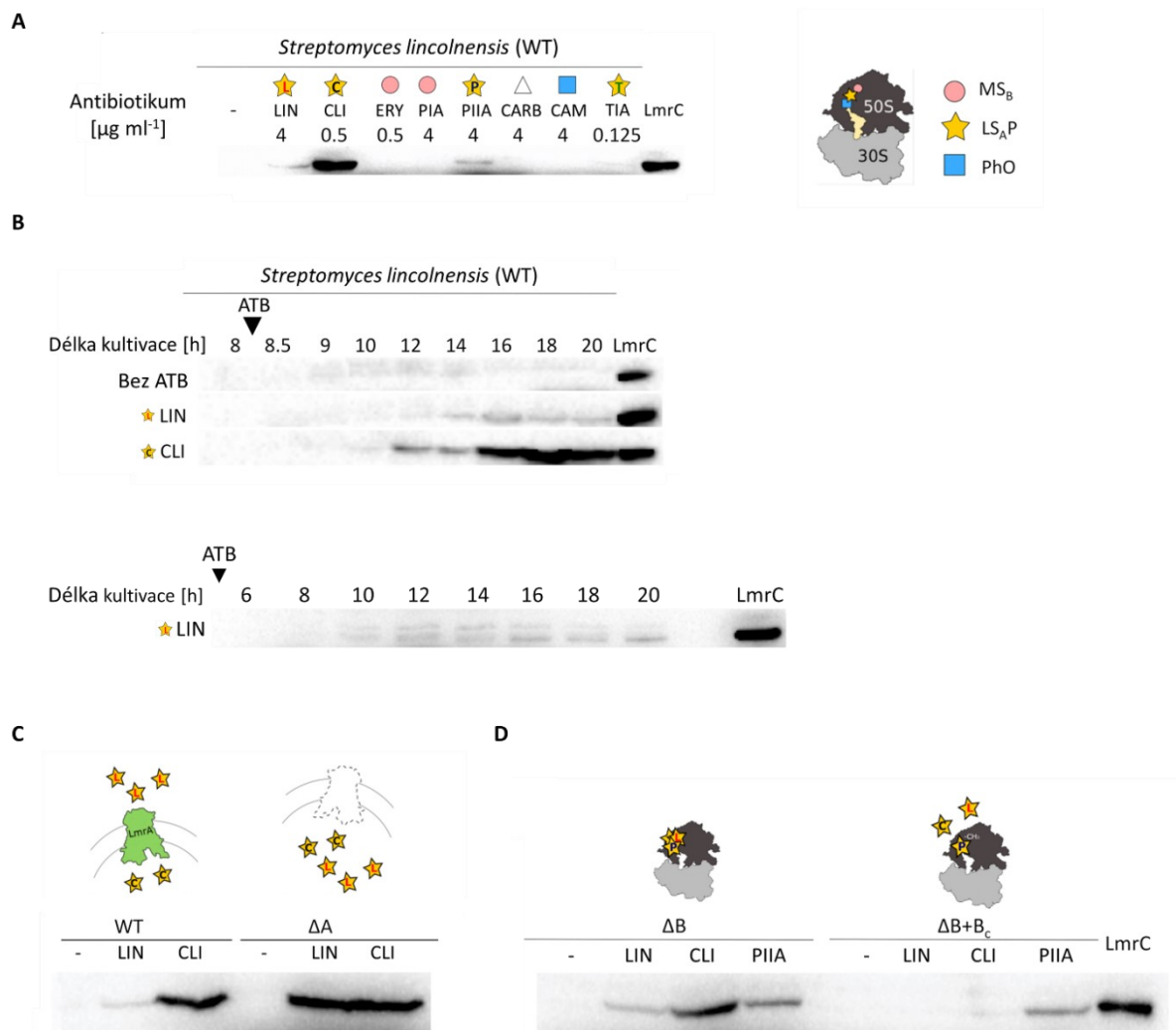


Obrázek 39: Ověření specifčnosti protilátky proti proteinu LmrC. Detekce proteinu LmrC byla provedena pomocí imunoblotu u kmenů *S. lincolnensis*, *S. lincolnensis* + pIJ10257, *S. lincolnensis* + Cc a delečního mutanta ΔC (negativní kontrola). Ověření bylo provedeno i v přítomnosti LIN ($4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a CLI ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Nanáška na gel byla standardizována pomocí SDS-PAGE.

Indukce produkce LmrC byla detekována v přítomnosti antibiotik LIN, CLI a PIIA (Obr. 40A). Slabší produkce byla pozorována v přítomnosti TIA. Tato antibiotika sdílí překrývající se vazebné místo na ribozomu. Indukce byla nejsilnější pro CLI, který má silnější inhibiční efekt než LIN. Po přidání CLI do rozrostlé buněčné kultury *S. lincolnensis* (Obr. 40B) byla produkce proteinu LmrC detekovatelná již po 2 hodinách kultivace, zatímco u LIN byl nástup produkce proteinu LmrC pomalejší (4 hodiny). Pokud bylo antibiotikum přítomno v kultivačním médiu od začátku kultivace, došlo k detekci LmrC až kolem 10. hodiny. V obou případech došlo k produkci LmrC v přítomnosti LIN nebo CLI před jeho přirozeným nástupem produkce.

Antibiotika schopná indukovat produkci LmrC odpovídají rezistenčnímu fenotypu ARE5 proteinů (LSAP). To podporuje představu, že je regulace produkce LmrC spojena s jeho rezistenční funkcí. Podobná závislost byla pozorována pro protein Vga_{ALC} a jeho varianty (230). Dalším krokem bylo posouzení vlivu ostatních rezistenčních proteinů kódovaných v BGC na hladinu produkovaného LmrC.

V rámci experimentů sledujících specifitu produkce (Obr. 40A) bylo ukázáno, že CLI indukuje v kmeni *S. lincolnensis* (WT) vyšší míru produkce LmrC v porovnání s LIN. V kmeni s delecí genu *lmrA* (ΔA), který postrádá aktivní LIN transportér LmrA, vedla zvýšená intracelulární koncentrace LIN ke srovnatelné hladině produkce proteinu LmrC v reakci na oba linkosamidy (CLI i LIN; Obr. 40C). Výsledek naznačuje, že LmrA specificky tlumí produkci LmrC indukovanou LIN prostřednictvím své transportní funkce.

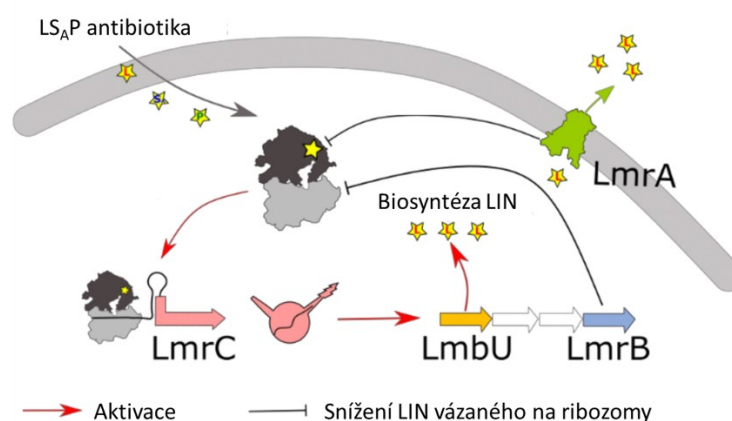


Obrázek 40: Analýza produkce LmrC. Western blot analýza proteinu LmrC detekovaného specifickou protilátkou v buněčném lyzátu. (A) Stanovení míry exprese LmrC u *S. lincolnensis* v odpovědi na přítomnost různých antibiotik v kultivačním médiu. (B) Časový průběh exprese LmrC po přidání LIN ($c = 4 \text{ mg.l}^{-1}$) a CLI ($c = 0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) do kultivačního média. Černý trojúhelník označuje čas přidání antibiotik. (C) Vliv delece genu *lmrA* na produkci LmrC - porovnání *S. lincolnensis* (WT) s ΔA (D) Vliv delece genu *lmrB* na produkci LmrC – porovnání deleční mutanty ΔB s její komplementace ($\Delta B + B_c$). Nanáška vzorků byla normalizována na stejnou OD₆₀₀ buněk před lyzí a ověřena pomocí SDS-PAGE.

Vliv proteinu LmrB na produkci LmrC byl hodnocen porovnáním míry jeho produkce u kmenů ΔB a $\Delta B+B_c$ (Obr. 40D). Kmen ΔB postrádající gen pro metyltransferázu obsahuje nemetylované ribozomy. Tento kmen vykazoval srovnatelnou produkci proteinu LmrC v reakci na LIN a CLI jako WT. To nasvědčuje tomu, že absence LmrB nemá zásadní vliv na regulaci produkce LmrC. Naopak kmen s konstitutivní produkcí metyltransferázy LmrB ($\Delta B+B_c$) obsahoval metylované ribozomy v pozici A2058 na 23S rRNA (*E. coli* číslování). Tato metylace zamezila vazbě linkosamidů na ribozom. V tomto případě produkce LmrC nereagovala na přítomnost LIN ani CLI. Produkce byla indukována pouze PIIA, který si zachoval schopnost vazby k ribozomu i přes metylaci. Výsledky naznačují, že vazba antibiotik na ribozom je nezbytná pro indukci produkce LmrC a jejich pouhá přítomnosti není dostatečná. Neboť je gen *lmrB* lokalizován v operonu s regulačním genem *lmbU*, je protein LmrB dobrým kandidátem pro protein zprostředkovávající zpětnovazebnou smyčku regulační kaskády. Výše popsany vliv proteinů LmrA i LmrB na míru vázaného

antibiotika na ribozom tedy představuje regulační mechanismus, který vede ke snížení produkce proteinu LmrC.

Výsledky prezentované v rámci prvních kapitol této dizertační práce doplněné o další klíčové experimenty, taktéž uvedené v minulých kapitolách, provedené Mgr. Markétou Koběorskou, Ph.D., Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou, Ph.D. a Mgr. Vladimírem Vimbergem, Ph.D. umožnily odkrýt novou regulační kaskádu biosyntézy LIN, v jejímž středu stojí ARE5 ABCF protein LmrC. LmrC pomáhá přenášet signál o přítomnosti antibiotik na CSR regulátor *lmbU*, který následně řídí biosyntézu LIN. Tato navržená regulační kaskáda je znázorněna na (Obr. 41). Tím je LmrC prvním charakterizovaným ARE5 ABCF proteinem s duální, rezistenčně-regulační funkcí.



Obrázek 41: Schéma signální kaskády regulující biosyntézu LIN prostřednictvím ARE5 ABCF proteinu LmrC. Exprese genu *lmrC* je indukována LSAP antibiotiky skrze mechanismus ribozomem zprostředkované atenuace. Tento indukční proces je negativně regulován rezistenční funkcí proteinů LmrA a LmrB, které snižují koncentraci ribozomů s navázaným antibiotikem. Protein LmrC následně působí jako aktivátor transkripce CSR regulačního genu *lmbU*, který aktivuje expresi BCG pro produkci LIN.

Objasnění vztahů v rámci BGC bylo výsledkem týmové spolupráce. Výsledky získané mnou a kolegy tvoří ucelený obraz, který odhaluje komplexní propojení regulace biosyntézy LIN v reakci na přítomnost antibiotika jako signální molekuly. Výsledky jsou zde proto prezentovány jako celek s pečlivými odkazy na kolegy, kteří dané výsledky získali. Bez vzájemného propojení těchto výsledků by nedošlo k objasnění této regulační dráhy.

Tato objevená duální rezistenčně-regulační funkce u ARE5 ABCF proteinů otvírá otázku, jak dalece je rezistenční funkce ARE proteinů oddělena od té regulační. Genomy zástupců kmene *Actinobacteria* disponují vyšším počtem ABCF proteinů. Kromě genu *lmrC* obsahuje genom bakterie *S. lincolnensis* také gen pro druhý ARE5 protein označený jako SLINC7152, který je kódován mimo BGC. Tato lokalizace mimo BGC může naznačovat jak na čistě regulační funkci proteinu, tak na jeho zapojení do regulační dráhy ovlivňující zatím neznámý cíl.

5.5. Charakterizace rezistenční specificity ARE5 proteinů u *Streptomyces coelicolor* M145

LmrC je prvním ARE ABCF proteinem, u kterého byla potvrzena rezistenčně-regulační funkce. Abychom lépe pochopili rozšíření této duální funkce mezi ARE5 ABCF proteiny, zaměřili jsme se na modelový organismus *S. coelicolor* M145. V genomu této bakterie se nacházejí dva geny (*sco0636* a *sco6720*) kódující ARE5 proteiny, které jsou lokalizovány mimo biosyntetické klastry. V této práci označujeme gen *sco0636* jako *tiaA*.

Při testování citlivosti na TIA bylo pozorováno, že bakterie *S. coelicolor* je oproti *S. lincolnensis* vysoce rezistentní vůči tomuto antibiotiku (Obr. 30A). Tato rezistence by mohla být zprostředkována jedním ze dvou ARE5 proteinů kódovaných v genomu bakterie *S. coelicolor* M145.

5.5.1. Příprava konstruktů a kmenů pro analýzu funkce ARE5 proteinů u *S. coelicolor*

Pro objasnění funkce jednotlivých ARE5 proteinů v bakteriálním kmenu *Streptomyces coelicolor* M145 byly použity deleční kmeny, ve kterých byly inaktivovány příslušné geny pro tyto proteiny. Kmen s deletovaným genem *sco6720* byl připraven metodou CRISPR-Cas9, optimalizovanou pro použití v rodě *Actinomyces* (272). Tento kmen připravila Mgr. Markéta Koběřská Ph.D.

V průběhu mého doktorského studia jsem zaškolila Mgr. Nikolu Pindřákovou do metodiky inaktivace genů metodou REDIRECT PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2); (273) a manipulace s DNA. V rámci tohoto školení byl vytvořen kmen s delecí genu *tiaA* (označen jako Δ TiaA) a byl připraven komplementační plazmid zajišťující konstitutivní expresi tohoto genu (dále značen jako TiaA_C). Vektor nese označení pLV032. Příprava konstruktů i deleční mutanty byla součástí diplomové práce Mgr. Nikoly Pindřákové.

Vektor pLV032 byl doplněn o konstrukt pLV040, který umožňuje konstitutivní expresi genu *sco6720* (dále značen jako SCO6720_C). Gen *sco6720* byl amplifikován z genomové DNA (gDNA) kmene *S. coelicolor* M145 (Kap. 4.2.4.4.) pomocí PCR reakce (Kap. 4.2.4.5.). Primery Sco6720pIJ_FW a Sco6720pIJ_R (Tab. 4) použité k amplifikaci měly ve své 5'koncové části sekvenci rozeznávanou endonukleasou NdeI, nebo HindIII. Amplifikovaný gen byl přes tyto restriční místa vložen do plasmidu pIJ10257 pod kontrolu konstitutivního promotoru *emrE**. Úspěšnost ligace byla ověřena koloniovou PCR (Kap. 4.2.4.5.) a po izolaci plazmidové DNA také sekvenačně.

Konstrukty byly následně vneseny do kmenů *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M1154, Δ TiaA a Δ SCO6720 pomocí mezidruhové konjugace. Seznam nově připravených kmenů použitých pro charakterizaci proteinů TiaA a SCO6720 je uveden v (Tab. 31). Tyto kmeny byly doplněny dříve připravenými kmeny vzniklými v rámci projektu LmrC.

Tabulka 31: Seznam připravených bakteriálních kmenů

Bakteriální kmen	Charakteristika	Konjugovaný plazmid	Recipientní kmen
<i>S. coelicolor</i> M145 + TiaA _C (BGD3743)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257:: <i>tiaA</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV032	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + SCO6720 _C (BGD3751)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257:: <i>sco6720</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV040	<i>S. coelicolor</i> M145
ΔTiaA + pIJ10257 (BGD3727)	<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>tiaA</i> ::Apra ^r (pIJ10257, Hyg ^r)	pIJ10257	ΔTiaA
ΔTiaA + SCO6720 _C (BGD3754)	<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>tiaA</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>sco6720</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV040	ΔTiaA
ΔTiaA + B _C (BGD3724)	<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>tiaA</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>lmrB</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV030	ΔTiaA
ΔSCO6720 + SCO6720 _C (BGD?)	<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>sco6720</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>sco6720</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV040	ΔSCO6720
<i>S. coelicolor</i> M1154 + TiaA _C (BGD3766)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257:: <i>tiaA</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV032	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. coelicolor</i> M1154 + SCO6720 _C (BGD3757)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257:: <i>sco6720</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV040	<i>S. coelicolor</i> M1154

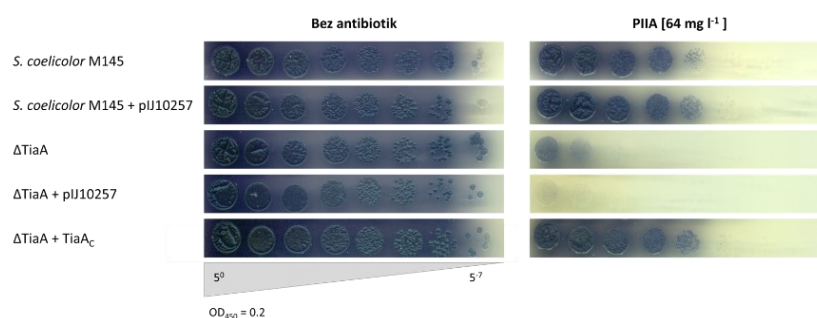
5.5.2. Stanovení citlivostí

Pro stanovení antibiotické specifity a míry zapojení ARE5 proteinů do rezistence u *S. coelicolor* byly analyzovány hodnoty MIC připravených delečních mutant a kmenů s nadprodukcí proteinu TiaA nebo SCO6720. Testovanými antibiotiky byly linkosamidy (LIN a CLI), pleuromutiliny (TIA), streptograminy A (PIIA) a B (PIA), makrolidy (ERY), amfenikoly (CAM), PURO a TET. Citlivost byla stanovena agarovou diluční metodou, která byla v případě PIIA doplněna o kapkový test z důvodu jeho omezené rozpustnosti.

A

Bakteriální kmeny		MIC [mg · l ⁻¹]								
		50S						30S		
		LS _A P			MS _B		PhO		PURO	TET
LIN	CLI	PIIA	TIA	ERY	PIA	CAM				
M145	pIJ10257	16 – 32	8 – 16	> 64	128 – 256	8 – 16	16	64	64	32 – 64
	TiaA _C	16 – 32	8 – 16	> 64	256	8 – 16	16 – 32	64	64	32 – 64
	SCO6720 _C	32	32 – 64	> 64	256	8 – 16	16 – 32	64	ND	128
		16	4 – 8	> 64	0,25	8 – 16	16 – 32	64	64	32 – 64
ΔTiaA	pIJ10257	16	4 – 8	> 64	0,25	8 – 16	ND	64	64	32
	TiaA _C	32	32 – 64	> 64	256	8 – 16	16 – 32	64	ND	128
	SCO6720 _C	16 – 32	8 – 16	> 64	0,25	16	16 – 32	ND	64	32 – 64
		32	8	ND	256	16	ND	ND	64	32
ΔSCO6720	SCO6720 _C	64	16	ND	256	16	ND	ND	64	32
M1154		2 – 4	0,5	> 64	128 – 256	2 – 4	8	16	< 16	4 – 8
	pIJ10257	4	1	> 64	128 – 256	2 – 4	16	16 – 32	< 16	8 – 16
	TiaA _C	4 – 8	8	> 64	128 – 256	4 – 8	8 – 16	32	ND	16
	SCO6720 _C	4 – 8	2	> 64	64 – 128	2	8	16	< 16	< 8

B



Obrázek 42: Charakterizace rezistenčního fenotypu proteinů TiaA a SCO6720. (A) Stanovení hodnot MIC pro vybraná LS_AP, MS_B a PhO antibiotika doplněná o PURO a TET. Analýza byla provedena pro deleční mutanty (ΔTiaA a ΔSCO6720), jejich komplementace a nadprodukce v kmenech *S. coelicolor* M145 a *S. coelicolor* M1154 pomocí agarové diluční metody. ND – hodnota nebyla stanovena (B) Vliv proteinu TiaA na rezistenci vůči PIIA byl analyzován pomocí kapkového testu v přítomnosti PIIA (64 mg.l⁻¹). Kmeny byly vysety na MH agar v pětinasobném seriovém ředění sporových suspenzí s počáteční hodnotou OD₄₅₀ = 0,2.

Dle očekávání pro předpokládaný fenotyp ARE5 proteinů, nebyla rezistence vůči ERY, PIA, CAM a PURO ovlivněna delecí ani konstitutivní expresí genů pro ARE5 proteiny u testovaných kmenů *S. coelicolor* (Obr. 42A). V případě TET bylo detekováno slabé zvýšení rezistence při nadprodukcí proteinu TiaA, avšak delece genu *tiaA* (ΔTiaA) tento efekt nepotvrdila. Pozorovaný efekt mohl být způsoben fluktuací hodnot MIC, nebo aktivací neurčeného regulačního faktoru zajišťující slabé zvýšení rezistence vůči TET při nadprodukcí TiaA.

Míra ovlivnění rezistence k LS_AP antibiotikům byla mezi jednotlivými ARE5 proteiny odlišná. Přítomnost proteinu TiaA byla spojena s vysokou úrovní rezistence k TIA (Obr. 42A). Delece genu *tiaA*

vedla k výraznému zvýšení citlivosti k tomuto antibiotiku ($MIC_{TIA} = 0,25 \text{ mg.l}^{-1}$), což bylo potvrzeno komplementací. Pomocí kapkového testu bylo dále prokázáno zapojení TiaA v rezistenci vůči PIIA (Obr. 42B). Rezistence k linkosamidovým antibiotikům byla potvrzena konstitutivní expresí genu *tiaA* v citlivém kmenu *S. coelicolor* M1154, kde došlo ke zvýšení rezistence vůči CLI. Tento efekt byl také pozorován při nadprodukcii TiaA v kmenech *S.coelicolor* M145 a Δ TiaA. Výsledky naznačují, že TiaA vykazuje klasický LS_{AP} rezistenční fenotyp ARE5 proteinů s vysokou specificitou pro TIA a PIIA. To bylo následně potvrzeno testováním dvojité deleční mutanty (Δ TiaA Δ SCO6720, data a kmen získán Mgr. Markétou Koběorskou Ph.D.). Pozorovaná vysoká rezistence vůči TIA vedla k našemu označení proteinu SCO0636 jako TiaA.

Na rozdíl od proteinu TiaA nebyla přítomnost SCO6720 spojena s vysokou úrovní rezistence k TIA (Δ TiaA + SCO6720_C; Obr. 42A). Delece genu *sco6720* (Δ SCO6720) nevedla ani k významnému ovlivnění rezistence vůči testovaným antibiotikům. To naznačuje překryv funkcí mezi oběma ARE5 proteiny. Konstitutivní exprese *sco6720* přispěla k mírnému vzrůstu rezistence vůči CLI, ale v menší míře než v případě TiaA. V případě zmíněné dvojité mutanty došlo k zvýšení citlivosti vůči CLI a následnému potvrzení vlivu obou proteinů na CLI rezistenci. Rezistence vůči LIN nebyla ovlivněna ani u dvojité mutanty (data získána Mgr. Markétou Koběorskou Ph.D.) Pravděpodobným důvodem, proč nebyla pozorována změna LIN rezistence, je vnitřní rezistence kmenu způsobená WblC regulonem (274–276).

Celkově se zdá, že protein SCO6720 udílí jen slabou úroveň rezistence k LS_{AP} antibiotikům a je pro úroveň rezistence *S. coelicolor* postradatelný. Naopak TiaA hraje zásadní roli v rezistenci k TIA. TIA je semisyntetickým derivátem v přírodě se vyskytujícího se pleuromutilinu, který je produkován zástupci houbového rodu *Clitopilus* patřícího mezi *Basidiomycota*. Předpokládali jsme, že TiaA může mít zásadní úlohu v mezidruhové interakci s tímto producentem.

5.5.3. Rezistence k tiamulinu v rodě *Actinobacteria*

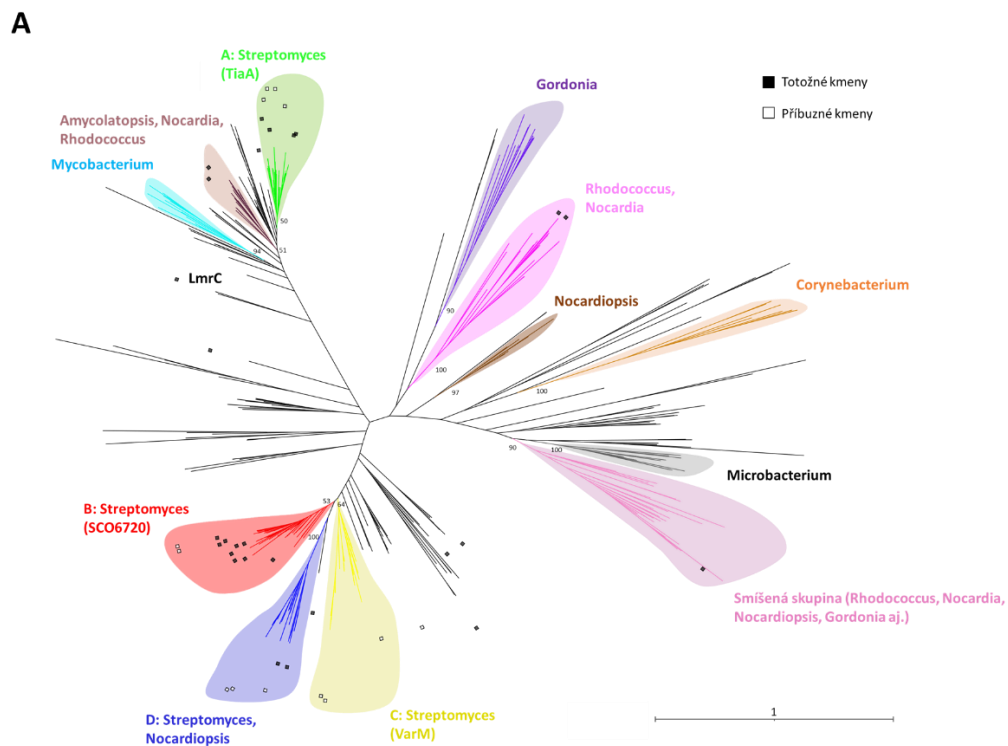
Vysoká úroveň rezistence vůči TIA může souviset s ekologickým přesahem v podobě mezidruhových vztahů mezi bakteriemi a zástupci *Basidiomycota*. Stanovené hodnoty MIC vůči TIA pro kmeny *S. coelicolor* ($MIC_{TIA} = 128\text{--}256 \text{ mg.l}^{-1}$) a *S. lincolnensis* ($MIC_{TIA} = 2\text{--}4 \text{ mg.l}^{-1}$) naznačují, že rezistence k TIA se nevyskytuje plošně u všech zástupců rodu *Streptomyces*. Pro objasnění, jak je tato vysoká rezistence rozšířena v rámci skupiny *Actinobacteria*, byla fylogenetická analýza skupiny ARE5 proteinů pro vybrané zástupce propojena se stanovením hodnot MIC k TIA, CLI a ERY.

Fylogenetická analýza vycházela z publikované sady dat pro ABCF proteiny, která byla zúžena na skupinu ARE5 proteinů. Tato sada byla dále doplněna o aminokyselinové sekvence ARE5 proteinů z kmenů, pro které byly stanoveny hodnoty MIC, pokud nebyly v použité databázi uvedeny. Příprava fylogenetického stromu je uvedena v Kap. 4.2.16.

Fylogenetická analýza odhalila několik druhově převažujících skupin ARE5 proteinů (Obr. 43A). ARE5 proteiny ze *S. coelicolor* přísluší do dvou oddělených fylogenetických skupin označených písmeny A a B. Protein LmrC nacházející se v BGC pro LIN z *S. lincolnensis* s námi popsanou duální funkcí naopak tvoří samostatnou větev spolu s proteinem z bakterie *Allokutzneria albata* bez dalších blízkých homologů. Většina námi testovaných kmenů měla ve svém genomu kódovány dva odlišné ARE5 proteiny v určitých pravděpodobně preferovaných kombinacích (skupina A a B, skupina C a D). Přítomnost TiaA homologu nebo proteinu z námi označené skupiny D (modrá barva) byla spojena s tendencí k vyšší rezistenci k TIA

(Obr. 43B). Skupina D zahrnuje proteiny převážně z rodů *Streptomyces* a *Nocardiosis*. Rezistence k ERY se v rámci námi analyzované sady příliš nelišila a kmeny byly spíše citlivé. V testovaných kmenech nebyla detekována kombinace proteinů ze skupiny A a D v jednom kmeni. Naopak homology proteinu SCO6720 se vyskytují i osamoceně. Kmeny, postrádající ARE5 byly naopak citlivé na všechna testovaná antibiotika.

Fylogenetická data naznačují, že se rezistence vůči TIA u rodu *Streptomyces* vyvinula nezávisle několikrát, což poskytuje nepřímý důkaz o jejím ekologickém významu. Porovnání genomového okolí genů následně ukázalo, že oblasti v okolí TiaA homologů jsou méně konzervované než oblasti skupin C a D (Obr. 44). V našich datech pro skupinu C byl pozorovaný konzervovaný gen lokalizovaný před genem pro ARE5 protein. Tento gen kóduje regulační protein patřící do skupiny SsgA proteinů regulující buněčné dělení a sporulaci a je specifický pro sporulující bakterie kmene *Actinobacteria* (277). Tento gen byl často detekován také v okolí SCO6720 homologů. Naopak v případě některých homologů TiaA byl v jeho blízkosti lokalizován gen pro AAF4 ABCF protein.

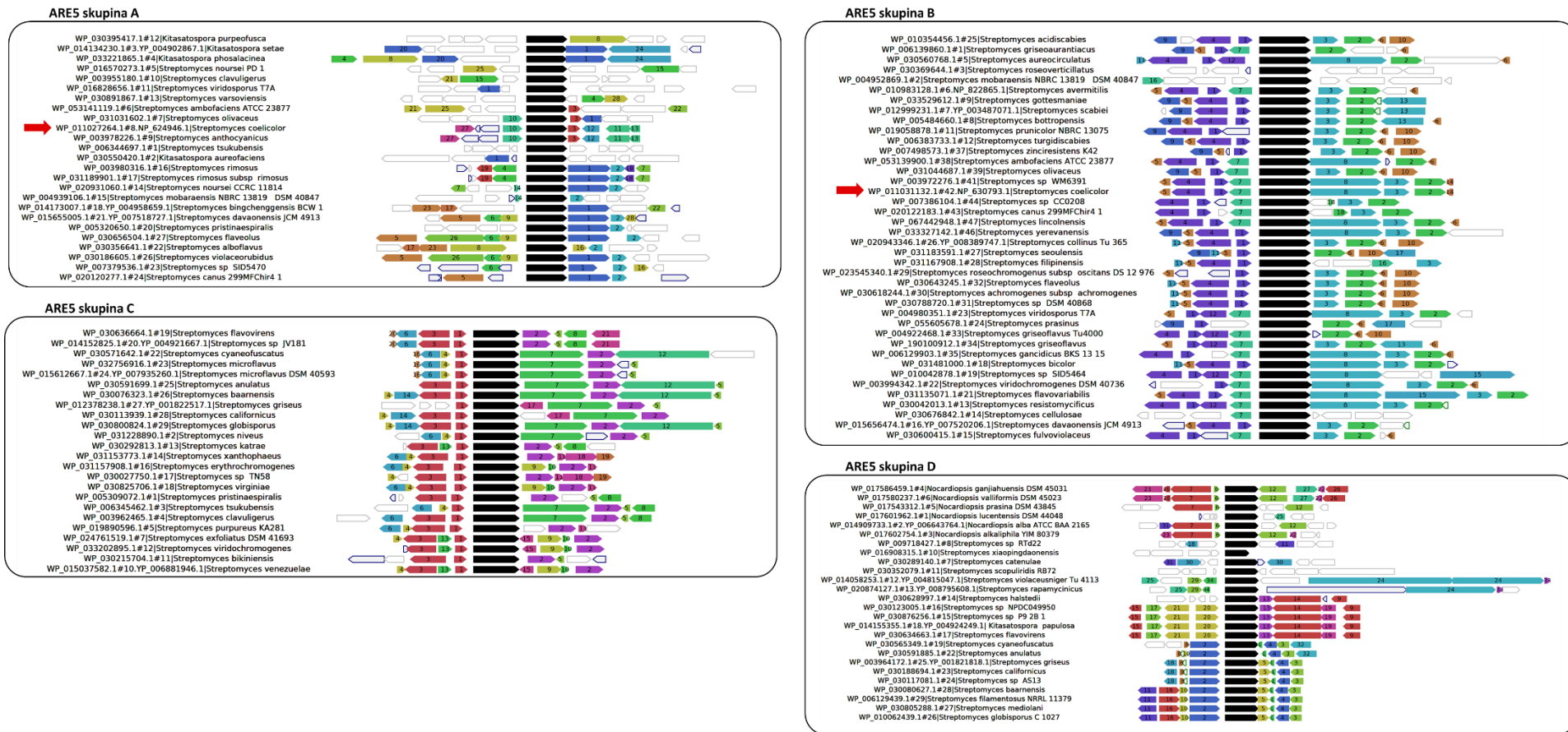


B

ARE5 skupiny	Bakteriální kmeny	MIC [mg l ⁻¹]		
		TIA	CLI	ERY
Green	<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces lividans</i> OS 45.6 ⁺	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces ambofaciens</i> OSC2 ⁺	Red	ND	Green
	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>limoneus</i> KCTC 1717	Red	Green	ND
	<i>Streptomyces antibioticus</i> ISP 5234	Red	Green	Green
	<i>Kitasatospora phosalacinea</i> CCM 4152	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC 39897 ⁺	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces globisporus</i> DSM 40991 ⁺	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces griseus</i> CCM 3178 ⁺	Red	Green	ND
	<i>Streptomyces niveus</i> DSM 40088 ⁺	Red	Green	Green
Yellow	<i>Streptomyces catenulae</i> DSM 40258	Red	Green	Green
	<i>Nocardiosis prasina</i> DSM 43845	Red	ND	ND
	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces griseoflavus</i> Tu4000	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces griseoflavus</i> NRRL B-5312	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces prasinus</i> NRRL B-12521	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces caelestis</i> ATCC 15084	Red	Red	ND
	<i>Streptomyces avermitilis</i> DSM 46492	Red	Green	Green
	<i>Amycolatopsis keratiniphila</i> subsp. <i>keratiniphila</i> NRRL B-24117	Red	Green	Green
	<i>Nocardia carnea</i> CCM 2756	Red	Red	Green
Blue	<i>Nocardia tenerifensis</i> DSM 44704	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces albus</i> J1074	Red	Green	Green
	<i>Streptomyces scabrissporus</i> DSM 41855	Red	Green	Green
	<i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030	Red	Green	Green
	<i>Kocuria rhizophila</i> CCM 552	Red	Green	Green

≤ 2 16 ≥ 128

Obrázek 43: Konzervovanost TIA rezistence u kmene *Actinobacteria*. (A) Fylogenetická analýza ARE5 proteinů provedená metodou maximální pravděpodobnosti odhalila druově specifické skupiny. (B) U 25 zástupců kmene *Actinobacteria* byla testována citlivost vůči TIA, CLI a ERY pomocí agarové diluční metody. ARE ABCF proteiny z testovaných kmenů jsou ve fylogenetickém stromě znázorněny plným černým čtverečkem, příbuzné kmeny prázdným čtverečkem. ND – hodnota nebyla stanovena.

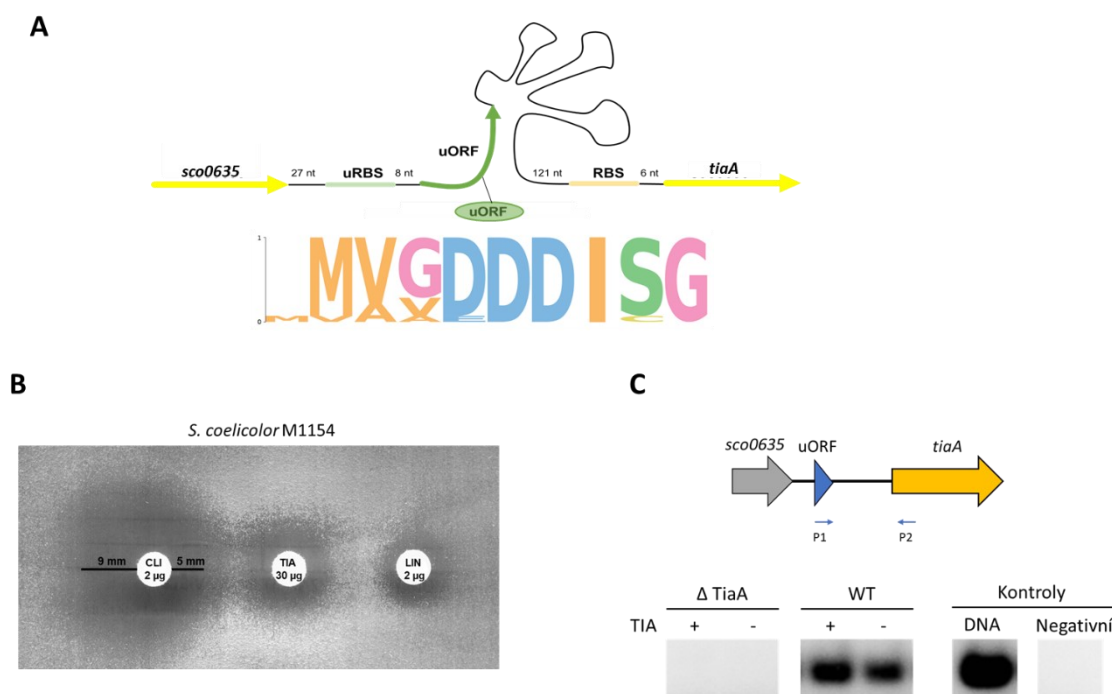


Obrázek 44: Výsledky analýzy okolí genů pro skupiny ARE5 proteinů. Analýza byla provedena pomocí WebFlaGs (262) pro ARE5 skupiny stanovené fylogenetickou analýzou. Geny kódující homologní proteiny mají stejné číselné označení a barvu. Červené šipky označují pozici ARE5 proteinů u *S. coelicolor* (TiaA a SCO6720).

5.5.3.1. Bioinformatická analýza regulačních oblastí před ARE5 proteiny

Fylogenetická analýza ve spojení se stanovením citlivosti k antibiotikům potvrdila úlohu TiaA v rezistenci vůči TIA v širším kontextu, kde kmeny obsahující homology TiaA obecně vykazovaly vyšší úroveň rezistence ($MIC_{TIA} = 32\text{-}256 \text{ mg.l}^{-1}$) krom kmenu *S. albus* subsp. *albus* ATCC39897. Exprese ARE ABCF genů je často indukována subinhibiční koncentrací antibiotik prostřednictvím ribozomem zprostředkované atenuace. Antibiotika indukující expresi těchto genů se překrývají s jejich antibiotickou specificitou, což jsme potvrdili i v případě genu *lmrC* (201, 212, 230, 231).

Při kultivaci kmenu *S. coelicolor* M1154, který je citlivý k linkosamidům, byla zmenšena inhibiční zóna kolem disku obsahující 2 μg CLI na straně přiléhající k disku s TIA (Obr. 45B). Tento výsledek naznačoval, že exprese *tiaA* může být indukována TIA. V případě, že TiaA je regulován podobně jako ostatní ARE ABCF proteiny, měl by jeho 5'UTR obsahovat regulační uORF a atenuátor. Pro predikci otevřených čtecích rámců *in silico* byl použit bioinformatický nástroj uORF4u (261).



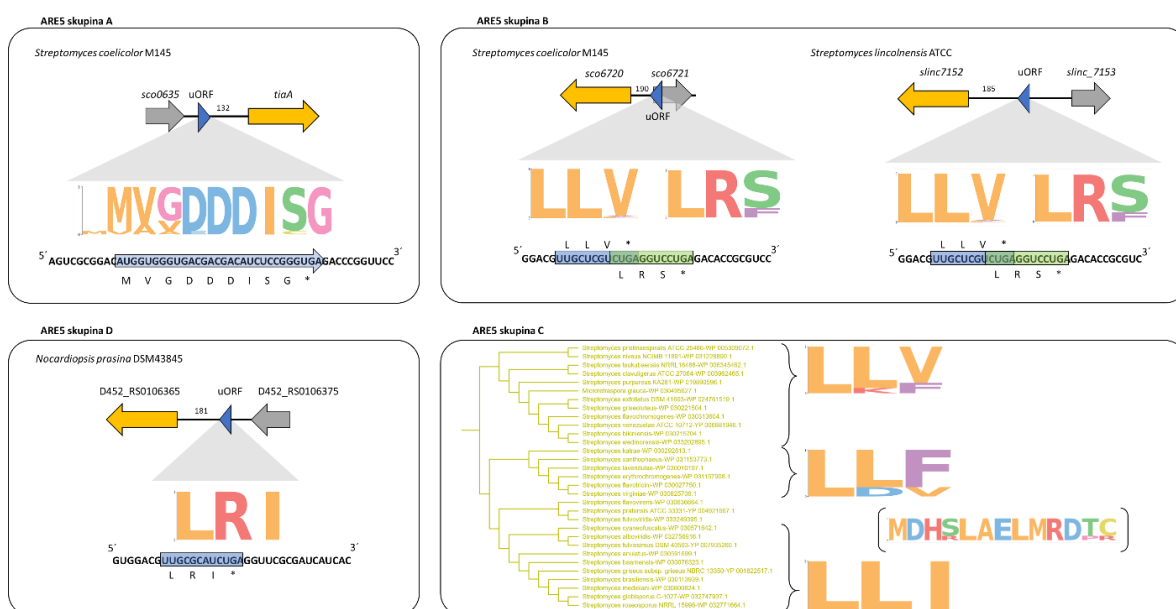
Obrázek 45: Regulace exprese genu *tiaA* (A) Schématické znázornění regulačních oblastí v 5'UTR oblasti před genem *tiaA* s vyznačeným *tiaAL*. Bioinformatické predikce byly provedeny pomocí nástrojů PASIFIC (258) a uORF4u (261). (B) Diskový difúzní test demonstrující změnu průměru inhibiční zóny růstu kmene *S. coelicolor* M1154 u disku s CLI (2 μg) v blízkosti disku obsahujícího TIA (30 μg). Tento efekt nebyl pozorovaný u inhibiční zóny kolem disku s LIN (2 μg). (C) Transkripce predikovaného uORF ve stejném transkriptu s genem *tiaA* byla potvrzena pomocí RT-PCR. Transkript nebyl detekován v kmeni s deletovaným genem *tiaA* (Δ TiaA). Jako pozitivní kontrola byl použit kosmid 7G01. V negativní kontrole byl templát nahrazen dH_2O . Produkty RT-PCR byly analyzovány pomocí 2% (w/v) agarosové gelové elektroforézy. Pozice primerů jsou znázorněno schématicky.

Analýza odhalila, že ve vzdálenosti 132 nt před genem *tiaA* je predikován uORF, označený jako *tiaAL* (Obr. 46), kódující peptid o délce 9 aminokyselin (MVGDDDISG). Využitím RT-PCR (Kap.4.2.5.) bylo následně potvrzeno, že jsou geny *tiaAL* a *tiaA* transkribovány společně (Obr. 45C). V testovaných podmínkách nebyla viditelná indukce TIA, která byla pozorována změnou rezistence při diskovém difúzním testu. Přítomnost uORF byla predikována také pro druhý ARE5 protein SCO6720. V 5'UTR regionu u homologů SCO6720 (skupina B) byly predikovány dva vzájemně se překrývající čtecí rámce (*sco6720L1*

a *sco6720L2*) kódující sekvenční M*LV a M*RS (* alternativní START kodón). V případě *S. coelicolor* jsou lokalizovány 190 nt před genem *sco6720* (Obr. 46). Stejné rozložení se nachází také před genem *slinc7152* pro druhý ARE5 protein u *S. lincolnensis*. Bioinformatický nástroj PASIFIC (258) predikoval přítomnosti attenuátorů v 5'UTR obou genů.

V rámci predikce uORF v okolí genů patřících do skupiny D byl detekován podobný uORF (M*RI), který se jako jediný vyskytoval ve všech testovaných regionech (Obr. 46). Naopak u skupiny C nebyl predikovaný jednotný uORF. Při rozdělení skupiny C na podvětvě, byl objeven jistý konsensus v podobě tripeptidů (M*LV, M*LF a M*LI). U druhově specifických fylogenetických skupin nebyly predikovány žádné uORF, pravděpodobně kvůli nízkému počtu kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze, čímž nemuselo dojít k detekci jejich případných skupin.

Translační aktivita peptidů M*LV (SCO6720L1) a MGVDDDISG (TiaAL) včetně specifity indukce byla následně experimentálně ověřena Mgr. Michaelou Novotnou, MSc., Durgou Mahor Ph.D., Mgr. Julií Pokornou a Mgr. Pamelou Omenou Petravicius (268).



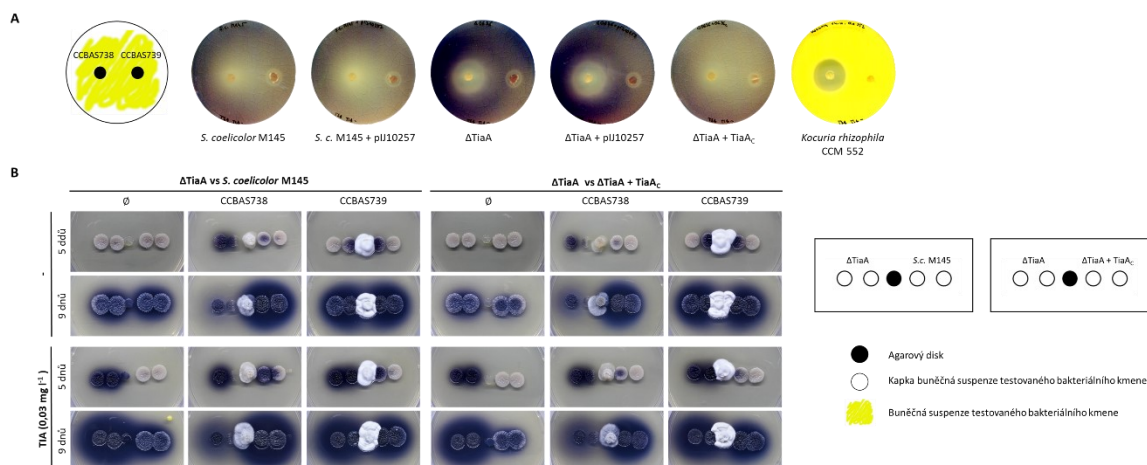
Obrázek 46: Analýza 5'UTR regionů ARE5 ABCF proteinů. Predikce krátkých regulačních uORF u fylogeneticky definovaných skupin ARE5 proteinů. Analýza byla provedena pomocí nástroje uORF4u (261).

5.6. Mezidruhové interakce *Streptomyces coelicolor* a *Clitopilus passeckerianus*

Vzhledem k vysoké rezistenci kmene *S. coelicolor* vůči TIA, semisyntetickému derivátu pleuromutilinu produkovaného zástupci houbového rodu *Clitopilus* (*Basidiomycota*), byly zkoumány mezidruhové interakce mezi touto bakterií a kmeny *Clitopilus passeckerianus* prostřednictvím jejich společné kultivace (Kap. 4.2.11.). Tento přístup se snažil napodobit přirozené prostředí, ve kterém dochází k interakci mezi druhy. Pro sledování vzájemných interakcí byl použit kmen *S. coelicolor* M145, mutanta Δ TiaA a její komplementace v kombinaci s dvěma kmeny *C. passeckerianus* (CCBAS738 a CCBAS739). Pro sledování vzájemných vztahů byl růst monitorován průběžně.

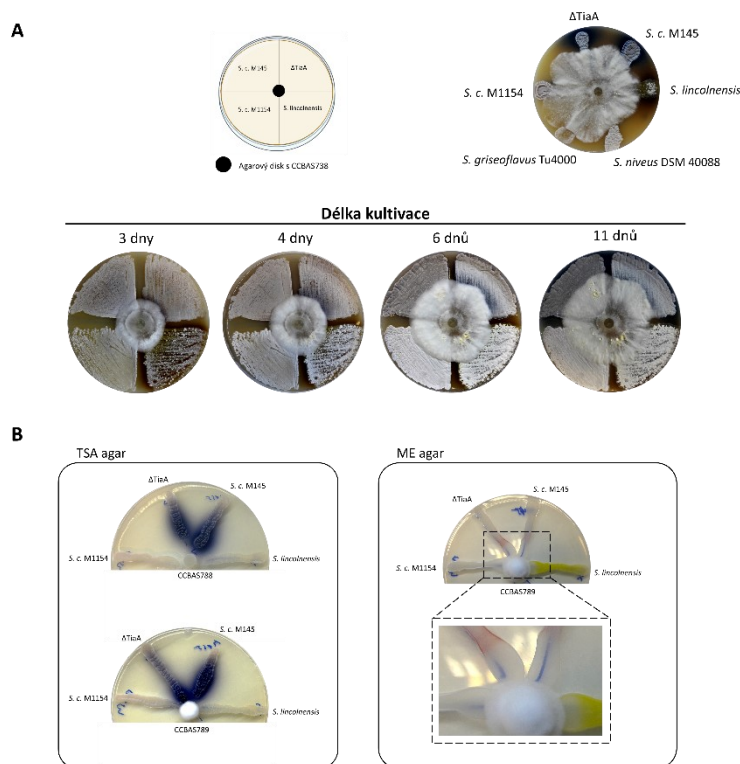
Oba kmeny *C. passeckerianus* produkovaly na TSA agarů antibakteriální látky aktivní proti testovaným kmenům *S. coelicolor* (Obr. 47A). Ovšem pouze kmen CCBAS738 vykazoval produkci pleuromutilinu, která byla asociována se zvětšením inhibiční zóny u kmenů postrádající gen *tiaA* (Δ TiaA, Δ TiaA + pIJ10257). Při

společné kultivaci byl pozorován snížený růst kmene Δ TiaA v blízkosti agarového disku s kmenem CCBAS738, zatímco přítomnost proteinu TiaA byla spojena s normálním růstem (Obr. 47B). Zároveň byla detekována změna produkce ACT u testovaných kmenů. Kmen Δ TiaA reagoval na přítomnost pleuromutilinu dřívější produkcí ACT než *S. coelicolor* M145 nebo Δ TiaA + TiaA_C. Celková produkce ACT byla ovšem v porovnání s těmito kmeny nižší pravděpodobně z důvodu detekované inhibice růstu. Vliv pleuromutilinu na produkci ACT byl podobný efektu TIA. Zároveň byla produkce ACT koncentračně závislá. Produkce ACT byla pozorována i u *S. coelicolor* M145, Δ TiaA a Δ TiaA + TiaA_C po 5 dnech kultivace v přítomnosti kmene CCBAS739.



Obrázek 47: Společná kultivace kmenů *S.coelicolor* a houby *C. passeckerianus* na TSA agaru. (A) Testování citlivosti kmenů *S.coelicolor* M145, deleční mutanty Δ TiaA, její komplementace a kmene *Kocuria rhizophila* vůči sekundárním metabolitům kmenů *C. passeckerianus* CCBAS738 a CCBAS739. (B) Stanovení vzájemného ovlivnění růstu při společné kultivaci v těsné blízkosti.

Navzdory indukcí produkce ACT u kmenů *S. coelicolor* v reakci na pleuromutilin produkovaný *C. passeckerianus* neměla přítomnost ACT vliv na růst kmene CCBAS738 (Obr. 48A). Tento kmen byl schopen přerůst námi testované kmeny *S. coelicolor* (*S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M1154, Δ TiaA) i další vybrané kmeny rodu *Streptomyces* (*S. lincolnensis*, *Streptomyces griseoflavus* Tu4000 a *Streptomyces niveus* DSM40088).



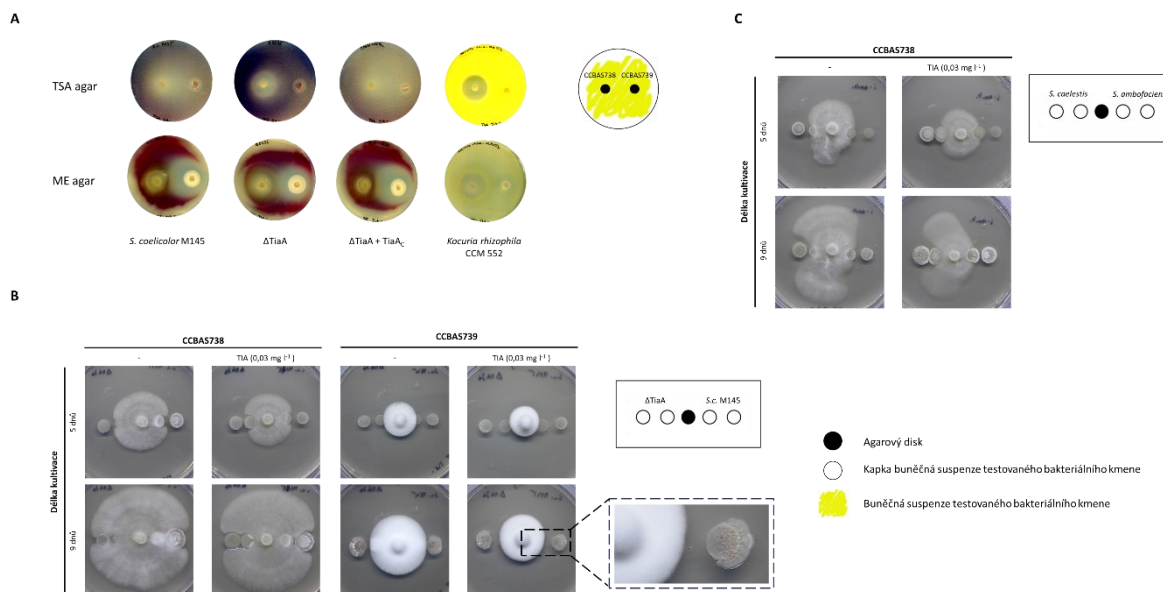
Obrázek 48: Společná kultivace zástupců rodu *Streptomyces* s kmeny *C. passeckerianus*. (A) Kultivace kmene *C. passeckerianus* CCBAS738 společně s kmeny *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M1154, Δ TiaA, *S. lincolnensis*, *Streptomyces griseoflavus* Tu4000 a *Streptomyces niveus* DSM40088 na MS agaru. Přítomnost streptomycet neovlivňuje růst kmene *C. passeckerianus* CCBAS738. (B) Porovnání změn v míře indukce sekundárního metabolismu kmenů *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M1154, Δ TiaA a *S. lincolnensis* při společné kultivaci s kmeny *C. passeckerianus* CCBAS738 a CCBAS739 na TSA a ME agaru.

Některé fenotypické vlastnosti kmenů *C. passeckerianus* byly ovlivněny použitým kultivačním médiem. Na ME agaru došlo v porovnání s TSA agarem ke změně produkčního profilu (Obr. 49A). Tato produkční změna způsobila zvětšení inhibiční zóny kolem agarového disku s kmenem CCBAS739 a indukcí produkce RED u kmenů *S. coelicolor*. Rovněž byla pozorovaná inhibiční zóna pro bakterii *Kocuria rhizophila* CCM552. Dále se lišil fenotyp růstu kmene *C. passeckerianus* CCBAS738.

Při společné kultivaci na ME agaru s několika kmeny rodu *Streptomyces* bylo také detekováno rozdílné mezidruhové chování (Obr. 49B, C). Kmen CCBAS739 přerůstal oblast obsazenou kmeny *S. coelicolor* bez ohledu na přítomnost proteinu TiaA. Pravděpodobně v důsledku jiného sekundárního metabolitu, než který byl produkovaný na TSA agaru, došlo k odklonu růstu kmenů *S. coelicolor* dále od místa, které bylo obsazeno kmenem CCBAS739. Naopak kmen CCBAS738 projevil rozdílné preference v obsazení prostoru obsazeného různými bakteriálními kmeny. Při jeho společné kultivaci s kmeny *S. coelicolor* na ME agaru došlo k postupnému převrstvení bakterií kmenem CCBAS738. Byl pozorován slabý rozdíl v přítomnosti proteinu TiaA a v reakci na přítomnost TIA. Silnější efekt byl pozorován při interakci s kmeny *S. caelestis* a *Streptomyces ambofaciens*, kde kmen CCBAS738 preferoval volný prostor agaru.

Produkce sekundárních metabolitů u *S. coelicolor* a *S. lincolnensis* byla také rozdílná v reakci na médium (Obr. 48B). Zároveň díky paprskovému zaočkování kmenů bylo zřetelnější, že produkce závisí na koncentraci, ale plně nekoresponduje s lineárním poklesem vzhledem ke vzdálenosti od agarového disku s kmenem *C. passeckerianus*.

Rezistence *C. passeckerianus* vůči ACT, koncentračně závislé chování produkce ACT a dotestování dalších kmenů bylo následně provedeno Mgr. Markétou Koběorskou Ph.D.



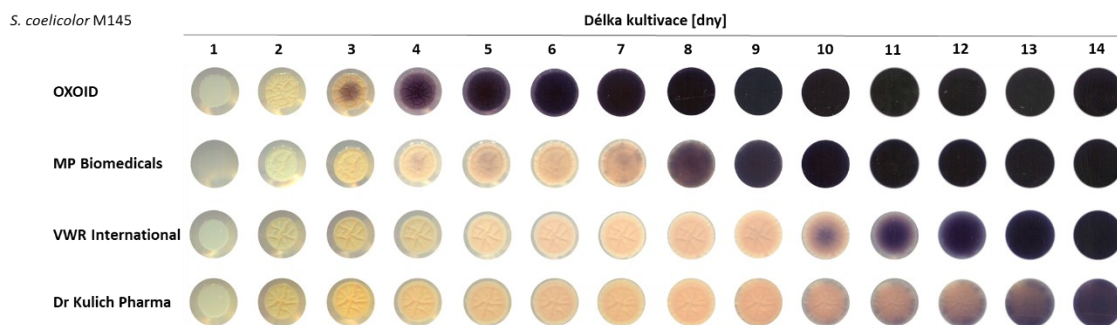
Obrázek 49: Společná kultivace kmenů *Streptomyces* a *C. passeckerianus* na ME agaru. (A) Testování citlivosti kmenů *S.coelicolor* M145, deleční mutanty Δ TiaA, její komplementace a kmene *Kocuria rhizophila* vůči sekundárním metabolitům kmenů *C. passeckerianus* CCBAS738 a CCBAS739. (B) Stanovení vzájemného ovlivnění růstu při společné kultivaci kmenů *S.coelicolor* M145, deleční mutanty Δ TiaA s *C. passeckerianus* CCBAS738 a CCBAS739. (C) Stanovení vzájemného ovlivnění růstu při společném kultivaci kmenů *S. caelestis* a *Streptomyces ambofaciens* s *C. passeckerianus* CCBAS738 a CCBAS739

5.7. ARE5 proteiny TiaA a SCO6720 ovlivňují produkci ACT indukovanou ribozom-vazebnými antibiotiky

Naše výsledků ukazují, že protein TiaA je klíčovým faktorem rezistence k TIA a je obecně spojen s rezistencí vůči LS_AP antibiotikům. Naopak protein SCO6720 hraje v této rezistenci méně významnou roli, což naznačuje jeho možné zapojení do regulace. Protein SCO6720 tak představuje potenciálního kandidáta na druhý ARE5 ABCF protein s duální funkcí podobný proteinu LmrC. Na rozdíl od LmrC není gen pro protein SCO6720 lokalizován v BGC.

Antibiotika vážící se na ribozom byla identifikována jako induktory produkce ACT (112, 113). Přesný mechanismus této indukce zatím není znám, ale přítomnost LIN zvyšuje expresi ACT regulátoru *actII-ORF4* (112). Jak bylo ukázáno v předchozí kapitole, podobný vliv na ACT produkci mají i pleuromutilinová antibiotika, konkrétně TIA a pleuromutilin.

Tato kapitola se zaměřuje na možné zapojení ARE5 proteinů do produkce ACT, která je modulována ribozom-vazebnými antibiotiky. Produkce ACT byla sledována na MH agaru v přítomnosti subinhibiční koncentrace CLI, TIA a ERY (Kap. 4.2.10.). Takto získaná data byla dána do kontextu s dříve stanovenými hodnotami MIC pro zmíněná antibiotika (Kap. 5.5.2.). V rámci optimalizace podmínek pro sledování produkce ACT byl analyzován vliv typu použitého agaru, který ovlivňoval začátek produkce (Obr. 50). V našich experimentech byl dále použit agar od společnosti MP Biomedicals.



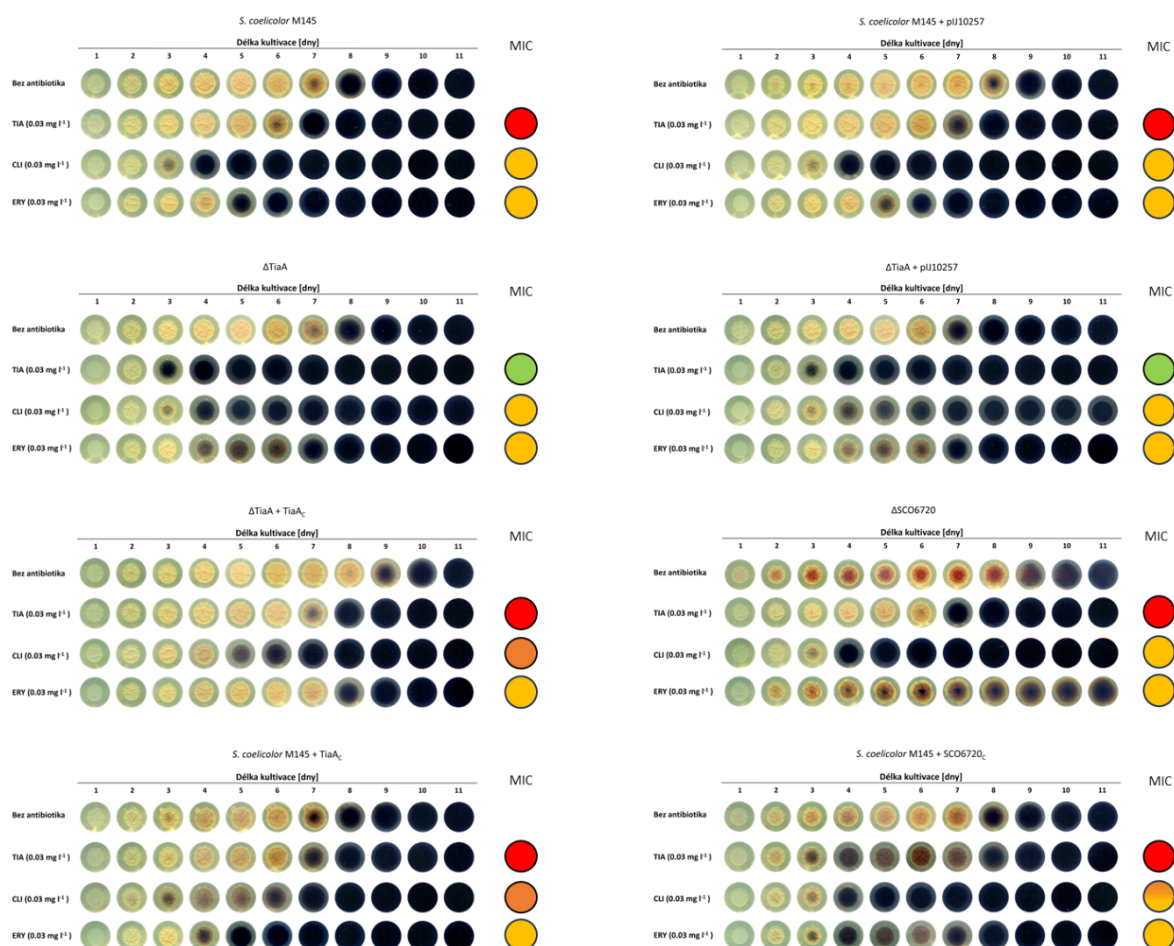
Obrázek 50: Vliv složení kultivačního média na produkce aktinorodinu. Značka použitého agaru ovlivňovala začátek produkce u *S. coelicolor* M145. Kultury byly pěstovány na MH agaru.

Konzistentně s dříve publikovanými daty byl detekován dřívější nástup produkce ACT v přítomnosti CLI a ERY u *S. coelicolor* M145 (Obr. 51). Absence TiaA byla spojena nejen se zvýšenou citlivostí k TIA, ale také s dřívějším nástupem produkce ACT. Naopak při konstitutivní expresi *tiaA* (Δ TiaA + TiaA_C, *S. coelicolor* + TiaA_C) byl vliv TIA a CLI na nástup produkce potlačen. Delece genu *sco6720* nebyla spojena ani se změnou rezistence ani se změnou produkce ACT. Jeho nadprodukce byla naopak doprovázena dřívější slabou indukcí ACT produkce v přítomnosti TIA i když kmen disponuje genem *tiaA*.

Tyto výsledky naznačují, že TiaA oddaluje antibiotiky indukovaný nástup produkce ACT prostřednictvím své rezistence. Naproti tomu protein SCO6720 ovlivňuje produkci ACT jen okrajově. Jeho potenciální akcelerační vliv naznačuje, že by mohl mít komplexnější regulační roli.

Bakteriální kmen	-	TIA	CLI	ERY
<i>S. coelicolor</i> M145	7	6.5	3.5	4.5
<i>S. coelicolor</i> M145 + pIJ10257	8.5	7	3	5
<i>S. coelicolor</i> M145 + TiaA _C	7	7	3	6
<i>S. coelicolor</i> M145 + SCO6720 _C	8	3	8	3
ΔTiaA	7.5	3	3.5	4
ΔTiaA + pIJ10257	7	3	3.5	4
ΔTiaA + TiaA _C	9	7.5	5	8
ΔSCO6720	8.5	7	3.5	4.5

MIC	
[red circle]	128 - 256
[orange circle]	32 - 64
[yellow circle]	4 - 16
[green circle]	0,25 - 2



Obrázek 51: Vliv ARE5 proteinů TiaA a SCO6720 na antibiotiky indukovanou produkci ACT. Srovnání produkce ACT produkce u kmene *S. coelicolor* M145, delečních mutant (Δ TiaA a Δ SCO6720) a kmenů s jejich komplementací, či nadprodukce v přítomnosti TIA, CLI a ERY (0,03 mg.l⁻¹) na MH agaru. Produkce byla monitorována po dobu 11 dní.

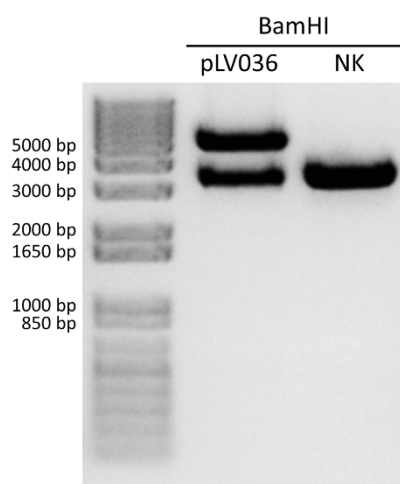
5.8. Heterologní exprese a nadprodukce ABCF proteinů ve spojitosti s rezistencí a produkcí ACT

Cílem této části práce bylo zjistit, zda vedle proteinů TiaA a SCO6720 mají na produkci ACT vliv i další ABCF proteiny (LmrC, SLINC7152 a SCO6742) a 23S rRNA monometyltransferáza LmrB. Zároveň byla testována antibiotická specifita rezistence udělená těmito ARE5 proteiny v genetickém kontextu zatím netestovaných kmenů.

5.8.1. Příprava konstruktů a kmenů

Pro sledování vlivu testovaných proteinů při heterologní expresi a nadprodukci byly využity konstrukty pro konstitutivní expresi genů pro námi testované ARE5 proteiny. Tyto vektory byly doplněny o konstrukt označený jako pJV030 zajišťující konstitutivní expresi genu *slinc7152* a plazmid pLV036 pro konstitutivní expresi genu *sco6742*, který kóduje AAF1 ABCF protein z *S. coelicolor* M145. Pro AAF1 protein Ard1 bylo experimentálně potvrzeno zapojení v rezistenci vůči aminonukleosidovému antibiotiku A201A (184).

Pro přípravu konstruktů zajišťující konstitutivní expresi *slinc7152* a *sco6742* byly navrženy primery Sco6742pIJFW, Sco6742pIJREV, SLI_7152_pIJ_R a SLI_7152_pIJ_F pro jejich amplifikaci z gDNA příslušných kmenů (Tab. 4). Izolace gDNA obou kmenů byla provedena pomocí komerčního kitu Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Primery obsahovaly ve své 5'koncové části sekvenci rozeznávanou buď endonukleasou NdeI, nebo HindIII pro vložení do vektoru pIJ10257 pod kontrolu konstitutivního promotoru *ermE**. Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genu *sco6742* jsou uvedeny v Kap. 4.2.4.5. Úspěšné vložení amplifikovaného úseku s genem *sco6742* do vektoru pIJ10257 bylo ověřeno pomocí koloniové PCR (Kap. 4.2.4.5.). Následně byl vybraný konstrukt, označený jako pLV036 (dále SCO6742_C), izolován a byla provedena restriční analýza za využití endonukleasy BamHI (Obr. 52). Správnost sekvence a její vložení do vektoru bylo následně ještě potvrzeno sekvenační analýzou. Konstrukt zajišťující konstitutivní expresi genu *slinc7152*, označený jako pJV030 (dále značen SLINC7152_C), byl připraven a ověřen Mgr. Janou Veselou.



Restriční enzym	Konstrukt	Očekávané velikosti fragmentů [bp]
BamHI	SCO6742 _C	3145, 5133
	pIJ10257	3145, 3535

Obrázek 52: Ověřovací restriční analýza plazmidů pLV036. DNA elektroforéza (1% (w/v) agarosový gel) vzniklých fragmentů po ověřovací restriční analýze za využití endonukleázy BamHI. Předpokládané délky fragmentů jsou uvedeny v tabulce. Jako negativní kontrola (NK) byl využit prázdný plazmid pIJ10257.

Nově připravené konstrukty byly pomocí mezidruhové konjugace vloženy do dříve připravených bakteriálních kmenů. Seznam kmenů připravených pro testování ARE5 a AAF1 ABCF proteinů je uveden v Tab. 32. V případě potřeby byly tyto kmény doplněny dříve připravenými kmény.

Tabulka 32: Seznam připravených kmenů

Bakteriální kmen	Charakteristika	Konjugovaný plazmid	Recipientní kmen
<i>S. coelicolor</i> M145 + SCO6742 _C (BGD3763)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257:: <i>sco6742</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV036	<i>S. coelicolor</i> M145
<i>S. coelicolor</i> M145 + SLINC7152 _C (BGD3773)	<i>S. coelicolor</i> M145 (pIJ10257:: <i>slinc7152</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pJV030	<i>S. coelicolor</i> M145
ΔTiaA + SLINC7152 _C (BGD3776)	<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>tiaA</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>slinc7152</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pJV030	ΔTiaA
ΔTiaA + SCO6742 _C (BGD3745)	<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>tiaA</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>sco6742</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV036	ΔTiaA
<i>S. coelicolor</i> M1154 + SCO6742 _C (BGD3823)	<i>S. coelicolor</i> M1154 (pIJ10257:: <i>sco6742</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV036	<i>S. coelicolor</i> M1154
<i>S. lincolnensis</i> + SLINC7152 _C (BN3771)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 (pIJ10257:: <i>slinc7152</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pJV030	<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466
ΔC + SLINC7152 _C (BN3768)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>slinc7152</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pJV030	BN3001
ΔC + TiaA _C (BN3715)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>tiaA</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV032	BN3001
ΔC + Sco6720 _C (BN3754)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>sco6720</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV040	BN3001
ΔC + Sco6742 _C (BN3748)	<i>S. lincolnensis</i> ATCC25466 Δ <i>lmrC</i> ::Apra ^r (pIJ10257:: <i>sco6742</i> pod kontrolou <i>ermEp</i> , Hyg ^r)	pLV036	BN3001

5.8.2. Testování fenotypů

Pro posouzení vlivu proteinů SCO6742 a SLINC7152 na rezistenci a posouzení vlivu nadprodukce a heterologní exprese pro ostatní námi testované proteiny byly stanoveny hodnoty MIC pomocí agarové diluční metody. MIC hodnoty byly měřeny pro linkosamidy (LIN a CLI), pleuromutiliny (TIA), streptograminy A (PIIA) a B (PIA), makrolidy (ERY), amfenikoly (CAM), PURO a TET. Stanovené hodnoty MIC byly následně dány do souvislosti s výsledky analýzy produkce ACT.

Protein LmrC zvyšoval rezistenci vůči TIA v citlivém heterologním hostiteli Δ TiaA (Tab. 33). Tento výsledek potvrdil námi odhadovanou specificitu a odpovídal nízké míře indukce tímto antibiotikem (Obr. 40A). Protein TiaA si zachoval svoji schopnost zvyšovat rezistenci k TIA také při své heterologní expresi v kmeni Δ C, ale míra rezistence byla výrazně nižší ($MIC_{TIA} = 16 \text{ mg.l}^{-1}$) než v jeho přirozeném kontextu (Tab. 33).

ARE5 protein SLINC7152 zvyšoval rezistenci vůči linkosamidovým antibiotikům (LIN a CLI) v citlivém heterologním hostiteli *S. coelicolor* M1154, ale neovlivnil rezistenci k TIA (Δ TiaA + SLINC7152_C). Zvýšení rezistence k linkosamidům bylo nižší než pro protein LmrC za stejných podmínek (Tab. 33). Jelikož SLINC7152 patří do stejné fylogenetické podskupiny ARE5 proteinů jako protein SCO6720 (Obr. 43A), který udílí pouze nízkou rezistenci vůči CLI, a zároveň jsou geny pro oba proteiny lokalizovány mimo BGC, mohly by oba proteiny plnit regulační funkci.

Tabulka 33: Analýza rezistenčního fenotypu při expresi proteinů SCO6742, SLINC7152, LmrC a LmrB. Stanovení MIC pro vybraná antibiotika ze skupin LS_AP, MS_B a PhO, doplněná o PURO a TET, bylo provedeno agarovou diluční metodou. Testovány byly kmeny *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M1154, Δ TiaA a Δ C s nadrodkací studovaných proteinů. ND – hodnota nebyla stanovena.

Bakteriální kmeny		MIC [mg . l ⁻¹]								
		50S						30S		
		LS _A P			MS _B		PhO	PURO	TET	
		LIN	CLI	PIIA	TIA	ERY	PIA	CAM		
M145	pIJ10257	16 – 32	8 – 16	> 64	128 – 256	8 – 16	16	64	64	32 – 64
	SCO6742 _C	16 – 32	8 – 16	> 64	256	8 – 16	16 – 32	64	64	32 – 64
	SLINC7152 _C	32	16 – 32	ND	256	16	ND	64	32	32
	C _C	64	32 – 64	ND	256	16	ND	64	64	32 – 64
	B _C	128	32 – 64	> 64	256	8 – 16	32	64	ND	64
Δ TiaA	pIJ10257	> 8192	> 512	> 64	128	64	ND	ND	ND	ND
	SCO6742 _C	16	4 – 8	> 64	0,25	8 – 16	16 – 32	64	64	32 – 64
	SLINC7152 _C	16	4 – 8	> 64	0,25	8 – 16	ND	64	64	32
	C _C	32	8	ND	0,25	8 – 16	16 – 32	64	64	64
	B _C	32	32	ND	0,5	16	ND	64	64	64
M1154	pIJ10257	128	32	> 64	2 – 4	8 – 16	16 – 32	ND	ND	ND
	SCO6742 _C	> 4096	> 512	> 64	0,25	64	32	ND	ND	ND
	SLINC7152 _C	2 – 4	0,5	> 64	128 – 256	2 – 4	8	16	< 16	4 – 8
	C _C	4	1	> 64	128 – 256	2 – 4	16	16 – 32	< 16	8 – 16
	B _C	2	0,5	ND	64	< 4	ND	8	< 16	< 8
Δ C	pIJ10257	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 16	ND
	SCO6742 _C	32	16	ND	64 – 128	< 4	ND	16 – 32	ND	8 – 16
	SLINC7152 _C	2048	512	ND	128	ND	ND	ND	ND	ND
	C _C	16384	256 – 512	> 64	2 – 4	32 – 64	> 64	32	64	16 – 32
	B _C	16384	256	> 64	2 – 4	32 – 64	ND	32 – 64	64	16 – 32
Δ C	TiaA _C	> 8192	256	> 64	16	32 – 64	ND	ND	ND	ND
	SCO6720 _C	> 4096	128 – 256	ND	1	16 – 32	> 64	ND	32	16 – 32
	SCO6742 _C	> 4096	8	ND	2	128	ND	64	32 – 64	16 – 32
	SLINC7152 _C	> 4096	32	ND	2	64 – 128	ND	32 – 64	64	16 – 32
	C _C	16384	512	> 64	2 – 4	32 – 64	ND	16 – 32	ND	16

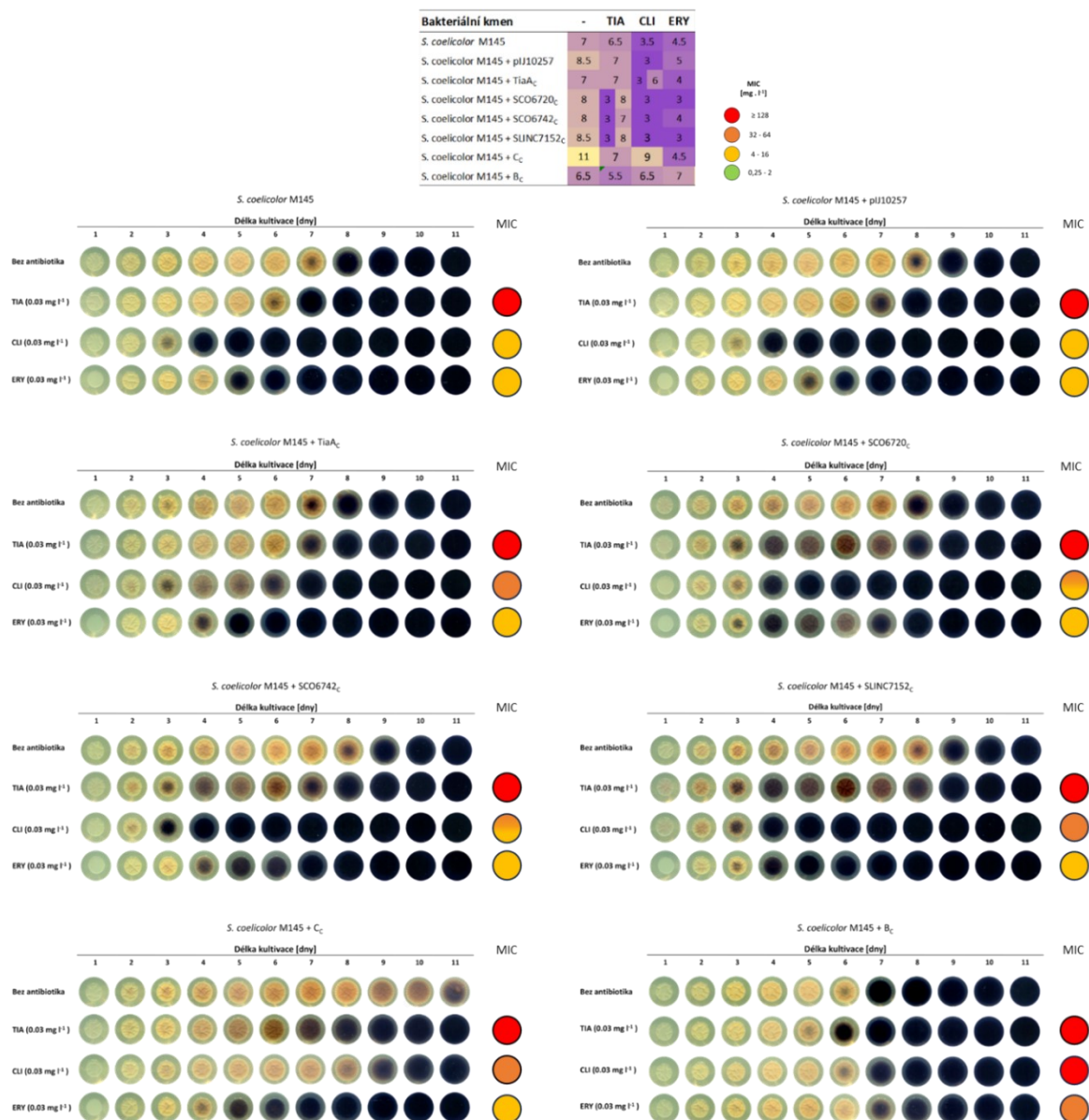
Pro AAF1 protein SCO6742 nebylo detekováno zvýšení rezistence pro LS_AP antibiotika (Tab. 33). Vzhledem k potvrzenému zapojení AAF1 proteinu Ard1 do rezistence k aminonukleosidovému antibiotiku

byla testována také citlivost k PURO. Jako ideální kmen pro budoucí ověření zapojení SCO6742 do rezistence na tuto skupinu antibiotik byl vybrán kmen *S. coelicolor* M1154. Ostatní testované kmeny byly vůči PURO rezistentní. Rezistence k ostatním testovaným antibiotikům se s výjimkou ERY v případě proteinu LmrB pro žádný z analyzovaných proteinů zásadně nelišila.

Při sledování ACT produkce eliminoval protein LmrC signál CLI pro spuštění ACT produkce v obou testovaných kmenech (*S. coelicolor* M145 + C_C (Obr. 53) a Δ TiaA + C_C (Obr. 54)). U kmene Δ TiaA + C_C došlo také k ovlivnění produkce ACT v přítomnosti TIA (Obr. 54). Přítomnost proteinu LmrB byla naopak spojena s opožděnou produkcí ACT v přítomnosti CLI a ERY. LmrB neovlivnil reakci na TIA. Pro oba proteiny byly pozorované změny v produkci ACT ve shodě s jejich stanoveným rezistenčním profilem.

Stejně jako protein SCO6720 i proteiny SCO6742 a SLINC7152 spouštěly slabou produkci ACT v přítomnosti TIA již ve třetím dni kultivace v kmeni *S. coelicolor* M145, a to i přes vysokou hladinu rezistence vůči TIA (Obr. 53). Pro protein SLINC7152 byl navíc detekovaný pomalejší nástup ACT produkce v přítomnosti CLI, což může odrážet jeho schopnost udílet slabou rezistenci k tomuto antibiotiku. V kmenech s deletovaným genem *tiaA* (Δ TiaA) vedla nadprodukce proteinů SCO6720 a SCO6742 k slabé dřívější produkci ACT a to i bez indukujícího antibiotika (Obr. 54). Protein SLINC7152 vykazoval opačný efekt, kdy byl začátek produkce posunut až na 11. den kultivace.

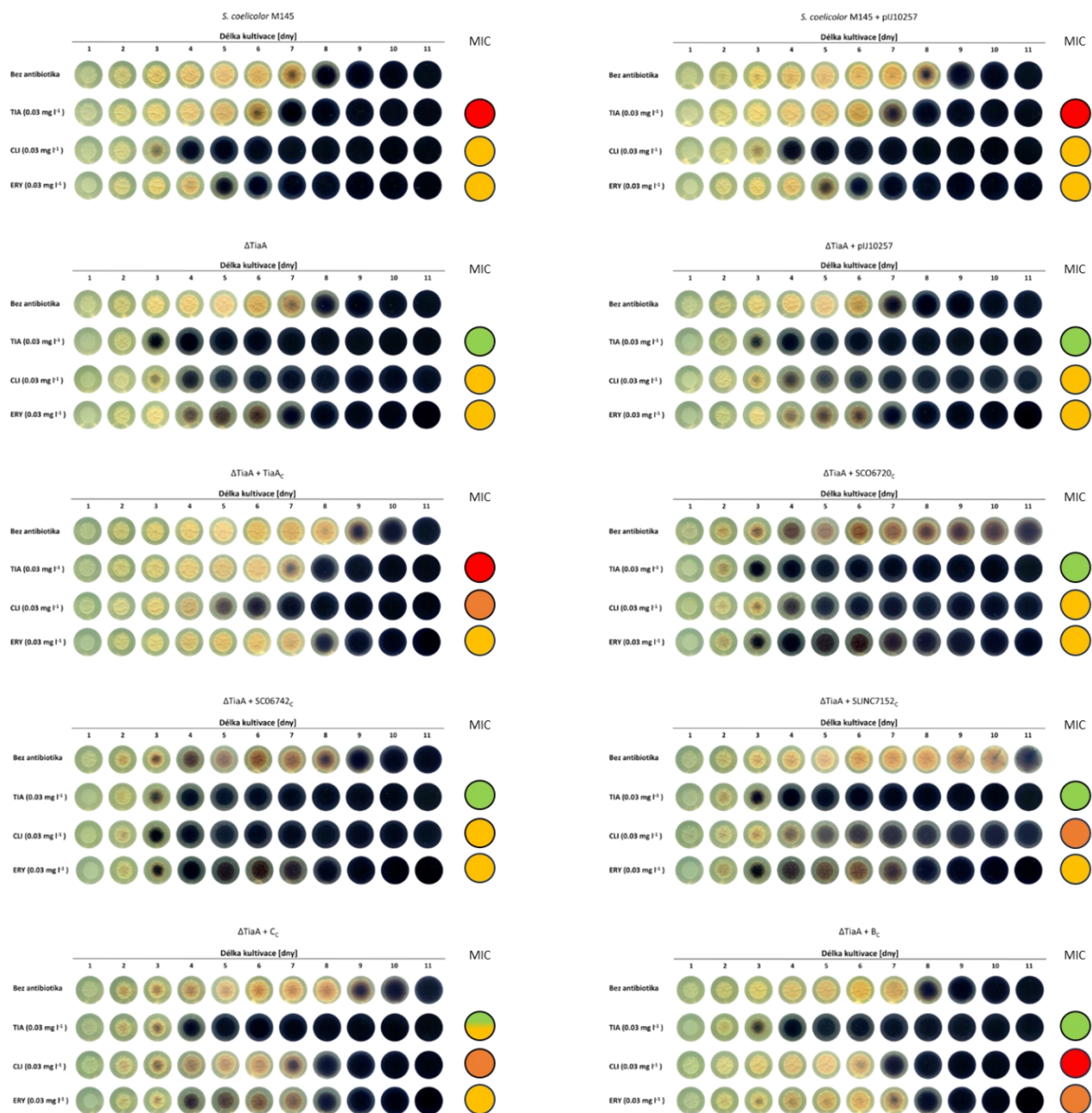
Metylace ribozomu zabráňuje vazbě makrolidů, linkosamidů a streptograminů B, zatímco ARE5 proteiny zajišťují rezistenci ochranou ribozomu a vytěsněním navázaných antibiotik. Lze tedy předpokládat, že regulace produkce ACT je ovlivněna antibiotiky inhibovaným ribozomem. Tato inhibice pravděpodobně následně vede k ovlivnění CSR regulátoru *actII-ORF4*. Navzdory tomu se zdá, že i samotná přítomnost ABCF proteinů mění regulaci ACT produkce a při absenci TiaA je regulační dráha narušena. To nasvědčuje tomu, že mechanismus regulace bude komplexnější.



Obrázek 53: Vliv proteinů SCO6742, SLINC7152, LmrC a LmrB na antibiotiky indukovanou produkci ACT. Srovnání produkce ACT u kmene *S. coelicolor* M145 s nadprodukcí testovaných proteinů v přítomnosti TIA, CLI a ERY o koncentraci 0,03 mg.l⁻¹ na MH agaru. Podukce byla monitorovna po dobu 11 dní.

Bakteriální kmen	-	TIA	CLI	ERY
<i>S. coelicolor</i> M145	7	6.5	3.5	4.5
<i>S. coelicolor</i> M145 + pJ10257	8.5	7	3	5
Δ TiaA + pJ10257	7	3	3.5	4
Δ TiaA + TiaA _C	9	7.5	5	8
Δ TiaA + SCO6720 _C	4	10	3	4
Δ TiaA + SCO6742 _C	3	9	3	3
Δ TiaA + SLINC7152 _C	11	3	4	6
Δ TiaA + C _C	9	4	7	4
Δ TiaA + B _C	8	3	7	7.5

MIC	●
[mg · l ⁻¹]	
●	≥ 128
●	32 - 64
●	4 - 16
●	0,25 - 2



Obrázek 54: Vliv proteinů SCO6742, SLINC7152, LmrC a LmrB na antibiotiky indukovanou produkci ACT. Srovnání produkce ACT u kmene Δ TiaA s nadprodukcí testovaných proteinů v přítomnosti TIA, CLI a ERY o koncentraci 0,03 mg.l⁻¹ na MH agaru. Podukce byla monitorována po dobu 11 dní.

5.9. Optimalizace metod pro studium proteinu LmrC v *in vitro* podmínkách

V posledních letech došlo k významnému pokroku v charakterizaci ABCF proteinů, přesto zůstávají některé otázky nevyřešené. Tyto proteiny obsahují specifické subdomény, jejichž funkce nebyla dosud plně charakterizována a jejich role tak zůstává nejasná. Zároveň doposud nebyla publikována žádná struktura proteinu z ARE5, ARE4 ani z dalších podrodin ABCF proteinů specifických pro rod *Actinobacteria* (AAF1-

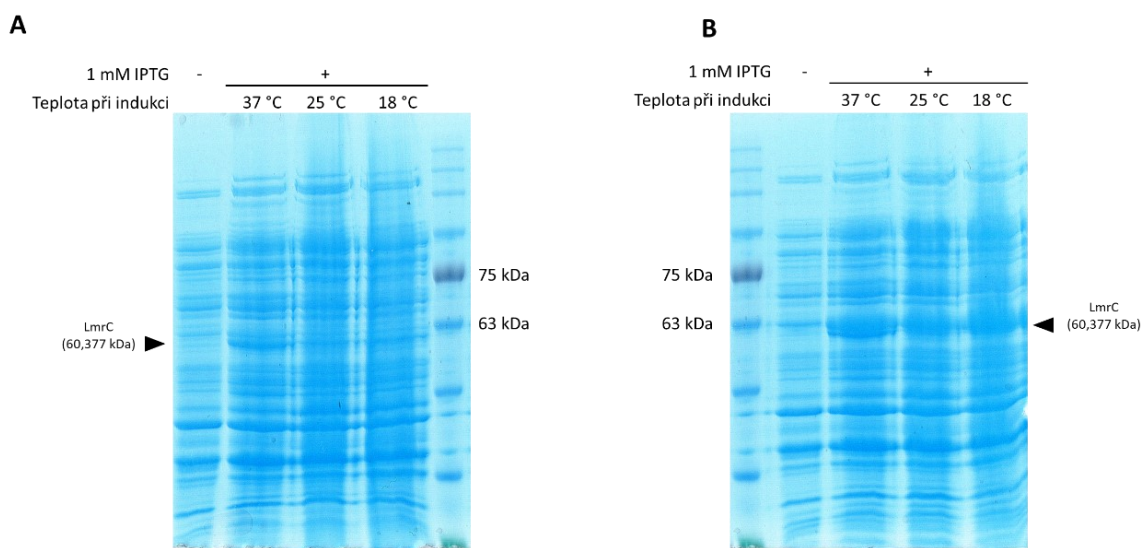
AAF6). V průběhu mého doktorského studia jsem se proto také zaměřila na optimalizaci purifikace proteinu LmrC a *in vitro* transkripčně-translačního systému.

5.9.1. Purifikace proteinu LmrC

Pro budoucí stanovení struktury proteinu LmrC pomocí kryo-elektronové mikroskopie a jeho použití v *in vitro* transkripčně-translačním systému byly optimalizovány podmínky pro purifikaci tohoto proteinu pomocí metaloafinitní chromatografie. Optimalizovaný purifikační protokol měl sloužit jako výchozí bod pro purifikaci proteinu LmrC s modifikovanými subdoménami pro jejich následnou funkční charakterizaci.

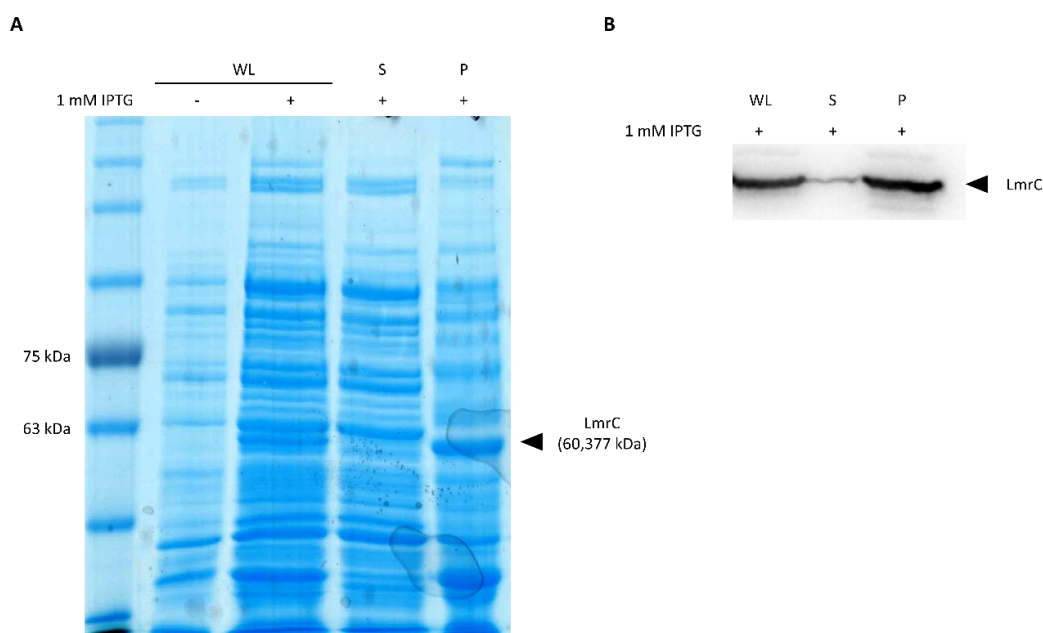
Protokol pro purifikaci proteinu LmrC vycházel z podmínek zavedených v laboratoři Antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky pro purifikaci ARE1 proteinu Vga_{ALC}. Expresní vektor pro produkci proteinu LmrC připravil Mgr. Jakub Lenart Ph.D. Protein byl na svém C-konci fúzován s histidinovou kotvu složenou z šesti histidinových zbytků.

Pro nalezení optimálních podmínek kultivace pro nadprodukcii proteinu LmrC byla testována exprese indukovaná při OD₆₀₀ = 0,9 (± 0,1) přidavkem 1 mM IPTG v kmenech *E. coli* BL21 a *E. coli* BL21GroEL/ES. Testovány byly tři různé podmínky indukce: 37 °C po dobu 90 min, 25 °C po dobu 4 hod a 18 °C po dobu 21 hod. Nejvyšší výtěžek proteinu LmrC poskytl kmen *E. coli* BL21GroEL/ES, obsahující chaperoniny pro usnadnění skládání produkovaného proteinu, při teplotě 37 °C a délce indukce 90 min (Obr. 55).



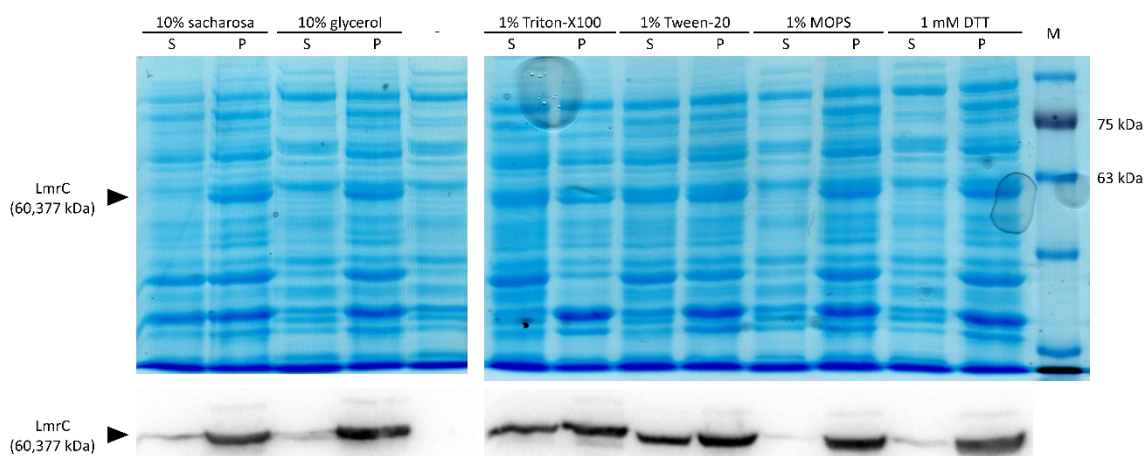
Obrázek 55: Optimalizace podmínek pro heterologní expresi proteinu LmrC. Porovnání výtěžku produkce proteinu LmrC analyzovaného pomocí SDS-PAGE v kmenech *E. coli* BL21 (A) a *E. coli* BL21 GroEL/ES (B) při různých indukčních podmínkách (teplota a doba indukce).

Přesto byla většina proteinu ve zvolených podmínkách indukce přítomna v nerozpustné buněčné fázi (Obr. 56). Poměr mezi rozpustnou a nerozpustnou fází byl potvrzen také pomocí imunoblotu. Stabilita proteinu LmrC nebyla ovlivnitelná teplotou, která byla použita při indukci. Neboť by purifikace při takto nízké proteinové stabilitě nebyla úspěšná, byla provedena optimalizace složení lyzačního pufru.



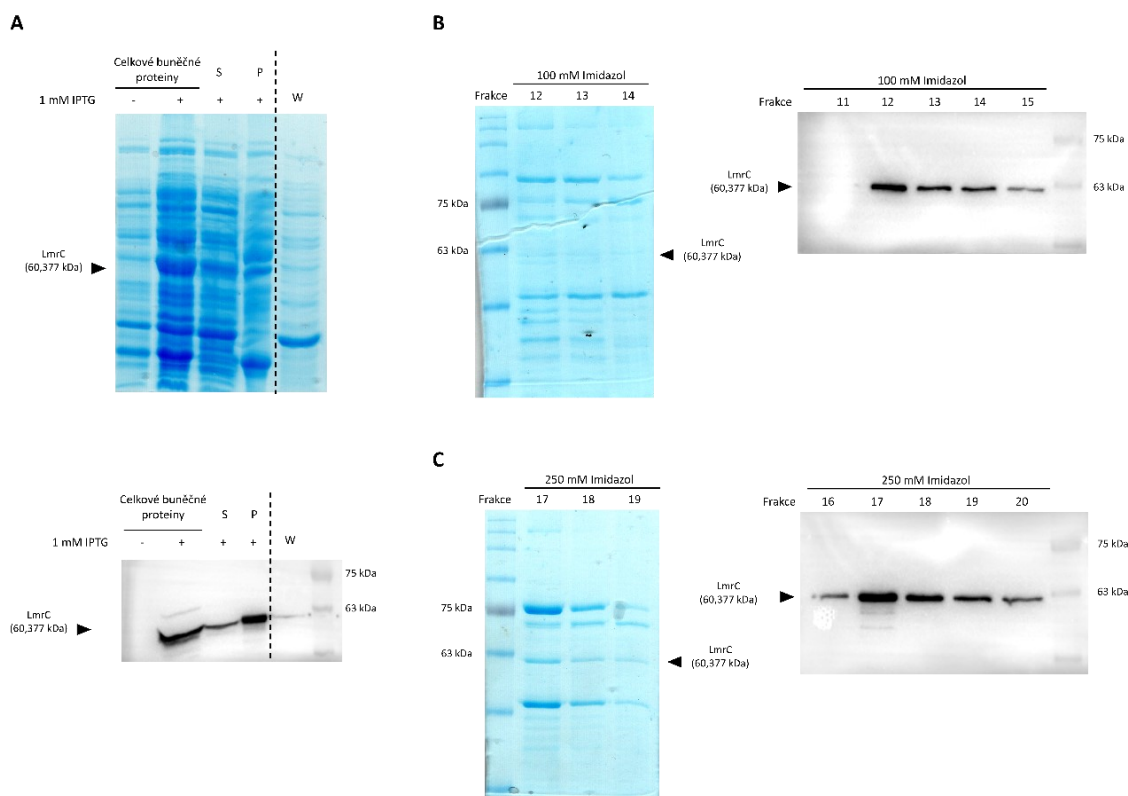
Obrázek 56: Stanovení stability proteinu LmrC. Analýza stability proteinu LmrC po jeho nadprodukcí v kmenu *E. coli* BL21 GroEL/ES pomocí (A) SDS-PAGE a (B) western blot. WL – celkový buněčný lyzát, S – supernatant získaný centrifugací (15 min, 13000 RPM (w/o rotor (Eppendorf)), 4 °C), P – pelet vzniklý po centrifugaci (15 min, 13000 RPM (w/o rotor (Eppendorf)), 4 °C).

Lyzační pufr vycházel z pufru používaného pro běžnou imunodetekci proteinu LmrC (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,5). Tento pufr byl také použit pro optimalizaci podmínek indukce. Pro použití v rámci purifikace byl tento pufr optimalizován (50mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM imidazol, pH 8,5). Pro zlepšení rozpustnosti proteinu LmrC byly následně otestovány různé suplementy. Testovanými látkami byl 1% Triton-X100, 1% Tween-20, 1% MOPS, 1 mM DTT, 10% glycerol a 10% sacharóza. Zlepšení stability proteinu bylo detekováno pomocí SDS analýzy a imunoblotu v přítomnosti 1% Tritonu-X100 a 1% Tweenu-20, i když poměr stále nebyl ideální (Obr. 57). Výsledný lyzační pufr měl složení: 50mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM imidazol, 1% Triton-X100, 1 mM Pefabloc® SC (inhibitor proteas – PEFA, Roche), pH 8,5.



Obrázek 57: Optimalizace složení lyzačního pufru. Vliv různých komponent (10% sacharózy, 10% glycerolu, 1% Tritonu-X100, 1% Tweenu-20, 1% MOPS a 1 mM DTT) na stabilitu LmrC. Analýza proběhla pomocí SDS-PAGE a imunodetekce proteinu v buněčných frakcích. S – supernatant, P – pelet.

Purifikace proteinu LmrC byla provedena manuálně pomocí metaloafinitní chromatografie na koloně HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences) o objemu 1 ml. Protein byl eluován krokovým zvýšením koncentrace imidazolu (1mM, 10mM, 50mM, 100mM a 250mM). Na základě SDS analýzy a imunoblotu získaných frakcí byla ideální eluce proteinu při 250 mM imidazolu, kdy došlo k nejsilnějšímu uvolnění proteinu LmrC z kolony a získání čistšího vzorku než při koncentraci 100 mM imidazolu (Obr. 58). Čistota proteinu byla ovšem nízká. Purifikační proces je uveden v Kap. 4.2.6.4.



Obrázek 58: Optimalizace purifikace proteinu LmrC.(A) Analýza nadprodukce proteinu LmrC v kmeni *E. coli* BL21 GroEL/ES a míry jeho precipitace. (B) Analýza frakcí získaných při metaloafinitní chromatografii pomocí SDS-PAGE a imunoblotu. Frakce byly získány v elučním kroku purifikace při eluci puřem s koncentrací 100 mM imidazolem z kolony HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences; CV = 1 ml). (C) Analýza frakcí získaných při metaloafinitní chromatografii pomocí SDS-PAGE a imunoblotu. Frakce byly získány v elučním kroku purifikace při eluci puřem s koncentrací 250 mM imidazolem z kolony HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences; CV = 1 ml).

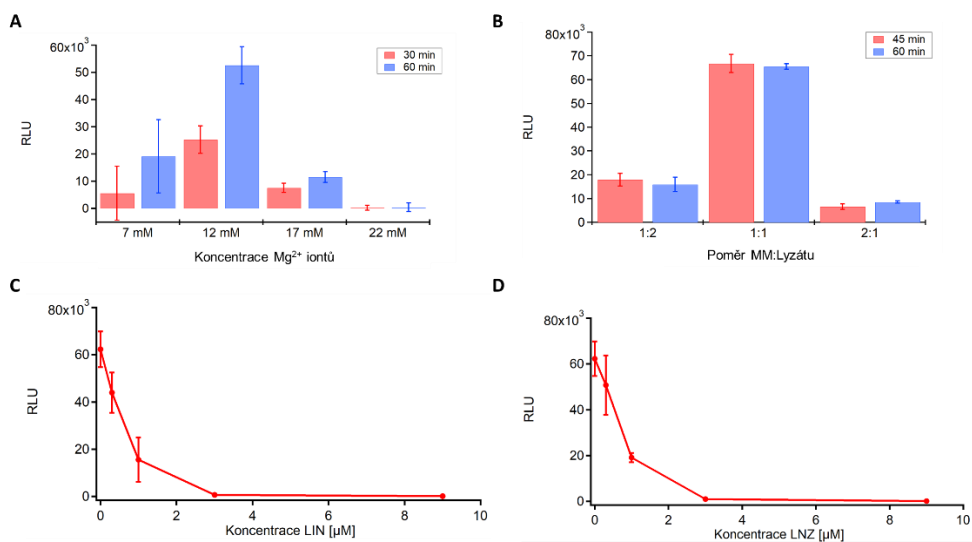
Celá optimalizace purifikace proteinu LmrC byla komplikována jeho značnou nestabilitou. To se odrazilo i v nízké výtěžnosti purifikace. Celková čistota získaného proteinu nebyla po jednokrokové purifikaci dostatečná a měl by být přidán další purifikační krok, který by ovšem vedl k další ztrátě proteinu. Výsledný purifikační protokol pro protein LmrC byl následně získán MSc. Durgou Mahor Ph.D., která převzala tuto část projektu. Jako stěžejní změna v purifikačním protokolu byla zvýšená teplota během purifikačních kroků.

5.9.2. *In vitro* transkripčně-translační systém

V rámci pracovní stáže ve vědecké skupině MSc. Vasilija Hauryliuka Ph.D. (Umeå University, Švédské království) realizované v programu Erasmus jsem byla zaškolená do metodiky *in vitro* transkripčně-translačního systému. Tato metoda využívá bezbuněčný systém založený na buněčných lyzátech optimalizovaných pro *in vitro* syntézu proteinů (267). Díky tomu je tento systém vhodným nástrojem ke

zkoumání translační regulace a lze využít i pro studium ARE ABCF proteinů. Zaškolení do této metody provedla MSc. Marje Kasari Ph.D.

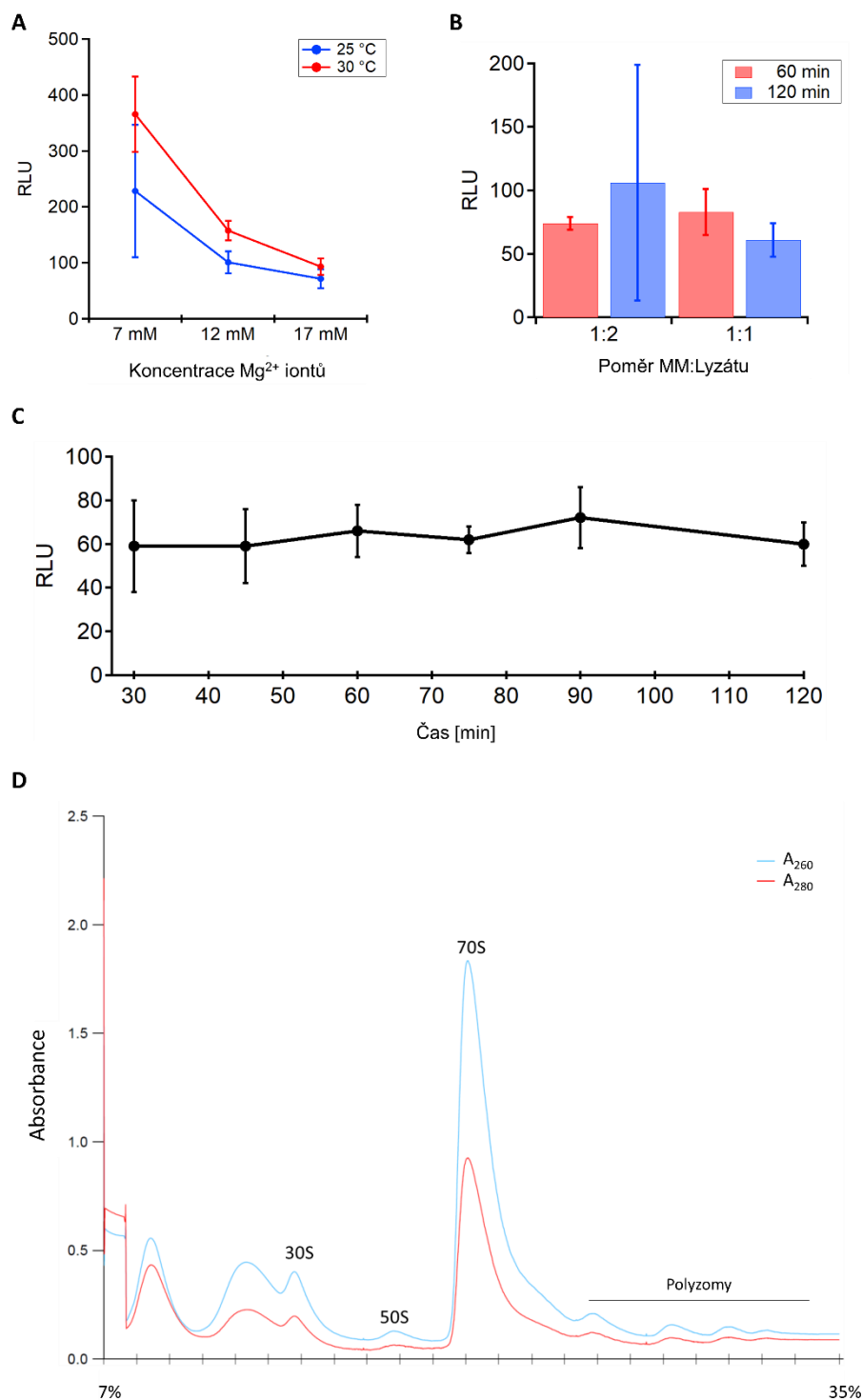
Protokol pro *in vitro* transkripčně-translační systém (Kap. 4.2.13.) vyžaduje optimalizaci klíčových složek systému. V rámci optimalizace podmínek pro bakterii *Enterococcus faecalis* OG1RF bylo zjištěno, že ideální poměr mezi odsoleným translačním lyzátem testovaného kmene a reakční směsí je 1:1 (Obr. 59B). Buněčný lyzát dosahoval nejvyšší aktivity při koncentraci Mg^{2+} iontů 12 mM, reakční teplotě 37 °C a délce reakce 45-60 minut (Obr. 59A, B). V průběhu zaškolení byly také ověřeny inhibiční vlastnosti antibiotik LIN (Obr. 59C) a LNZ (Obr. 59D) na translační proces.



Obrázek 59: Optimalizace *in vitro* translačního systému pro bezbuněčný lyzát z kmene *Enterococcus faecalis* OG1RF. (A) Optimalizace koncentrace Mg^{2+} iontů a (B) poměru reakční směsi k translačnímu lyzátu pro maximální účinnost translace. Stanovení inhibiční koncentrace (C) LIN a (D) LNZ v *in vitro* translační reakci. Účinnost translace byla stanovena měřením luminiscence.

Následně probíhala optimalizace podmínek pro využití *in vitro* transkripčně-translačního systému pro bakteriální kmen *S. lincolnensis* (Obr. 60A, B). Vzhledem k tomu, že optimální teplota růstu tohoto kmene je kolem 30 °C, byly testovány dvě reakční teploty – 25 °C a 30 °C. Metoda využívá plazmid pIVEX2.3MCs FFluc, který kóduje gen pro luciferasu. Transkripce je řízena rekombinantní T7 RNA polymerasou přidanou do lyzátu. Účinnost syntézy proteinu je následně kvantifikována měřením luminiscence translatované luciferázy. V testovaných podmínkách nebyla pro translační lyzát *S. lincolnensis* detekována výrazná luminiscence. Účinnost syntézy proteinu nebyla zlepšena ani prodloužením doby reakce (Obr. 60C). Jedním z limitujících faktorů byla nižší koncentrace získaného lyzátu. Analýza ribozomálního profilu však potvrdila, že translační lyzát byl stále enzymaticky aktivní, což je nezbytné pro reakci (Obr. 60D). Rod *Streptomyces* je známý vysokým obsahem GC párů v genomu, což mohlo negativně ovlivnit účinnost použitého systému, který nebyl pro tento typ organismů optimalizován.

Na základě získaných dat lze konstatovat, že tento *in vitro* transkripčně-translační systém není vhodný pro kmen *S. lincolnensis*.



Obrázek 60: Optimalizace *in vitro* translačního systému pro bezbuněčný lyzát z kmene *S. lincolnensis*. (A) Optimalizace koncentrace Mg²⁺ iontů, (B) poměru reakční směsi k translačnímu lyzátu a (C) délky reakce pro maximální účinnost translace. (D) Analýza ribozomálního profilu v sacharóze gradientu (7%-35%) bezbuněčného lyzátu kmene *S. lincolnensis*. Účinnost translace byla stanovena měřením luminiscence.

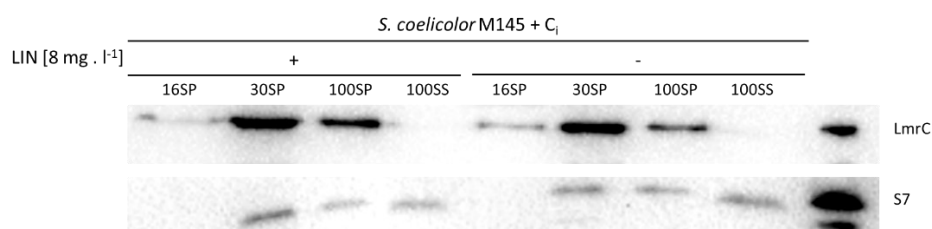
5.10. Buněčná lokalizace proteinu LmrC a jeho interakce s ribozomy

Ačkoliv bakteriální buňka postrádá vnitřní membránové členění, je prostorově organizována, což je nezbytné pro její správnou funkci. Pro pochopení role proteinů je důležitá nejen jejich lokalizace v buňce,

ale také jejich interagující partneri. V této části dizertační práce jsem se zaměřila na potvrzení interakce proteinu LmrC s ribozomy a s tím i spjatou buněčnou lokalizací. K dosažení tohoto cíle byly použity tři nezávislé přístupy – ribozomální profil, buněčná frakcionace pomocí centrifugace a fluorescenční mikroskopie. Průlom ve studiu ARE ABCF proteinů nastal v roce 2016, kdy byla *in vitro* potvrzena jejich funkce na ribozomu (18). Od té doby bylo publikováno několik struktur těchto proteinů v interakci s ribozomy (184–186, 202, 213, 215, 216).

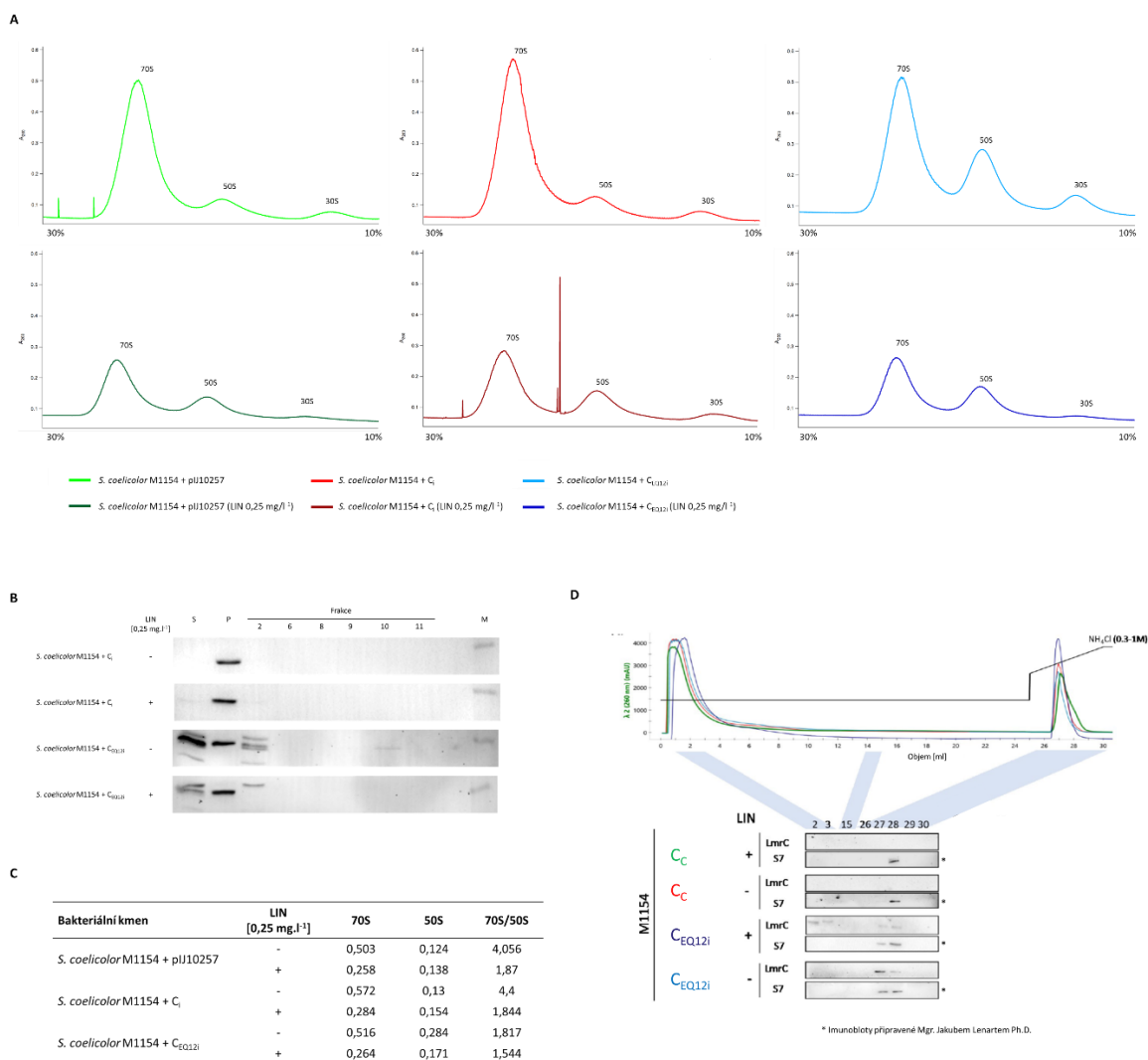
Buněčná frakcionace pomocí centrifugace využívá postupnou centrifugaci k oddělení frakcí obsahující různé buněčné složky (Kap. 4.2.15.). V rámci mé diplomové práce probíhaly první pokusy o frakcionaci buněk pomocí centrifugace, ve kterých byl detekován protein LmrC značený histidinovou kotvou. Na tuto práci navázala optimalizace této metody pro neznačený protein LmrC. Testovanými kmeny byly *S. lincolnensis* + C_C, *S. coelicolor* M1154 + C_i, *S. coelicolor* M1154 + C_{EQ12i}, *S. coelicolor* M145 + C_i, *S. coelicolor* M145 + C_{EQ12i}. Tyto kmeny byly kultivovány v podmínkách bez přidaného antibiotika, v subinhibiční koncentraci LIN (0,25 mg.l⁻¹ pro *S. coelicolor* M1154, 8 mg.l⁻¹ *S. coelicolor* M145) a v přítomnosti 1 mM ATP. Vzniklé sedimenty a supernatanty byly analyzovány pomocí imunoblotu za využití specifické protilátky proti LmrC a ribozomálnímu proteinu S7 malé 30S ribozomální podjednotky (Kap. 4.2.6.3.). Protokol pro detekci ribozomů byl převzat od Mgr. Jakuba Lenarta Ph.D., který rovněž provedl detekci ribozomů v prvních experimentech.

Maximální signál pro protein LmrC byl detekován v peletu získaném po centrifugaci při 30 000 g (označen jako 30SP). Na Obr. 61 je ukázán reprezentativní imunoblot z buněčné frakcionace pro kmen *S. coelicolor* M145. Experimenty však byly komplikovány značnou nereprodukovatelností pravděpodobně způsobenou, jako v případě purifikace proteinu LmrC, postupnou precipitací proteinu. Díky problémům s precipitací a nereprodukovatelností dat bylo obtížné považovat získané výsledky za spolehlivé.



Obrázek 61: Analýza kolokalizace proteinu LmrC s ribozomy v kmeni *S. coelicolor* M145. Sledování distribuce proteinu LmrC a ribozomů v buněčných frakcích bylo provedeno pomocí imunoblotu. Protein LmrC byl detekován pomocí specifické protilátky a přítomnost ribozomů byla sledována detekcí proteinu S7 malé ribozomální podjednotky pomocí anti-S7 protilátky. Subcelulární frakce byly připraveny postupnou trojstupňovou centrifugací buněčného lyzátu (Obr. 25): první centrifugace (16 000 g, 10 min, 4 °C), druhá centrifugace (30 000 g, 30 min, 4 °C) a třetí centrifugace (100 000 g, 1 hod, 4 °C). 16SS–supernatant po první centrifugaci, 16SP–pelet po první centrifugaci, 30SS–supernatant po druhé centrifugaci, 30SP–pelet po druhé centrifugaci, 100SS–supernatant po třetí centrifugaci, 100SP–pelet po třetí centrifugaci. Množství naneseného vzorku bylo normalizováno poměrově k výchozímu materiálu.

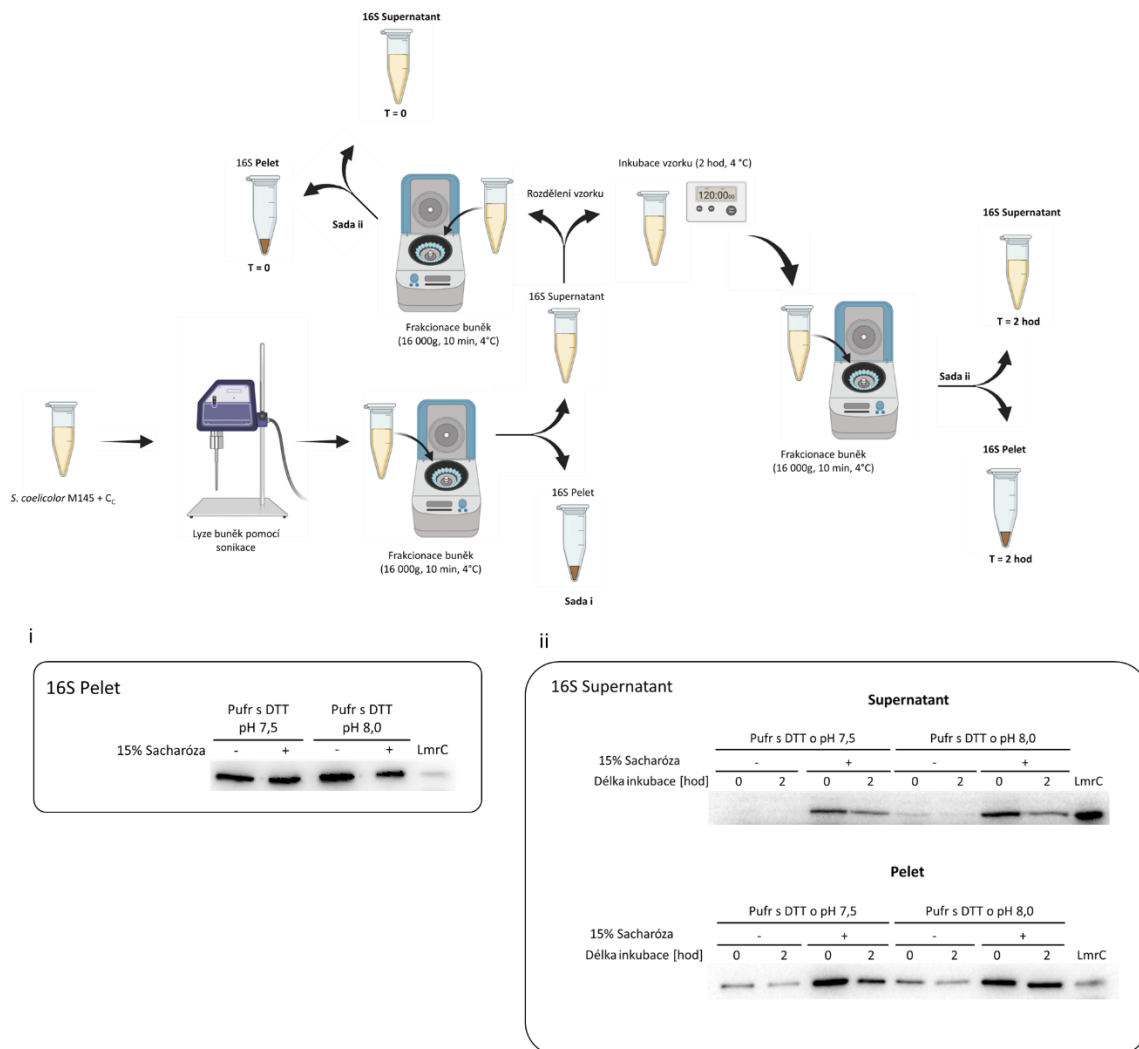
Pro potvrzení interakce proteinu LmrC a jeho dvojité EQ mutanty s ribozomy byla použita analýza ribozomálního profilu v sacharózovém gradientu (10%–30%) následována detekcí proteinu v získaných frakcích (Obr. 62). Experimenty byly provedeny v přítomnosti subinhibiční koncentrace LIN, 1 mM ATP, a v podmínkách bez antibiotika. Problémem této analýzy byla tendence proteinu LmrC k precipitaci, která komplikovala jeho detekci v sacharózovém gradientu (Obr. 62B). Vyšší nanáška následně vedla k nespecifickému signálu, který nebyl asociován s ribozom a jeho podjednotkami.



Obrázek 62: Analýza distribuce proteinu LmrC v ribozomálních frakcích. (A) Ribozomální profil kmenů *S. coelicolor* M1154 + pIJ10257, *S. coelicolor* M1154 + C_i, *S. coelicolor* M1154 + C_{EQ12i} v sacharozovém gradientu (10%–30%). Analýza byla provedena v přítomnosti a absenci LIN (0,25 mg.l⁻¹). (B) Jednotlivé frakce získané ze sacharozového gradientu byly analyzovány pomocí imunoblotu s použitím specifické protilátky proti proteinu LmrC. Pro stanovení míry precipitace proteinu LmrC byl analyzován také výchozí supernatant (S) použitý pro gradient a nerozpustná frakce (P). (C) Porovnání intenzit pík odpovídajících 70S ribozom a velkou 50S ribozomální podjednotku z ribozomálního profilu (část A). (D) Detekce proteinu LmrC ve vzorku získaném kopurifikací ribozomů a proteinu LmrC (kopurifikace byla provedena Mgr. Jakubem Lenartem Ph.D. a Mgr. Janou Veselou. Detekce ribozomů pak Mgr. Jakubem Lenartem Ph.D.).

Analýza ribozomálních profilů v přítomnosti a absenci LIN odhalila změny v poměru pík odpovídajících 70S ribozomu a velkou 50S ribozomální podjednotce (Obr. 62A, C). V přítomnosti subinhibiční koncentrace LIN (8 mg.l⁻¹) u kmenů *S. coelicolor* M145 + pIJ10257 a *S. coelicolor* + C_{EQ12i} došlo k snížení translační aktivity, což se projevilo absencí polyzomů v ribozomálním profilu získaném v sacharózovém 7%–35% gradientu (data byla získána během pracovní sáže v rámci programu Erasmus). Aktivita translace zůstala nezměněna v přítomnosti funkčního proteinu LmrC. Variabilita ribozomálního profilu je spojena s vnitřní rezistencí kmene *S. coelicolor* M145 k LIN způsobenou WblC regulonem a s dynamickou reakcí kmene na množství LIN (274–276). Při vzájemné kopurifikaci ribozomů s LmrC, která byla provedena Mgr. Jakubem Lenartem, Ph.D. a Mgr. Janou Veselou, byla detekována přítomnost proteinu LmrC ve frakcích odpovídající ribozomům (Obr. 62D).

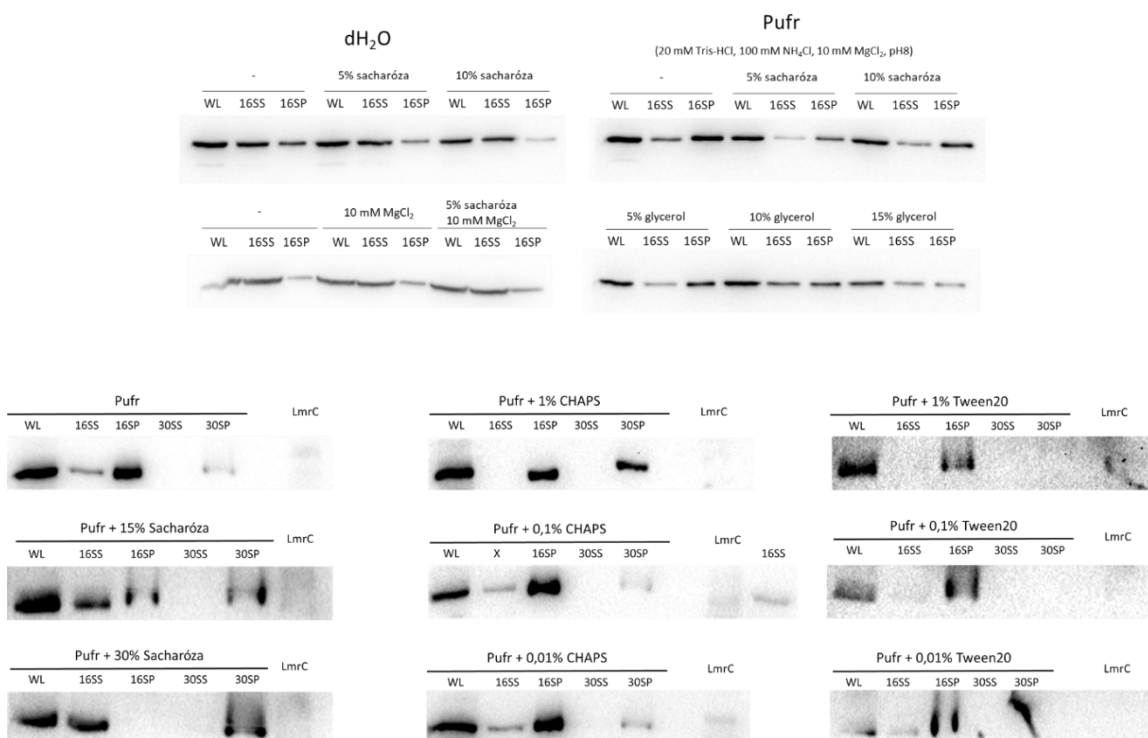
Podobně jako při purifikaci proteinu LmrC, byla i u výše popsanych analýz hlavním problémem stabilita proteinu, která negativně ovlivnila reprodukovatelnost výsledků. Prvním krokem optimalizace experimentálních podmínek bylo testování vlivu inkubace na ledu na stabilitu proteinu. Schématické znázornění experimentu je uvedeno na Obr. 63.



Obrázek 63: Časová analýza stability proteinu LmrC. Sledování stability proteinu LmrC v pufru pro ribozomální profil pomocí imunoblotu v buněčných frakcích odebraných ihned po lýze buněk a po 2hodinové inkubaci na ledu. Vzorky byly centrifugovány (16 000 g, 10 min, 4 °C) pro rozdělení rozpustné (16SS) a nerozpustné frakce (16SP).

Protein LmrC precipitoval postupně, jak potvrdila jeho detekce v peletech po sobě jdoucích centrifugacích. Testované hodnoty pH přitom neprokázaly významný vliv na precipitaci Obr. 63). Srovnání stability proteinu LmrC ve vodném prostředí a v pufru používaném na ribozomální profil ukázalo, že je protein stabilnější v dH₂O (Obr. 64). Přítomnost MgCl₂ negativně neovlivnila stabilitu proteinu v roztoku. Detergenty CHAPS a Tween-20 neměly vliv na stabilitu. Naopak glycerol ji mírně zlepšoval. Chování proteinu v přítomnosti sacharózy bylo napříč všemi testováními nestabilní (Obr. 38; Obr. 64).

V průběhu optimalizace se nezdařilo určit klíčovou komponentu, která by výrazně zlepšila stabilitu proteinu. Různé chování proteinu v přítomnosti sacharózy naznačuje, že klíčová podmínka nebyla v provedených testech objevena. Na základě purifikačního protokolu lze předpokládat, že by touto podmínkou mohla být teplota.

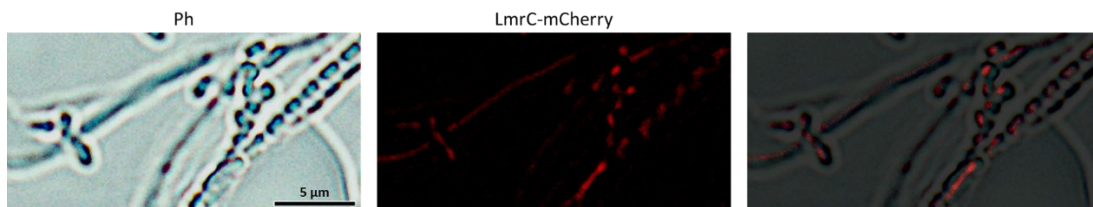


Obrázek 64: Optimalizace složení pufru pro ribozomální profil. Vliv různých komponent (sacharózy, glycerolu, CHAPS a Tweenu-20) na stabilitu proteinu LmrC. Analýza proběhla pomocí imunodetekce v buněčných frakcích vzniklých po dvojitě postupné centrifugaci: první centrifugace (16 000 g, 10 min, 4 °C) a druhá centrifugace (30 000 g, 30 min, 4 °C). 16SS-supernatantů po první centrifugaci, 16SP-pelet po první centrifugaci, 30SS-supernatantů po druhé centrifugaci a 30SP-pelet po druhé centrifugaci.

Pro *in vivo* sledování proteinu LmrC v buňce byl tento protein translačně fúzován s červeným fluorescenčním proteinem mCherry. Vektor pro konstitutivní expresi genu *lmrC-mcherry* byl odvozen z plazmidu pLV018. Příprava byla provedena Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou Ph.D. Připravený vektor (dále značen C-mCherry_C) byl následně mezidruhovou konjugací vložen do kmenů *S. coelicolor* M1154 (*S. coelicolor* M1154 + C-mCherry_C (BGD3625)) a ΔC (ΔC + C-mCherry_C (BN3637)).

Fluorescenčně značená varianta proteinu LmrC si zachovala svoji aktivitu s minimálním vlivem na schopnost udílet rezistenci vůči LIN a CLI (Obr. 65). Pro ověření funkčnosti fúze bylo pomocí fluorescenční mikroskopie potvrzeno, že během produkce nedochází k tvorbě agregátů proteinu (Obr. 65). Pro přesnější určení buněčné lokalizace je nutné použít pokročilejší zobrazovací metody, např. superrezoluční fluorescenční mikroskopii.

Bakteriální kmen	MIC [mg.l ⁻¹]	
	LIN	CLI
M1154 + pIJ10257	2 – 4	0,5 - 1
M1154 + C _C	32 – 64	16 – 32
M1154 + C-mCherry _C	16	8



Obrázek 65: Ověření funkčnosti translační fúze proteinu LmrC s fluorescenčním proteinem mCherry. Funkčnost fúzního proteinu LmrC-mCherry byla ověřena stanovením hodnot MIC pro LIN a CLI v citlivém kmeni *S. coelicolor* M1154. Správná exprese a složení fluorescenční části fúzního proteinu byly potvrzeny pomocí fluorescenční mikroskopie.

6. Diskuze

ABCF proteiny byly tradičně rozdělovány na dvě funkčně odlišné skupiny - proteiny udílející rezistenci k antibiotikům inhibujícím translaci prostřednictvím vazby na velkou 50S ribozomální podjednotku a proteiny s regulační funkcí s přesahem do primárního metabolismu (278). Výsledky prezentované v rámci této dizertační práce toto striktní dělení zpochybňují a poskytují nový komplexnější pohled na rezistenční proteiny ARE5 podskupiny ABCF proteinů a potažmo na celou skupinu ABCF proteinů.

I když je ARE5 ABCF protein LmrC kódován v BGC pro syntézu LIN, udílí jen nízkou úroveň rezistence k LIN a CLI a k celkové vysoké rezistenci kmene *S. lincolnensis* přispívá spíše okrajově (Obr. 28). Hlavními proteiny rezistence zodpovědnými za vysokou úroveň rezistence *S. lincolnensis* k linkosamidům jsou MFS transportér LmrA a 23S rRNA monometyltransferáza LmrB. Toto zjištění je v rozporu s předpokladem, že rezistenční proteiny kódované v BGC primárně zajišťují ochranu producenta před vlastním produktem. Producenti antibiotik často využívají více rezistenčních mechanismů současně, které jsou vzájemně sladěny tak, aby zajišťovaly jejich obranu v různých růstových fázích a při různých koncentracích antibiotika, aniž by zásadně snižovaly konkurenceschopnost a životaschopnost bakterií (12).

Na rozdíl od LmrC je přítomnost proteinu TiaA zodpovědná za vysokou rezistenci kmene *S. coelicolor* M145 vůči pleuromutilinovým antibiotikům (Obr. 42). Fylogenetická analýza spojená se stanovením MIC navíc ukázala, že se rezistence k pleuromutilinům u rodu *Streptomyces* vyvinula minimálně dvakrát nezávisle na sobě (Obr. 43). Pravděpodobným důvodem je selekční tlak způsobený jejich koexistencí s producenty těchto látek. Druhý ARE5 protein tohoto organismu, SCO6720, udílí pouze nízkou úroveň rezistence k LS_AP antibiotikům. Podobně nízkou schopnost udílet rezistenci sdílí i druhý ARE5 protein SLINC7152 z *S. lincolnensis*. Tato variabilita v míře udílené rezistence spolu s rozdílnou lokalizací genů (asociovanou s BCG i mimo ně) naznačuje jejich komplexnější roli v bakteriální buňce.

Společným rysem studovaných ARE5 proteinů je specifita jejich indukce, která se překrývá s jejich rezistenčním profilem. Tento jev byl pozorován i u jiných ARE proteinů, například u variant proteinu VgaA (230). Za tuto selektivitu je zodpovědný mechanismus ribozomem zprostředkované atenuace využívající uORF, která se podílí na regulaci exprese. Mechanismus využívá schopnost antibiotik zastavit translaci při čtení zmíněného uORF a vytvoření tzv. SRC komplexu (223). Samotná délka a aminokyselinové složení tohoto krátkého čtecího rámce pomáhá v rozlišení indukujících antibiotik. Tento mechanismus je běžný pro regulaci ABCF proteinu u zástupců bakteriálního kmene *Firmicutes* (nově *Bacillota*) a zajišťuje jejich produkci jen v přítomnosti specifických antibiotik (184, 198, 201, 212, 230, 231). Pro proteiny MsrD a VmlR byla dokonce popsána víceúrovňová kontrola, která zajišťuje, aby k jejich produkci v absenci antibiotik nedocházelo, což naznačuje jejich potenciální negativní vliv na bakterií v absenci antibiotik (212, 231).

U *S. lincolnensis* byl v 5'UTR oblasti před genem *lmrC* objeven uORF kódující peptid o délce 16 aminokyselin (MTVSGDAPLRCLTPLW), který reguluje expresi prostřednictvím atenuace zprostředkované ribozomem (Příloha 1; (172)). Přítomnost uORF před geny pro ARE5 proteiny potvrdila i *in silico* analýza podskupin ARE5 proteinů, které byly detekovány pomocí fylogenetické analýzy (Obr. 46). Většina predikovaných uORF kóduje peptidy o délce 3 aminokyselin, což odpovídá antibiotické specifitě (LS_AP) této proteinové rodiny (Tab. 34). Delší leader peptidy se specifickými sekvencemi jsou spíše spojovány s makrolidovými antibiotiky, které se váží do výstupního kanálu ribozomu (54, 68, 226). Predikované leader

peptidy pro ARE5 proteiny z *Streptomyces coelicolor* M145 (peptid TiaAL (MVGDDDISG) pro TiaA a peptid SCO6720L1 (M*LV) pro SCO6720) byly následně i experimentálně potvrzeny (Příloha 2; (268)). Tento mechanismus regulace exprese ABCF proteinů je tedy rozšířen i u zástupců *Actinobacteria*. Další leader peptidy, jako LmrCL a TiaAL, mohou mít své funkční opodstatnění. Délka LmrCL může souviset s mechanismem regulace díky částečnému překryvu uORF s terminátorovou vlásenkou (Příloha 1; (172)).

Tabulka 34: Porovnání aminokyselinových sekvencí leader peptidů pro ARE ABCF proteiny.

Regulovaný protein	Aminokyselinová sekvence leader peptidu	Délka
VgaL	MKF	3
CplR	MR(I/M)	3
VgaA _{LC}	MIN	3
VmlR	MIN	3
TiaA	MVGDDDISG	8
Sco6720	MLV	3
LmrC	MTVSGDAPLRCLTPLW	16
LsaA*	MAGN	4
VmlR2*	MK(L/Q)	3

Pozn. * Predikovaný LP

Přestože protein LmrC přispívá k celkové vysoké rezistenci producenta LIN pouze částečně, jeho klíčová úloha v rámci BGC spočívá v regulaci produkce tohoto antibiotika (Obr. 41). Protein LmrC tedy představuje první experimentálně potvrzený případ ARE ABCF proteinu s duální, rezistenčně-regulační funkcí. V nově objevené regulační kaskádě funguje LmrC jako translační faktor přenášející signál o přítomnosti CLI do aktivace exprese CSR regulátoru *lmbU* (165, 166). Ten následně řídí biosyntézu LIN prostřednictvím aktivace biosyntetických genů. Exprese genu *lmrC* je precizně řízena v reakci na přítomnost LS_AP antibiotik (LIN, CLI, TIA, PIIA; Obr. 40). Tato paleta indukujících antibiotik se překrývají i s jeho rezistenčním fenotypem.

Zpětnovazebná kontrola této regulační kaskády je spojená se snížením množství antibiotiky inhibovaných ribozomů v buňce. Konkrétně MFS transportér LmrA tlumí produkci LmrC tím, že snižuje intracelulární koncentraci LIN (Obr. 40). Pomocí proteomické analýzy jsme potvrdili jeho přítomnost po přidání CLI do média (Příloha 1; (172)). Exprese *lmrA* je navíc pozitivně regulována GlnR, globálním regulátorem metabolismu dusíku. Tato spojitost je pravděpodobně zapříčiněna tím, že přítomnost nitrátu zvyšuje produkci LIN (279). Do regulace produkce LmrC je zapojen i rezistenční protein LmrB a to přes svoji metylační aktivitu bránící vazbě antibiotik na ribozom, Toto zapojení bylo ověřeno experimenty, které porovnávaly situaci produkce LmrC v kmeni s metylovanými ($\Delta B + B_c$) a nemetylovanými ribozomy (ΔB). V případě metylovaných ribozomů docházelo k produkci LmrC jen v reakci na přítomnost PIIA, který si na rozdíl od LIN a CLI zachoval schopnost vazby k ribozomu. Tím jsme demonstrovali i to, že produkce LmrC není spuštěna pouhou přítomností antibiotik v prostředí, nýbrž je nezbytná jejich vazba na ribozom (Obr. 40). Vzhledem k tomu, že k indukcii produkce LmrC dochází v přítomnosti LS_AP antibiotik sdílících podobné

vazebné místo na ribozomu, lze předpokládat, že produkce LIN bude reagovat prostřednictvím LmrC i na přítomnost S_A a pleuromutilinů.

Gen *lmrB* je lokalizován v operonu s genem *lmbU*, což dále potvrzuje jeho roli ve zpětnovazebné regulaci této dráhy. Navíc jsou geny *lmrC* a *lmbU* pod kontrolou alternativního sigma faktoru $\sigma^{L_{st}}$, pro který byla potvrzena role v regulaci produkce LIN u *S. lincolnensis* (173). Tento alternativní sigma faktor je u *S. coelicolor* spojován se stresovou odpovědí na osmotický stres a také morfologickou diferenciací (280). Popsaná regulační kaskáda (Obr. 41), ve které je zapojen protein LmrC, ukazuje antibiotika jako signální molekuly, které dynamicky vyladují reakci bakterií. Tím je zajištěna synchronizace produkce LIN v bakteriální populaci. Zároveň se jedná o vůbec první prokázанный případ, kdy ARE ABCF protein má duální, regulačně-rezistenční funkci. ARE5 proteiny tak mohou prostřednictvím své rezistenční funkce fungovat jako senzory přítomnosti specifických antibiotik a regulátory genové exprese.

V přirozeném prostředí jsou zástupci rodu *Streptomyces* vystaveny nejrozličnějším typům stresu, se kterými se musí skrze změnu genové exprese vyrovnávat. Zároveň dochází k různým mezidruhovým interakcím. Bakterie si proto vyvinuly širokou škálu mechanismů nejen k boji s konkurenty, ale také k vzájemné komunikaci vedoucí ke koordinovanému a dynamickému chování v rámci populace (99, 100). Jedním z příkladů může být výše zmíněná produkce LIN a její regulace skrze ARE5 protein LmrC. V přírodních nikách přichází zástupci kmene *Actinobacteria* často do přímého kontaktu s různými druhy hub, které jsou dalšími významnými producenty sekundárních metabolitů (28). Pleuromutiliny, ke kterým udílí rezistenci ARE5 protein TiaA, je jedním z těchto produktů. Konkrétně je produkován houbou *Clitopilus passeckerianus* z oddělení *Basidiomycota* a jí příbuznými druhy (281). Rezistence TiaA tak umožňuje bakterii *S. coelicolor* přežít v blízkosti pleuromutilinových producentů, jak bylo demonstrováno při jejich společné kultivaci na pevné půdě (Obr. 47). Krom duální role proteinu LmrC byl pozorován vliv ARE5 proteinů TiaA a SCO6720 z *S. coelicolor* na produkci ACT a zapojení TiaA do mezidruhového soužití s producenty pleuromutilinu i přesto, že jsou geny pro tyto proteiny lokalizovány mimo BGC.

Koexistence různých druhů má významný vliv na metabolický profil mikroorganismů. V laboratorních podmínkách se společná kultivace snaží napodobit tyto složité ekologické interakce, což vede k produkci látek, které nemusí být při běžné kultivaci produkovány (282, 283). V závislosti na kultivačních podmínkách byla zaznamenána změna produkčního profilu *C. passeckerianus* a *S. coelicolor* (Obr. 47; Obr. 48; Obr. 49). Zároveň jsme pozorovali vzájemné mezidruhové ovlivnění vyústěné ve změně růstu testovaných kmenů (Obr. 49). *S. coelicolor* dosahovala silnějšího růstu dál od místa obsazeného kmenem *C. passeckerianus* CCBAS739. Při kultivaci kmenů *S. caelestis* a *S. ambofaciens* v blízkosti kmene *C. passeckerianus* CCBAS738 byla sledována preference této vyšší houby rozšiřovat svůj růst do volného prostoru. Naopak testované kmeny hub měly tendenci přerůst místa obsazená kmenem *S. coelicolor*. Mechanismus, který stojí za touto mezidruhovou komunikací nebyl naší vědeckou skupinou objasněn.

Při společných kultivacích *S. coelicolor* s kmeny *Clitopilus* byl také pozorován dřívější nástup produkce ACT (Obr. 47). I přes to, že přítomnost kmene *C. passeckerianus* indukuje produkci ACT u *S. coelicolor* M145, není k němu tato houba citlivá (Obr. 48). ACT inhibuje růst gram pozitivních bakterií jako jsou *Streptomyces hygroscopicus* nebo *Streptomyces albus*, naopak není aktivní proti *Mycobacterium smegmatis* a kvasinkám jako jsou *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Candida albicans* (146). Tato druhově specifická antibiotická aktivita napovídá, že v případě jeho zapojení do ochrany producenta bude poskytovat selekční

výhodu proti příbuzným bakteriálním kmenům. Reakce kmene *S. coelicolor* prostřednictvím produkce ACT byla již dříve popsána při jeho interakci s bakterií *Myxococcus xanthus*, kde dochází ke stimulaci tvorby vzdušného mycelia a nadprodukce ACT v reakci na nedostatek železa (284, 285). Produkce ACT tedy představuje komplexní odpověď *S. coelicolor* na přítomnost konkurenčních mikroorganismů a na různé typy stresu. V kontextu ARE5 ABCF proteinů je zajímavý dříve popsán rychlejší nástup ACT produkce indukovaný některými antibiotiky inhibujícími translaci. V přítomnosti CLI dochází k dřívější produkci ACT prostřednictvím zvýšení exprese jeho CSR regulátoru *actII-orf4* (112). Podobný efekt jsme detekovali také pro pleuromutiliny (TIA a pleuromutilin; Obr. 47; Obr. 51).

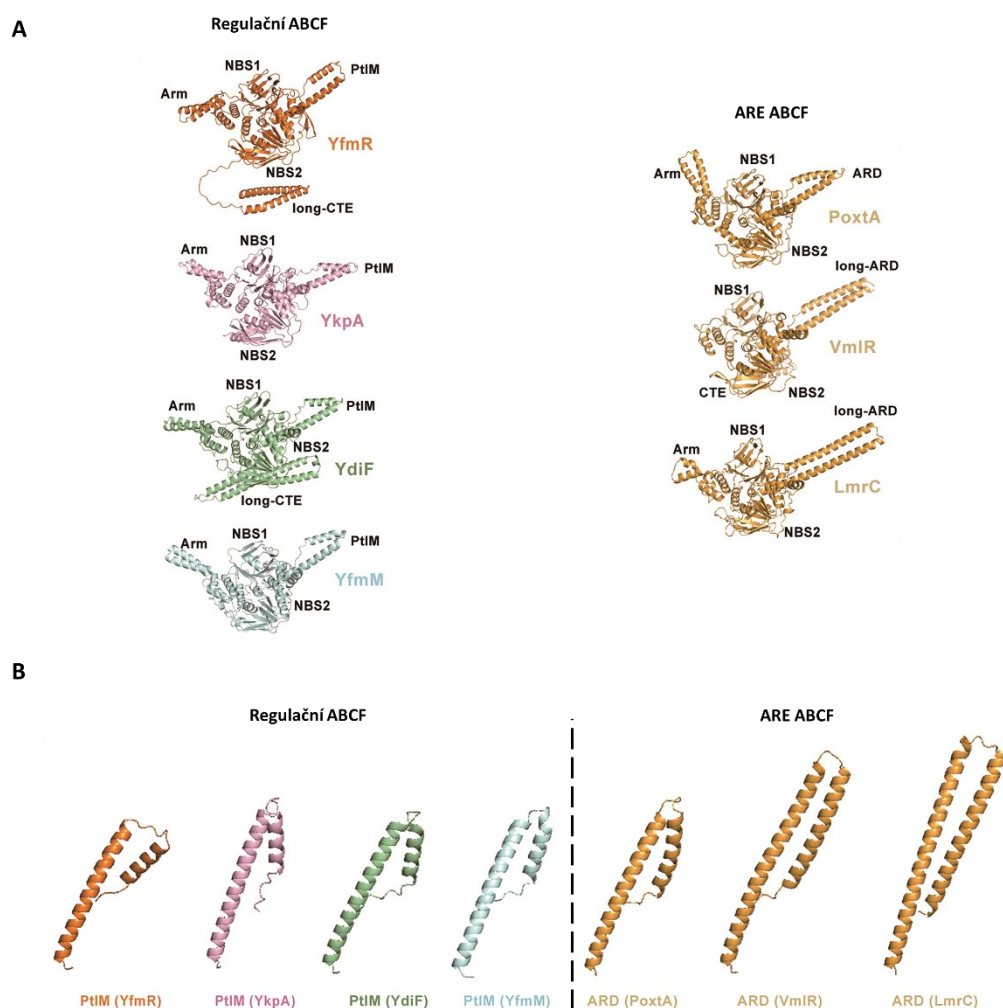
Tato antibiotiky indukovaná produkce ACT je ovlivněna funkcí rezistenčních ARE5 proteinů (Obr. 51; Obr. 53; Obr. 54). Dle citlivosti kmene k těmto antibiotikům dochází k modulaci produkce ACT. Zdá se, že rezistenční funkce má vliv na signál spouštějící produkci. Poněvadž je tento efekt viditelný i pro LmrB, není specifický pro ABCF proteiny. Zároveň to napovídá, že v signální dráze bude hrát roli vazba antibiotik na ribozom. Poněvadž nadprodukce ABCF proteinů se schopností udílet nízkou úroveň rezistence (SCO6720, SCO6742, SLINC7152) akceleruje nástup antibiotiky indukované ACT produkce, ač jsou kmene k danému antibiotiku rezistentní, napovídá to složitějšímu mechanismu regulace. Tato interpretace je podpořena i pozorovanou zvýšenou produkcí ACT u kmene, který má vysokou rezistenci k LIN způsobenou hybridním proteinem LinR, který vznikl DNA delecí, která zachovala čtecí rámec, v genech *sco4597* a *sco4598* kódující histidin proteinkinázy, které jsou součástí dvoj-komponentního systému s proteinem SCO4596 (286). Zároveň nadprodukce ABCF proteinů ovlivňuje začátek produkce i bez přítomnosti antibiotika, kdy dochází jak k jeho uspořádání (např. proteiny SCO6742 a SCO6720 na pozadí kmene Δ TiaA), tak naopak zpoždění (např. protein SLINC7152 na pozadí kmene Δ TiaA a pro protein LmrC jak u Δ TiaA, tak *S. coelicolor* M145). Tomuto pohledu nasvědčuje i pozorované spuštění produkce sekundárních metabolitů u kmenů rodu *Streptomyces* při společné kultivaci s kmeny *Clitopilus*, kdy tato produkce nereaguje čistě na lineární pokles indukující látky vzhledem ke vzdálenosti od agarového disku, na kterém byl kmen *C. passeckerianus* (Obr. 48). Ovlivnění ACT produkce ARE5 ABCF proteiny bude tedy složitější než jen běžné odstínění signálu z přítomnosti antibiotik v prostředí.

Bakterie musí velmi obezřetně hospodařit s dostupnými zdroji, a proto dochází k expresi jen potřebných genů v závislosti na okolních podmínkách (137). Pomocí proteomické analýzy bylo mými kolegy odhaleno, že protein SCO6720 je indukovaný v nízkých koncentracích antibiotik a má vliv na WblC regulon. Naopak protein TiaA je indukován v pozdější fázi a vyššími koncentracemi antibiotik (Příloha 2; (268)). Tato postupná a koncentračně závislá indukce umožňuje *S. coelicolor* dynamickou adaptaci na přítomnost LS_AP antibiotik, kdy SCO6720 vyladuje odpověď v nízkých koncentracích antibiotik, zatímco TiaA pomáhá bakterii překonat vyšší koncentrace. Fylogenetická analýza ARE5 podskupiny ABCF proteinů navíc odhalila, že genomy zástupců kmene *Actinobacteria* často obsahují dva geny pro ARE5 proteiny, každý z jiné fylogenetické linie (Obr. 43). Výskyt těchto dvojic ARE5 proteinů v ustálených kombinacích, jako je TiaA a SCO6720, naznačuje konzervovanost této adaptivní strategie zaměřené na adaptaci k LS_AP antibiotikům.

Obě práce (Příloha 1; Příloha 2) zdůrazňují potenciál ARE5 ABCF proteinů globálně modulovat translaci a tím poskytovat další úroveň regulace, která může významně přispět k adaptaci organismu na měnící se vnější podmínky. Zároveň byl objeven jejich vliv na interakci *S. coelicolor* M145 s *C. passeckerianus*. Fylogenetická analýza naznačuje, že ARE5 ABCF proteiny představují konzervovaný mechanismus pro

jemné vyladění bakteriální reakce na antibiotické signály v mikroorganismech kódujících tyto proteiny. Také druhý ARE5 ABCF protein SLINC7152 z *S. lincolnensis*, patřící do stejné fylogenetické linie jako SCO6720 a udílející nižší míru rezistence, je indukován v přítomnosti CLI (Příloha 1; (172)). Zároveň díky podobnému vlivu AAF1 proteinu SCO6742 s SCO6720 a SLIN7152 na produkci ACT věříme, že duální role bude mezi ABCF proteiny rozšířenější.

Na základě těchto výsledků navrhujeme komplexnější pohled na ARE5 proteiny, jako translační faktory, které prostřednictvím své rezistenční funkce regulují genovou expresi v závislosti na koncentraci antibiotik. Tím se sjednocuje pohled na skupinu ABCF proteinů jako na proteiny regulující genovou expresi v závislosti na inhibici translace, kdy se liší jen původ této inhibice (antibiotika, obtížně translatované motivy) a zajišťující obnovu aktivní translace. Oba mechanismy inhibice translace využívá bakterie také k regulaci své genové exprese, zároveň je ale zastavení translace pro buňku stresovou situací (22, 187, 188, 212).

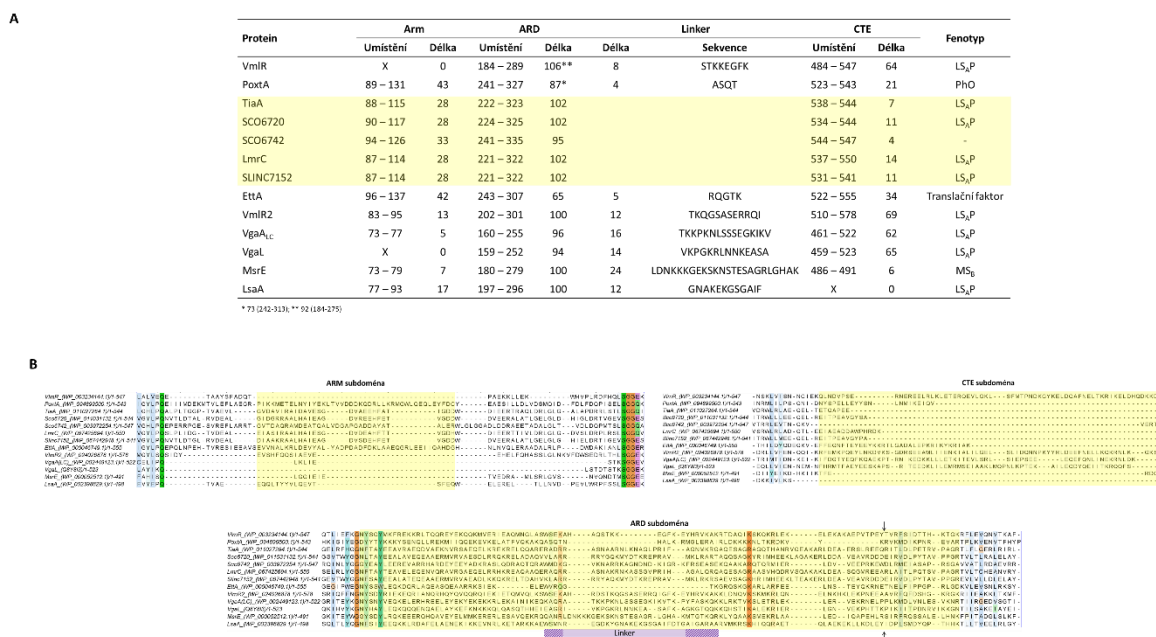


Obrázek 66: Strukturální modely ukazující subdomény vybraných ABCF proteinů. Predikované strukturální modely generované nástrojem AlphaFold3 ukazující (A) rozdílné zastoupení domén a (B) porovnání ARD/PtIM domén vybraných regulačních a ARE ABCF proteinů (převzato a upraveno (278)).

Možné propojení funkcí regulačních a ARE ABCF proteinů podporuje také zastoupení a délky subdomén. ABCF proteiny disponují specifickými subdoménami, které se nevyskytují plošně u všech zástupců ABCF proteinů. Jedná se o Arm subdoménu, která je vmezeřena v ABC α subdoméně NBD₁ a CTE (19–21). Dle experimentů s delečními variantami je potvrzeno jejich zapojení do proteinové funkce, ale není pochopena

jejich role (22, 212). Dalším rozdílem je délka linkeru, který je označován jako ARD neboli PtIM, doména. ARD doména je delší u rezistenčních proteinů v porovnání s regulačními, což odráží původ inhibice translace (Obr. 66B). Rozšíření Arm a CTE domén není plně ustáleno. Arm subdoména se častěji vyskytuje u regulačních ABCF proteinů, ale byla detekována i u některých zástupců ARE ABCF proteinů jako je PoxTA a právě LmrC (Obr. 66A); (213, 278). Délka Arm subdomény je u ARE proteinů kratší než v případě regulačních ABCF, ale je, na rozdíl od ostatních ARE proteinů, přítomna (Obr. 67A). Na základě vícenásobného sekvenčního přiložení, které bylo použito pro výpočet délek subdomén (Obr. 67B), je vidět, že sekvence není v rámci těchto proteinů konzervovaná.

Navrhovaný mechanismus nebude ovšem platit plošně na všechny ABCF proteiny. Některé z genů pro ARE proteiny jsou lokalizovány v genomu, jako je tomu u námi zkoumaných ARE5 proteinů, ale i např. genu *vmlR* z *Bacillus subtilis* (198), nebo genu *poxTA*, který je lokalizován v genomu bakterie *S. aureus* AOU-0915 (206). U těchto proteinů lze předpokládat, že se mohly v průběhu evoluce zapojit do složitých regulačních drah. Naopak u některých klinicky důležitých ARE ABCF proteinů (OprA (195), VgaA (194)) jsou jejich geny lokalizovány na plasmidech a jiných mobilních elementech. Toto umístění podporuje jejich jednodušší šíření v rámci mikrobiální populace a díky měnícímu se genomovému kontextu lze očekávat, že tyto proteiny budou mít hlavní funkci v rezistenci a nebudou zapojeny v regulačních drahách.



Obrázek 67: Délky domén u vybraných ABCF proteinů. (A) Tabulka znázorňující variabilní délku specifických domén ABCF proteinů. Zvýrazněné proteiny byly zkoumány v této práci. (B) Porovnání regionů odpovídající specifickým doménám pomocí vícenásobné sekvenční přiložení testovaných ARE5 proteinů v porovnání s vybranými ABCF proteiny. Vícenásobné sekvenční přiložení bylo generováno pomocí MAFFT v. 7.526 (255) s využitím metody FFT-NS-i.

ABCF proteiny se mohou vázat k ribozomu jen pokud je E-místo na ribozomu volné, což odpovídá situaci, kdy je translace zastavena (19, 20). Translační stress způsobený zastavením proteosyntézy představuje pro životaschopnost bakterií značný problém. Tato práce přináší první experimentální potvrzení zapojení ARE5 ABCF proteinů do regulace a ukazuje možný nový pohled na celou tuto proteinovou skupinu. Zároveň ukazuje komplexnost této skupiny. Díky rozlišení specificity indukce tyto proteiny zajišťují reakci bakterií, která se tím stává specializovanou. I přesto, že některé ARE ABCF proteiny budou mít

pravděpodobně čistě rezistenční funkci, je striktní dělení na rezistenční a regulační (též označované jako „housekeeping“; (278)) ABCF proteiny příliš zjednodušené. Toto zjednodušení následně neodráží komplikované vztahy uvnitř buňky, kdy je obtížné dát jasný mezník mezi jednotlivými proteinovými funkcemi. ARE4 a AAF1–AAF6 podskupiny ABCF proteinů se vyskytují u zástupců kmene *Actinobacteria*, které produkují velkou škálu bioaktivních látek, včetně antibiotik. Tyto proteiny mají dle predikcí Arm subdoménu, tak jako námi testované ARE5 proteiny (25). Lze tedy očekávat, že v budoucnu dojde k popsání dalších ABCF proteinů s podobnou duální funkcí, a to i mimo podskupinu ARE5. Pro lepší pochopení funkce ARE5 ABCF proteinů by se nemělo zapomínat na jejich přesah do mezidruhové interakce.

7. Souhrn

Tato práce se zaměřila na charakterizaci ARE5 ABCF proteinů u rodu *Streptomyces* s důrazem na protein LmrC ze *Streptomyces lincolnensis* a proteiny TiaA a SCO6720 ze *Streptomyces coelicolor*.

- Výsledky prokázaly, že příspěvek proteinu LmrC k celkové rezistenci *Streptomyces lincolnensis* je spíše okrajový. Hlavními rezistenčními proteiny asociovanými s biosyntetickým linkomycinovým klastrem jsou proteiny LmrA a LmrB.
- Byla pozorována druhově specifická inhibice růstu v přítomnosti ATPáza deficientních mutant proteinu LmrC, která byla ovlivnitelná růstovými podmínkami.
- LmrC byl identifikován jako klíčový prvek signální regulační dráhy spouštějící produkci linkomycinu v reakci na přítomnost LS_AP antibiotik. LmrC představuje první ARE5 ABCF protein s duální, rezistenčně-regulační funkcí, který moduluje spuštění produkce linkomycinu v reakci na přítomnost antibiotik. Zbylé dva rezistenční proteiny (LmrA a LmrB) kódované v biosyntetickém klastru vyladují produkci proteinu LmrC.
- Protein TiaA je hlavním faktorem zajišťujícím vysokou rezistenci kmene *Streptomyces coelicolor* M145 k pleuromutilinům, čímž umožňuje jeho růst v blízkosti producenta tohoto antibiotika, basidiomycety *Clitopilus passeckerianus*.
- Protein SCO6720 poskytuje *Streptomyces coelicolor* M145 pouze nízkou úroveň rezistence k LS_AP antibiotikům.
- Byl pozorován vliv ARE5 proteinů na spuštění produkce aktinorodinu indukovanou ribozom-vazebnými antibiotiky, ke kterým tyto proteiny udílí rezistenci.
- U genů *lmrC*, *tiaA* a *sco6720* byl v jejich 5'UTR oblasti predikován regulační uORF a přítomnost atenuátoru zajišťující regulaci jejich exprese. Tato regulace byla následně experimentálně potvrzena. Fylogenetická analýza spojená s predikcí uORF naznačila, že tento mechanismus regulace je u ARE5 proteinů konzervovaný. Predikované uORF ARE5 proteinů u rodu *Streptomyces* mají většinou délku 9 nukleotidů.
- Proteiny TiaA a SCO6720 zajišťují adaptivní, koncentračně závislou odpověď *Streptomyces coelicolor* M145 na LS_AP antibiotika. Fylogenetická analýza odhalila, že genomy zástupců kmene *Actinobacteria* často obsahují dva geny pro ARE5 proteiny, každý z jiné fylogenetické linie. Výskyt těchto dvojic ARE5 proteinů v ustálených kombinacích, jako je TiaA a SCO6720, naznačuje konzervovanost této adaptivní strategie. Byl navržen nový mechanismus založený na spolupráci dvou ARE5 ABCF proteinů, který umožňuje efektivní reakci na antibiotický stres.
- Prostřednictvím kopurifikace ribozomů s proteinem LmrC byla potvrzena jejich přímá interakce.

8. Seznam literatury

1. **Nelson ML, Dinardo A, Hochberg J, Armelagos GJ.** 2010. Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. *Am J Phys Anthropol* **143**:151–154.
2. **Bassett E. J., Keith M. S., Armelagos G. J., Martin D. L., Villanueva A. R.** 1980. Tetracycline-Labeled Human Bone from Ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* (80-) **209**:1532–1534.
3. **Hutchings M, Truman A, Wilkinson B.** 2019. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* Elsevier Ltd.
4. **Larsson DGJ, Flach CF.** 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* **20**:257–269.
5. 2022. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. World Health Organization.
6. **Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A.** 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem J* **136**:25–39.
7. **Perry J, Waglechner N, Wright G.** 2016. The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**.
8. **Bernier SP, Surette MG.** 2013. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front Microbiol* **4**.
9. **Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP.** 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* **4**.
10. **Alam K, Mazumder A, Sikdar S, Zhao YM, Hao J, Song C, Wang Y, Sarkar R, Islam S, Zhang Y, Li A.** 2022. Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. *Front Microbiol* **13**.
11. **Wilson DN.** 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* **12**:35–48.
12. **Spížek J, Tichý P.** 1995. Some Aspects of Overproduction of Secondary Metabolites. *Folia Microbiol* **40**:43–50.
13. **Koberska M, Kopecký J, Olšovská J, Jelínková M, Ulanova D, Man P, Flieger M, Janata J.** 2008. Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain streptomyces lincolnensis ATCC 25466. *Folia Microbiol (Praha)* **53**:395–401.
14. **Rosteck PR, Reynolds PA, Hershberger CL.** 1991. Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. *Gene* **102**:27–32.
15. **Cundliffe E, Bate N, Butler A, Fish S, Gandecha A, Merson-Davies L.** 2001. The tylosin-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**:229–234.
16. **Schoner B, Geistlich M, Rosteck P, Rao RN, Seno E, Reynolds P, Cox K, Burgett S, Hershberger C.** 1992. Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. *Gene* **115**:93–96.
17. **Kitani S, Yamauchi T, Fukushima E, Kwon Lee C, Ningsih F, Kinoshita H, Nihira T.** 2010. Characterization of varM Encoding Type II ABC Transporter in *Streptomyces virginiae*, a Virginiamycin M 1 Producer. *Actinomycetologica* **24**:51–57.
18. **Sharkey LKR, Edwards TA, O'Neill AJ.** 2016. ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *MBio* **7**.
19. **Ero R, Kumar V, Su W, Gao YG.** 2019. Ribosome protection by ABC-F proteins—Molecular mechanism and potential drug design. *Protein Sci* **28**:684–693.
20. **Wilson DN, Haurlyuk V, Atkinson GC, O'Neill AJ.** 2020. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nat Rev Microbiol* **18**:637–648.
21. **Fostier CR, Monlezun L, Ousalem F, Singh S, Hunt JF, Boël G.** 2021. ABC-F translation factors: from antibiotic resistance to immune response. *FEBS Lett* **595**:675–706.

22. **Chadani Y, Yamanouchi S, Uemura E, Yamasaki K, Niwa T, Ikeda T, Kurihara M, Iwasaki W, Taguchi H.** 2024. The ABCF proteins in *Escherichia coli* individually cope with “hard-to-translate” nascent peptide sequences. *Nucleic Acids Res* **52**:5825–5840.
23. **Ousalem F, Ngo S, Oïffer T, Omaïri-Nasser A, Hamon M, Monlezun L, Boël G.** 2024. Global regulation via modulation of ribosome pausing by the ABC-F protein ETTA. *Nat Commun* **15**.
24. **Hong HR, Prince CR, Tetreault DD, Wu L, Feaga HA.** 2024. YfmR is a translation factor that prevents ribosome stalling and cell death in the absence of EF-P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **121**.
25. **Murina V, Kasari M, Takada H, Hinnu M, Saha CK, Grimshaw JW, Seki T, Reith M, Putrinš M, Tenson T, Strahl H, Haurlyiuk V, Atkinson GC.** 2019. ABCF ATPases Involved in Protein Synthesis, Ribosome Assembly and Antibiotic Resistance: Structural and Functional Diversification across the Tree of Life. *J Mol Biol* **431**:3568–3590.
26. **Craney A, Ahmed S, Nodwell J.** 2013. Towards a new science of secondary metabolism. *J Antibiot (Tokyo)* **66**:387–400.
27. **Van Der Heul HU, Bilyk BL, McDowall KJ, Seipke RF, Van Wezel GP.** 2018. Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: New perspectives from the post-genomic era. *Nat Prod Rep* **35**:575–604.
28. **Saez JM, Raimondo EE, Costa-Gutierrez SB, Aparicio JD, Mosca Angelucci D, Donati E, Polti MA, Tomei MC, Benimeli CS.** 2025. Enhancing environmental decontamination and sustainable production through synergistic and complementary interactions of actinobacteria and fungi. *Heliyon* **11**.
29. **Retsema J, Fu W.** 2001. Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents* **18**:3–10.
30. **Arenz S, Wilson DN.** 2016. Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitors, Antibiotic Selectivity, and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development. *Mol Cell* **61**:3–14.
31. **Mitcheltree MJ, Pisipati A, Syroegin EA, Silvestre KJ, Klepacki D, Mason JD, Terwilliger DW, Testolin G, Pote AR, Wu KJY, Ladley RP, Chatman K, Mankin AS, Polikanov YS, Myers AG.** 2021. A synthetic antibiotic class overcoming bacterial multidrug resistance. *Nature* **599**:507–512.
32. **Rodnina M V.** 2018. Translation in prokaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**.
33. **Zafar H, Hassan AH, Demo G.** 2023. Translation machinery captured in motion. *Wires WileyRNA* **14**.
34. **Kaczanowska M, Rydén-Aulin M.** 2007. Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:477–494.
35. **Schluzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Ois Franceschi F, Yonath A.** 2000. Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell* **102**:615–623.
36. **Schmeing TM, Ramakrishnan V.** 2009. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**:1234–1242.
37. **Laursen BS, Sørensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU.** 2005. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:101–123.
38. **Ban N, Nissen P, Hansen J, Capel M, Moore PB, Steitz TA.** 1999. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**:841–847.
39. **Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Cate JHD.** 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science (80-)* **310**:827–834.
40. **Javed A, Christodoulou J, Cabrita LD, Orlova E V.** 2017. The ribosome and its role in protein folding: Looking through a magnifying glass. *Acta Crystallogr Sect D Struct Biol* **73**:509–521.
41. **Ibba M, Söll D.** 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **69**:617–650.
42. **Hwang S, Lee N, Jeong Y, Lee Y, Kim W, Cho S, Palsson BO, Cho BK.** 2019. Primary transcriptome and translome analysis determines transcriptional and translational regulatory elements encoded in the *Streptomyces clavuligerus* genome. *Nucleic Acids Res* **47**:6114–6129.
43. **Antonov I V., O’Loughlin S, Gorohovski AN, O’Connor PBF, Baranov P V., Atkins JF.** 2023. *Streptomyces* rare codon UUA: from features associated with 2 adpA related locations to candidate phage regulatory translational bypassing. *RNA Biol* **20**:926–942.

44. **Korostelev AA.** 2011. Structural aspects of translation termination on the ribosome. *RNA* **17**:1409–1421.
45. **Spížek J, Řezanka T.** 2016. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem Pharmacol.* Elsevier Inc.
46. **Spížek J, Řezanka T.** 2004. Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**:510–519.
47. **Řezanka T, Spížek J, Sigler K.** 2007. Medicinal use of lincosamides and microbial resistance to them. *Antiinfect Agents Med Chem* **6**:133–144.
48. **Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F.** 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**:814–821.
49. **Tu D, Blaha G, Moore PB, Steitz TA.** 2005. Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell* **121**:257–270.
50. **Dunkle JA, Xiong L, Mankin AS, Cate JHD.** 2010. Structures of the Escherichia coli ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *PNAS* **107**:17152–17157.
51. **Matzov D, Eyal Z, Benhamou RI, Shalev-Benami M, Halfon Y, Krupkin M, Zimmerman E, Rozenberg H, Bashan A, Fridman M, Yonath A.** 2017. Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res* **45**:10284–10292.
52. **Kouvela EC, Petropoulos AD, Kalpaxis DL.** 2006. Unraveling new features of clindamycin interaction with functional ribosomes and dependence of the drug potency on polyamines. *J Biol Chem* **281**:23103–23110.
53. **Kostopoulou ON, Papadopoulos G, Kouvela EC, Kalpaxis DL.** 2013. Clindamycin binding to ribosomes revisited: Foot printing and computational detection of two binding sites within the peptidyl transferase center. *Pharmazie* **68**:616–621.
54. **Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M.** 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* **330**:1005–1014.
55. **Mast Y, Wohlleben W.** 2013. Streptogramins - Two are better than one! *Int J Med Microbiol* **304**:44–50.
56. **Noeske J, Huang J, Olivier NB, Giacobbe RA, Zambrowski M, Cate JHD.** 2014. Synergy of streptogramin antibiotics occurs independently of their effects on translation. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:5269–5279.
57. **Hansen JL, Moore PB, Steitz TA.** 2003. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **330**:1061–1075.
58. **Schwarz S, Shen J, Kadlec K, Wang Y, Michael GB, FeBler AT, Vester B.** 2016. Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: Mode of action and mechanisms of resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**.
59. **Sharkey LKR, O’Neill AJ.** 2018. Antibiotic Resistance ABC-F Proteins: Bringing Target Protection into the Limelight. *ACS Infect Dis.* American Chemical Society.
60. **Polikanov YS, Starosta AL, Juette MF, Altman RB, Terry DS, Lu W, Burnett BJ, Dinos G, Reynolds KA, Blanchard SC, Steitz TA, Wilson DN.** 2015. Distinct tRNA Accommodation Intermediates Observed on the Ribosome with the Antibiotics Hygromycin A and A201A. *Mol Cell* **58**:832–844.
61. **Dinos GP.** 2017. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol* **174**:2967–2983.
62. **Nor Amdan NA, Shahrulzamri NA, Hashim R, Mohamad Jamil N.** 2024. Understanding the evolution of macrolides resistance: A mini review. *J Glob Antimicrob Resist* **38**:368–375.
63. **Vázquez-Laslop N, Mankin AS.** 2018. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends Biochem Sci* **43**:668–684.
64. **Pavlović D, Mutak S, Andreotti D, Biondi S, Cardullo F, Paio A, Piga E, Donati D, Lociuoro S.** 2014. Synthesis and structure-activity relationships of α -Amino- γ -lactone Ketolides: A novel class of

- macrolide antibiotics. *ACS Med Chem Lett* **5**:1133–1137.
65. **Bulkley D, Innis CA, Blaha G, Steitz TA.** 2010. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *PNAS* **107**:17158–17163.
 66. **Davis AR, Gohara DW, Yap MNF.** 2014. Sequence selectivity of macrolide-induced translational attenuation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:15379–15384.
 67. **Kannan K, Kanabar P, Schryer D, Florin T, Oh E, Bahroos N, Tenson T, Weissman JS, Mankin AS.** 2014. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:15958–15963.
 68. **Sothiselvam S, Neuner S, Rigger L, Klepacki D, Micura R, Vázquez-Laslop N, Mankin AS.** 2016. Binding of Macrolide Antibiotics Leads to Ribosomal Selection against Specific Substrates Based on Their Charge and Size. *Cell Rep* **16**:1789–1799.
 69. **Paukner S, Riedl R.** 2017. Pleuromutilins: Potent drugs for resistant bugs-mode of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**.
 70. **Covvey JR, Guarascio AJ.** 2022. Clinical use of lefamulin: A first-in-class semisynthetic pleuromutilin antibiotic. *J Intern Med* **291**:51–63.
 71. **Goethe O, Heuer A, Ma X, Wang Z, Herzon SB.** 2019. Antibacterial properties and clinical potential of pleuromutilins. *Nat Prod Rep* **36**:220–247.
 72. **Davidovich C, Bashan A, Auerbach-Nevo T, Yaggie RD, Gontarek RR, Yonath A.** 2007. Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity. *PNAS* **104**:4291–4296.
 73. **Schlünzen F, Pyetan E, Fucini P, Yonath A, Harms JM.** 2004. Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: The structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Mol Microbiol* **54**:1287–1294.
 74. **Eyal Z, Matzov D, Krupkin M, Paukner S, Riedl R, Rozenberg H, Zimmerman E, Bashan A, Yonath A.** 2016. A novel pleuromutilin antibacterial compound, its binding mode and selectivity mechanism. *Sci Rep* **6**.
 75. **Yan K, Madden L, Choudhry AE, Voigt CS, Copeland RA, Gontarek RR.** 2006. Biochemical characterization of the interactions of the novel pleuromutilin derivative retapamulin with bacterial ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3875–3881.
 76. **Bibb MJ, Fernández-Martínez LT, Borsetto C, Gomez-Escribano JP, Bibb MJ, Al-Bassam MM, Chandra G.** 2014. New insights into chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:7441–7450.
 77. **Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A.** 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* **28**:519–542.
 78. **Bozdogan B, Appelbaum PC.** 2004. Oxazolidinones: Activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents* **23**:113–119.
 79. **Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ.** 2001. For personal use. Only reproduce with permission from The Lancet Publishing Group. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *LANCET* • **358**:207–208.
 80. **Foti C, Piperno A, Scala A, Giuffrè O.** 2021. Oxazolidinone antibiotics: Chemical, biological and analytical aspects. *Molecules* **26**.
 81. **Zhang GXZ, Liu TT, Ren AX, Liang WX, Yin H, Cai Y.** 2024. Advances in contezolid: novel oxazolidinone antibacterial in Gram-positive treatment. *Infection* **52**:787–800.
 82. **Wilson DN, Schlunzen F, Harms JM, Starosta AL, Connell SR, Fucini P.** 2008. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *PNAS* **105**:13339–13344.
 83. **Choi J, Marks J, Zhang J, Chen DH, Wang J, Vázquez-Laslop N, Mankin AS, Puglisi JD.** 2020. Dynamics of the context-specific translation arrest by chloramphenicol and linezolid. *Nat Chem Biol* **16**:310–317.
 84. **Marks J, Kannan K, Roncase EJ, Klepacki D, Kefi A, Orelle C, Vázquez-Laslop N, Mankin AS.**

2016. Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:12150–12155.
85. **McKee EE, Ferguson M, Bentley AT, Marks TA.** 2006. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2042–2049.
 86. **Leach KL, Swaney SM, Colca JR, McDonald WG, Blinn JR, Thomasco LMM, Gadwood RC, Shinabarger D, Xiong L, Mankin AS.** 2007. The Site of Action of Oxazolidinone Antibiotics in Living Bacteria and in Human Mitochondria. *Mol Cell* **26**:393–402.
 87. **Bibel B, Raskar T, Couvillion M, Lee M, Kleinman JI, Takeuchi-Tomita N, Churchman LS, Fraser JS, Fujimori DG.** 2024. Context-specific inhibition of mitochondrial ribosomes by phenicol and oxazolidinone antibiotics.
 88. **Isono K.** Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)* **41**:1711–1739.
 89. **Tercero JA, Carlos Espinosa J, Lacalle RA, Jiménez A.** 1996. The Biosynthetic Pathway of the Aminonucleoside Antibiotic Puromycin, as Deduced from the Molecular Analysis of the *pur* Cluster of *Streptomyces alboniger**. *J Biol Chem* **271**:1579–1590.
 90. **Kirst HA, Dorman DE, Occolowitz JL, Jones ND, Paschal JW, Hamill RL, Szymanski EF.** THE structure of A201A, a novel nucleoside antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* **38**:575–586.
 91. **Saugar I, Sanz E, Rubio MÁ, Espinosa JC, Jiménez A.** 2002. Identification of a set of genes involved in the biosynthesis of the aminonucleoside moiety of antibiotic A201A from *Streptomyces capreolus*. *Eur J Biochem* **269**:5527–5535.
 92. **Guerrero M del C, Modolell J.** 1980. Hygromycin A, a Novel Inhibitor of Ribosomal Peptidyltransferase. *Eur J Biochem* **107**:409–414.
 93. **Leimer N, Wu X, Imai Y, Morrissette M, Pitt N, Favre-Godal Q, Iinishi A, Jain S, Caboni M, Leus I V., Bonifay V, Niles S, Bargabos R, Ghiglieri M, Corsetti R, Krumpoch M, Fox G, Son S, Klepacki D, Polikanov YS, Frelicheh CA, McCarthy JE, Edmondson DG, Norris SJ, D’Onofrio A, Hu LT, Zgurskaya HI, Lewis K.** 2021. A selective antibiotic for Lyme disease. *Cell* **184**:5405–5418.e16.
 94. **Lee HB, Kim C-J, Kim J-S, Hong K-S, Cho KY.** A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycete strain *Streptomyces* sp. 8E-12. *Lett Appl Microbiol* **36**:3887–391.
 95. **Aviner R.** 2020. The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Comput Struct Biotechnol J* **18**:1074–1083.
 96. **Pankey GA, Sabath LD.** Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *CID* **38**:864–870.
 97. **Sun G, Zhang Q, Dong Z, Dong D, Fang H, Wang C, Dong Y, Wu J, Tan X, Zhu P, Wan Y.** 2022. Antibiotic resistant bacteria: A bibliometric review of literature. *Front Public Heal.*
 98. **Bharadwaj A, Rastogi A, Pandey S, Gupta S, Sohal JS.** 2022. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. *Biomed Res Int* **2022**.
 99. **Mullis MM, Rambo IM, Baker BJ, Reese BK.** 2019. Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Front Microbiol* **10**.
 100. **Torsvik V. ØL.** 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**:240–245.
 101. **Seipke RF, Kaltenpoth M, Hutchings MI.** 2012. *Streptomyces* as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol Rev* **36**:862–876.
 102. **Yang Z, Qiao Y, Konakalla NC, Ströbech E, Harris P, Peschel G, Agler-Rosenbaum M, Weber T, Andreasson E, Ding L.** 2023. *Streptomyces* alleviate abiotic stress in plant by producing pteridic acids. *Nat Commun* **14**.
 103. **van der Meij A, Worsley SF, Hutchings MI, van Wezel GP.** 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* **41**:392–416.
 104. **Cissoko M, Hoher V, Gherbi H, Gully D, Carré-Mlouka A, Sane S, Pignoly S, Champion A,**

- Ngom M, Pujic P, Fournier P, Gtari M, Swanson E, Pesce C, Tisa LS, Sy MO, Svistoonoff S.** 2018. Actinorhizal signaling molecules: Frankia root hair deforming factor shares properties with NIN inducing factor. *Front Plant Sci* **8**:71.
105. **Hammesfahr U, Heuer H, Manzke B, Smalla K, Thiele-Bruhn S.** 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biol Biochem* **40**:1583–1591.
106. **Roose-Amsaleg C, Laverman AM.** 2016. Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. *Environ Sci Pollut Res* **23**:4000–4012.
107. **Laverman AM, Cazier T, Yan C, Roose-Amsaleg C, Petit F, Garnier J, Berthe T.** 2015. Exposure to vancomycin causes a shift in the microbial community structure without affecting nitrate reduction rates in river sediments. *Environ Sci Pollut Res* **22**:13702–13709.
108. **Yamamura S, Watanabe K, Suda W, Tsuboi S, Watanabe M.** 2014. Effect of antibiotics on redox transformations of arsenic and diversity of arsenite-oxidizing bacteria in sediment microbial communities. *Environ Sci Technol* **48**:350–357.
109. **Aminov RI.** 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* **11**:2970–2988.
110. **Gerber M, Walch C, Löffler B, Tischendorf K, Reischl U, Ackermann G.** 2008. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* **57**:776–783.
111. **Kong D, Wang X, Nie J, Niu G.** 2019. Regulation of Antibiotic Production by Signaling Molecules in *Streptomyces*. *Front Microbiol* **10**.
112. **Imai Y, Sato S, Tanaka Y, Ochi K, Hosaka T.** 2015. Lincomycin at subinhibitory concentrations potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* spp. *Appl Environ Microbiol* **81**:3869–3879.
113. **Ishizuka M, Imai Y, Mukai K, Shimono K, Hamazu R, Ochi K, Hosaka T.** 2018. A possible mechanism for lincomycin induction of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek*, **111**:705–716.
114. **Sherwood EJ, Bibb MJ.** 2013. The antibiotic planosporicin coordinates its own production in the actinomycete *Planomonospora alba*. *PNAS* **110**.
115. **Cycoń M, Mroziak A, Piotrowska-Seget Z.** 2019. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front Microbiol* **10**.
116. **Bibb MJ.** 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**:208–215.
117. **Salwan R, Sharma V.** 2020. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiol Res* **231**.
118. **Stratigopoulos G, Cundliffe E.** 2002. Expression Analysis of the Tylosin-Biosynthetic Gene Cluster: Pivotal Regulatory Role of the tylQ Product. *Chem Biol* **9**:71–78.
119. **van Bergeijk DA, Terlouw BR, Medema MH, van Wezel GP.** 2020. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nat Rev Microbiol* **18**:546–558.
120. **Rutledge PJ, Challis GL.** 2015. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat Rev Microbiol* **13**:509–523.
121. **Gramajo HC, Takano E, Bibb MJ.** 1993. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol* **7**:837–845.
122. **Wei J, He L, Niu G.** 2018. Regulation of antibiotic biosynthesis in actinomycetes: Perspectives and challenges. *Synth Syst Biotechnol* **3**:229–235.
123. **White J, Bibb M.** 1997. bldA Dependence of Undecylprodigiosin Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Involves a Pathway-Specific Regulatory Cascade. *J Bacteriol* **179**:627–633.
124. **Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H.** 2013. Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**:112–143.

125. **Zhu H, Sandiford SK, Van Wezel GP.** 2014. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**:371–386.
126. **Yan Y, Xia H.** 2024. The roles of SARP family regulators involved in secondary metabolism in *Streptomyces*. *Front Microbiol* **15**.
127. **Bednarz B, Kotowska M, Pawlik KJ.** 2019. Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Microbiol Biotechnol* **103**:6423–6434.
128. **McLean TC, Hoskisson PA, Seipke RF.** 2016. Coordinate Regulation of Antimycin and Candicidin Biosynthesis. *mSphere* **1**.
129. **Jiang MX, Yin M, Wu SH, Han XL, Ji KY, Wen ML, Lu T.** 2017. GdmRIII, a TetR Family Transcriptional Regulator, Controls Geldanamycin and Elaiophylin Biosynthesis in *Streptomyces autolyticus* CGMCC0516. *Sci Rep* **7**.
130. **Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih CJ, Kao CM, Buttner MJ, Cohen SN.** 2005. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **58**:1276–1287.
131. **Chakraborty R, Bibb M.** 1997. The ppGpp Synthetase Gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Plays a Conditional Role in Antibiotic Production and Morphological Differentiation. *J Bacteriol* **179**:5854–5861.
132. **Steinchen W, Zegarra V, Bange G.** 2020. (p)ppGpp: Magic Modulators of Bacterial Physiology and Metabolism. *Front Microbiol* **11**.
133. **Sawai R, Suzuki A, Takano Y, Lee PC, Horinouchi S.** 2004. Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **334**:53–61.
134. **Lee Y, Kim K, Suh JW, Rhee S, Lim Y.** 2007. Binding study of AfsK, a Ser/Thr kinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and S-adenosyl-L-methionine. *FEMS Microbiol Lett* **266**:236–240.
135. **Umeyama T, Lee P-C, Ueda K, Horinouchi S.** 1999. An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145**:2281–2292.
136. **Horinouchi S.** 2007. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**:283–299.
137. **Flårdh K, Buttner MJ.** 2009. *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**:36–49.
138. **Bentley SD, Chater KF, Cerdeñ O-Tá Rraga A-M, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, 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 BG, Parkhill J, Hopwood DA.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**:141–147.
139. **Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S.** 2008. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* **190**:4050–4060.
140. **Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D.** 2007. Genomics of Actinobacteria : Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum . *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:495–548.
141. **Kieser T, Bibb MJ., Buttner MJ., Chater KF., Hopwood DA.** 2000. Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation, Norwich.
142. **Malpartida F, Hopwood DA.** 1986. Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* **205**:66–73.
143. **Nass NM, Farooque S, Hind C, Wand ME, Randall CP, Sutton JM, Seipke RF, Rayner CM, O'Neill AJ.** 2017. Revisiting unexploited antibiotics in search of new antibacterial drug candidates: The case of γ -actinorhodin. *Sci Rep* **7**.
144. **Hertweck C.** 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chemie - Int Ed* **48**:4688–

4716.

145. **Bystrykh L V, Ferna´ndez MA, Ferna´ndez-Moreno F, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L.** 1996. Production of Actinorhodin-Related “Blue Pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **178**:2238–2244.
146. **Mak S, Nodwell JR.** 2017. Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Mol Microbiol* **106**:597–613.
147. **Taguchi T, Yabe M, Odaki H, Shinozaki M, Metsä-Ketelä M, Arai T, Okamoto S, Ichinose K.** 2013. Biosynthetic conclusions from the functional dissection of oxygenases for biosynthesis of actinorhodin and related streptomyces antibiotics. *Chem Biol* **20**:510–520.
148. **Hashimoto M, Watari S, Taguchi T, Ishikawa K, Kumamoto T, Okamoto S, Ichinose K.** 2023. Actinorhodin Biosynthesis Terminates with an Unprecedented Biaryl Coupling Reaction. *Angew Chem - Int Ed* **62**.
149. **Nitta K, Carratore F Del, Breitling R, Takano E, Putri SP, Fukusaki E.** 2020. Multi-Omics Analysis of the Effect of cAMP on Actinorhodin Production in *Streptomyces coelicolor*. *Front Bioeng Biotechnol* **8**.
150. **Li X, Wang J, Li S, Ji J, Wang W, Yang K.** 2015. ScbR-and ScbR2-mediated signal transduction networks coordinate complex physiological responses in *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep* **5**.
151. **Bednarz B, Kotowska M, Wenecki M, Derkacz M, Jastrzemska A, Ciekot J, Pawlik KJ.** 2024. The gamma-butyrolactone receptors ScbR and AtrA form a quorum sensing switch between coelimycin and actinorhodin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2).
152. **Wang G, Tanaka Y, Ochi K.** 2010. The G243D mutation (afsB mutation) in the principal sigma factor σ HrdB alters intracellular ppGpp level and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **156**:2384–2392.
153. **Lee J, Borukhov S.** 2016. Bacterial RNA polymerase-DNA interaction-The driving force of gene expression and the target for drug action. *Front Mol Biosci* **3**.
154. **Sun D, Liu C, Zhu J, Liu W.** 2017. Connecting metabolic pathways: Sigma factors in *Streptomyces* spp. *Front Microbiol* **8**.
155. **Stankovic N, Radulovic V, Petkovic M, Vuckovic I, Jadrantin M, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J.** 2012. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**:1217–1231.
156. **Williamson NR, Fineran PC, Leeper FJ, Salmond GPC.** 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol* **4**:887–899.
157. **Mo SJ, Sydor PK, Corre C, Alhamadsheh MM, Stanley AE, Haynes SWW, Song L, Reynolds KA, Challis GL.** 2008. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* Pathway to 2-Undecylpyrrole, a Key Intermediate in Undecylprodiginine and Streptorubin B Biosynthesis. *Chem Biol* **15**:137–148.
158. **Sevcikova B, Kormanec J.** 2004. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Arch Microbiol* **181**:384–389.
159. **Yin H, Wang W, Fan K, Li Z.** 2019. Regulatory perspective of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Sci China Life Sci* **62**:698–700.
160. **Fu W, Pan Y, Shi Y, Chen J, Gong D, Li Y, Hao G, Han D.** 2022. Root Morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* Tuned by Plant Growth-Promoting *Streptomyces* Isolated From Root-Associated Soil of *Artemisia annua*. *Front Plant Sci* **12**.
161. **Xu Y, Tan G, Ke M, Li J, Tang Y, Meng S, Niu J, Wang Y, Liu R, Wu H, Bai L, Zhang L, Zhang B.** 2018. Enhanced lincomycin production by co-overexpression of metK1 and metK2 in *Streptomyces lincolnensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **45**:345–355.
162. **Wang R, Kong F, Wu H, Hou B, Kang Y, Cao Y, Duan S, Ye J, Zhang H.** 2020. Complete genome sequence of high-yield strain *S. lincolnensis* B48 and identification of crucial mutations contributing to lincomycin overproduction. *Synth Syst Biotechnol* **5**:37–48.
163. **Hou B, Lin Y, Wu H, Guo M, Petkovic H, Tao L, Zhu X, Ye J, Zhang H.** 2018. The novel transcriptional regulator LmbU promotes lincomycin biosynthesis through regulating expression of its

- target genes in *Streptomyces lincolnensis*. *J Bacteriol* **200**.
164. **Peschke U, Schmidt H, Zhang H-Z, Piepersberg W.** 1995. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* **16**:1137–1156.
 165. **Mao Y, Zhang X, Zhou T, Hou B, Ye J, Wu H, Wang R, Zhang H.** 2024. Three new LmbU targets outside lmb cluster inhibit lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Microb Cell Fact* **23**:2–14.
 166. **Lin CY, Pang AP, Zhang Y, Qiao J, Zhao GR.** 2020. Comparative transcriptomic analysis reveals the significant pleiotropic regulatory effects of LmbU on lincomycin biosynthesis. *Microb Cell Fact* **19**.
 167. **Novotna J, Olsovska J, Novak P, Mojzes P, Chaloupkova R, Kamenik Z, Spizek J, Kutejova E, Mareckova M, Tichy P, Damborsky J, Janata J.** 2013. Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLoS One* **8**.
 168. **Neusser D, SH, Spíže. J. NJ. PU. KS. TP. PW.** 1998. The genes lmbB1 and lmbB2 of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *ArchMicrobiol* **169**:322–332.
 169. **Kadlík S, Kučera T, Chalupská D, Gažák R, Koběrská M, Ulanová D, Kopecký J, Kutejová E, Najmanová L, Janata J.** 2013. Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis. *PLoS One* **8**.
 170. **Sasaki E, Lin CI, Lin KY, Liu HW.** 2012. Construction of the octose 8-phosphate intermediate in lincomycin A biosynthesis: Characterization of the reactions catalyzed by LmbR and LmbN. *J Am Chem Soc* **134**:17432–17435.
 171. **Zhao Q, Wang M, Xu D, Zhang Q, Liu W.** 2015. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature* **518**:115–119.
 172. **Koberska M, Vesela L, Vimberg V, Lenart J, Vesela J, Kamenik Z, Janata J, Novotna GB.** 2021. Beyond Self-Resistance: ABCF ATPase LmrC Is a Signal-Transducing Component of an Antibiotic-Driven Signaling Cascade Accelerating the Onset of Lincomycin Biosynthesis. *MBio* **12**.
 173. **Tu B, Mao Y, Wang R, Kang Y, Ye J, Zhang H, Wu H.** 2023. An alternative σ factor σ_{Lsl} regulates lincomycin production in *Streptomyces lincolnensis*. *J Basic Microbiol* **63**:190–199.
 174. **Wu W, Kang Y, Hou B, Ye J, Wang R, Wu H, Zhang H.** 2023. Characterization of a TetR-type positive regulator AtrA for lincomycin production in *Streptomyces lincolnensis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **87**:786–795.
 175. **Wang R, Zhou T, Kong F, Hou B, Ye J, Wu H, Zhang H.** 2023. AflQ1-Q2 represses lincomycin biosynthesis via multiple cascades in *Streptomyces lincolnensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **107**:2933–2945.
 176. **Hou B, Wang R, Zou J, Zhang F, Wu H, Ye J, Zhang H.** 2021. A putative redox-sensing regulator Rex regulates lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *J Basic Microbiol* **61**:772–781.
 177. **Law CJ, Maloney PC, Wang DN.** 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* **62**:289–305.
 178. **Drew D, North RA, Nagarathinam K, Tanabe M.** 2021. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chem Rev* **121**:5289–5335.
 179. **Zhang H-Z, Schmidt H, Piepersberg W.** 1992. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *ImrA* and *ImrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* **6**:2147–2157.
 180. **Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Bogo Jensen L, Rood J, Seppala H.** 1999. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents Chemother* **43**:2823–2830.
 181. **Park AK, Kim H, Jin HJ.** 2010. Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, *Erm* and *KsgA*, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett* **309**:151–162.
 182. **Wang Z, Tian F, Cai L, Zhang J, Liu J, Zeng X.** 2019. Identification of candidate ATP-binding cassette transporter gene family members in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) via adult tissues transcriptome analysis. *Sci Rep* **9**.

183. **Licht A, Schneider E.** 2011. ATP binding cassette systems: Structures, mechanisms, and functions. *Cent Eur J Biol* **6**:785–801.
184. **Obana N, Takada H, Crowe-Mcauliffe C, Iwamoto M, Egorov AA, Wu KJY, Chiba S, Murina V, Paternoga H, Tresco BIC, Nomura N, Myers AG, Atkinson GC, Wilson DN, Hauryliuk V.** 2023. Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmlR2, Ard1 and CplR. *Nucleic Acids Res* **51**:4536–4554.
185. **Chen B.** 2013. EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nat Struct Mol Biol* **21**:1.
186. **Boël G.** 2013. The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nat Struct Mol Biol* **21**.
187. **Keiler KC.** 2015. Mechanisms of ribosome rescue in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **13**:285–297.
188. **Chadani Y, Niwa T, Izumi T, Sugata N, Nagao A, Suzuki T, Chiba S, Ito K, Taguchi H.** 2017. Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Mol Cell* **68**:528-539.e5.
189. **Hummels KR, Kearns DB.** 2021. Translation elongation factor P (EF-P). *FEMS Microbiol Rev* **44**:208–218.
190. **Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, Jung K.** 2013. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science (80-)* **339**:82–85.
191. **Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, Rodnina M V.** 2013. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science (80-)* **339**:85–88.
192. **Nakatogawa H, Ito K.** 2002. The Ribosomal Exit Tunnel Functions as a Discriminating Gate. *Cell* **108**:629–636.
193. **Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV.** 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**:42–51.
194. **Chesneau O, Ligeret H, Hosan-Aghaie N, Morvan A, Dassa E.** 2005. Molecular Analysis of Resistance to Streptogramin A Compounds Conferred by the Vga Proteins of Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:973–980.
195. **Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, Zhang R, Li J, Zhao Q, He T, Wang D, Wang Z, Shen Y, Li Y, Feßler AT, Wu C, Yu H, Deng X, Xia X, Shen J.** 2015. A novel gene, *oprA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* **70**:2182–2190.
196. **Allignet J, Loncle V, Solh NE.** 1992. Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin antibiotics putative A-like (*Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* minicells; pristinamycins; streptogramins). *Gene* **117**:45–51.
197. **Novotna G, Janata J.** 2006. A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, Vga(A)LC, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:4070–4076.
198. **Ohki R, Tateno K, Takizawa T, Aiso T, Murata M.** 2005. Transcriptional termination control of a novel ABC transporter gene involved in antibiotic resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**:5946–5954.
199. **Singh K V., Weinstock GM, Murray BE.** 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (*Lsa*) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1845–1850.
200. **Hot C, Berthet N, Chesneau O.** 2014. Characterization of *sal(A)*, a Novel Gene Responsible for Lincosamide and Streptogramin a resistance in *staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:3335–3341.
201. **Dar D, Shamir M, Mellin JR, Koutero M, Stern-Ginossar N, Cossart P, Sorek R.** 2016. Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria. *Science (80-)* **352**.
202. **Crowe-McAuliffe C, Murina V, Turnbull KJ, Kasari M, Mohamad M, Polte C, Takada H, Vaitkevicius K, Johansson J, Ignatova Z, Atkinson GC, O’Neill AJ, Hauryliuk V, Wilson DN.**

2021. Structural basis of ABCF-mediated resistance to pleuromutilin, lincosamide, and streptogramin A antibiotics in Gram-positive pathogens. *Nat Commun* **12**.
203. **Zhang C, Liu L, Zhang P, Cui J, Qin X, Ma L, Han K, Wang Z, Wang S, Ding S, Shen Z.** 2022. Characterization of a Novel Gene, *srpA*, Conferring Resistance to Streptogramin A, Pleuromutilins, and Lincosamides in *Streptococcus suis*. *Engineering* **9**:85–94.
204. **Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe W J, Baumberg S, Wootton JC.** 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport supergene family. *Mol Microbiol* **4**:1207–1214.
205. **Reynolds ED, Cove JH.** 2005. Resistance to telithromycin is conferred by *msr(A)*, *msrC* and *msr(D)* in *Staphylococcus aureus* [1]. *J Antimicrob Chemother* **56**:1179–1180.
206. **Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A, Galeotti CL, Morroni G, Pollini S, Varaldo PE, Rossolini GM.** 2018. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother* **73**:1763–1769.
207. **Crowe-McAuliffe C, Graf M, Huter P, Takada H, Abdelshahid M, Nováček J, Murina V, Atkinson GC, Haurlyuk V, Wilson DN.** 2018. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *PNAS* **115**:8978–8983.
208. **Barrasa MI, Tercero JA, Lacalle RA, Jimenez A.** 1995. The *Ard1* Gene from *Streptomyces capreolus* Encodes a Polypeptide of the ABC-Transporters Superfamily Which Confers Resistance to the Aminonucleoside Antibiotic A201A. *Eur J Biochem* **228**:562–569.
209. **Thomas C, Tampé R.** 2020. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. *Annu Rev Biochem* **89**:605–636.
210. **Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J.** 2008. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:317–364.
211. **Ambudkar S V., Kim IW, Xia D, Sauna ZE.** 2006. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett* **580**:1049–1055.
212. **Fostier CR, Ousalem F, Leroy EC, Ngo S, Soufari H, Innis CA, Hashem Y, Boël G.** 2023. Regulation of the macrolide resistance ABC-F translation factor *MsrD*. *Nat Commun* **14**.
213. **Crowe-McAuliffe C, Murina V, Turnbull KJ, Huch S, Kasari M, Takada H, Nersisyan L, Sundsfjord A, Hegstad K, Atkinson GC, Pelechano V, Wilson DN, Haurlyuk V.** 2022. Structural basis for *PoxtA*-mediated resistance to phenicol and oxazolidinone antibiotics. *Nat Commun* **13**.
214. **Jacquet E, Girard JM, Ramaen O, Pamlard O, Lévaïque H, Betton JM, Dassa E, Chesneau O.** 2008. ATP hydrolysis and pristinamycin IIA inhibition of the *Staphylococcus aureus* *Vga(A)*, a dual ABC protein involved in streptogramin A resistance. *J Biol Chem* **283**:25332–25339.
215. **Su W, Kumar V, Ding Y, Ero R, Serra A, Lee BST, Wong ASW, Shi J, Sze SK, Yang L, Gao YG.** 2018. Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**:5157–5162.
216. **Crowe-McAuliffe C, Graf M, Huter P, Takada H, Abdelshahid M, Nováček J, Murina V, Atkinson GC, Haurlyuk V, Wilson DN.** 2018. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *PNAS* **6s**.
217. **Cui Z, Li X, Shin J, Gamper H, Hou YM, Sacchettini JC, Zhang J.** 2022. Interplay between an ATP-binding cassette F protein and the ribosome from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **13**.
218. **Lenart J, Vimberg V, Vesela L, Janata J, Novotna GB.** 2015. Detailed mutational analysis of *Vga(A)* interdomain linker: Implication for antibiotic resistance specificity and mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:1360–1364.
219. **Naville M, Gautheret D.** 2009. Transcription attenuation in bacteria: Theme and variations. *Briefings Funct Genomics Proteomics* **8**:482–492.
220. **Dersch P, Khan MA, Mühlen S, Görke B.** 2017. Roles of regulatory RNAs for antibiotic resistance in bacteria and their potential value as novel drug targets. *Front Microbiol* **8**.
221. **Yanofsky C, Platt T, Crawford IP, Nichols BP, Christie GE, Horowitz H, Vancleemput M, Wu**

- AM. 1981. The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **9**.
222. **Vitreschak AG, Lyubetskaya E V., Shirshin MA, Gelfand MS, Lyubetsky VA.** 2004. Attenuation regulation of amino acid biosynthetic operons in proteobacteria: Comparative genomics analysis. *FEMS Microbiol Lett* **234**:357–370.
223. **Vázquez-Laslop N, Klepacki D, Mulhearn DC, Ramu H, Krasnykh O, Franzblau S, Mankin AS.** 2011. Role of antibiotic ligand in nascent peptide-dependent ribosome stalling. *PNAS* **108**:10496–10501.
224. **Dar D, Sorek R.** 2017. Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. Elsevier Ltd.
225. **Ramu H, Mankin A, Vazquez-Laslop N.** 2009. Programmed drug-dependent ribosome stalling: MicroReview. *Mol Microbiol* **71**:811–824.
226. **Beckert B, Leroy EC, Sothiselvam S, Bock L V., Svetlov MS, Graf M, Arenz S, Abdelshahid M, Seip B, Grubmüller H, Mankin AS, Innis CA, Vázquez-Laslop N, Wilson DN.** 2021. Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics. *Nat Commun* **12**.
227. **Arenz S, Bock L V., Graf M, Innis CA, Beckmann R, Grubmüller H, Vaiana AC, Wilson DN.** 2016. A combined cryo-EM and molecular dynamics approach reveals the mechanism of ErmBL-mediated translation arrest. *Nat Commun* **7**.
228. **Arenz S, Meydan S, Starosta AL, Berninghausen O, Beckmann R, Vázquez-Laslop N, Wilson DN.** 2014. Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation. *Mol Cell* **56**:446–452.
229. **Arenz S, Ramu H, Gupta P, Berninghausen O, Beckmann R, Vázquez-Laslop N, Mankin AS, Wilson DN.** 2014. Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide. *Nat Commun* **5**.
230. **Vimberg V, Cavanagh JP, Novotna M, Lenart J, Ngoc BNT, Vesela J, Pain M, Koberska M, Novotna GB.** 2020. Ribosome-Mediated Attenuation of *vga(A)* Expression Is Shaped by the Antibiotic Resistance Specificity of *Vga(A)* Protein Variants. *Antimicrob Agents Chemother* **64**.
231. **Takada H, Mandell ZF, Yakhnin H, Glazyrina A, Chiba S, Kurata T, Wu KJY, Tresco BIC, Myers AG, Aktinson GC, Babitzke P, Haurlyuk V.** 2022. Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor *VmlR* is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. *Nucleic Acids Res* **50**:6174–6189.
232. **Chancey ST, Bai X, Kumar N, Drabek EF, Daugherty SC, Colon T, Ott S, Sengamalay N, Sadzewicz L, Tallon LJ, Fraser CM, Tettelin H, Stephens DS.** 2015. Transcriptional attenuation controls macrolide inducible efflux and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and in other gram-positive bacteria containing *mef/mel* (*msr(D)*) elements. *PLoS One* **10**.
233. **Yakhnin H, Yakhnin A V., Mouery BL, Mandell ZF, Karbasiafshar C, Kashlev M, Babitzke P.** 2019. Nusg-dependent rna polymerase pausing and tylosin-dependent ribosome stalling are required for tylosin resistance by inducing 23s rna methylation in *bacillus subtilis*. *MBio* **10**.
234. **Barrasa MI, Tercero JA, Jimenez A.** 1997. The aminonucleoside antibiotic A201A is inactivated by a phosphotransferase activity from *Streptomyces capreolus* NRRL 3817, the producing organism. Isolation and molecular characterization of the relevant encoding gene and its DNA flanking regions. *Eur J Biochem* **245**:54–63.
235. **Saugar I, Molloy B, Sanz E, Blanca Sánchez M, Fernández-Lobato M, Jiménez A.** 2017. Characterization of the biosynthetic gene cluster (*ata*) for the A201A aminonucleoside antibiotic from *Saccharothrix mutabilis* subsp. *capreolus*. *J Antibiot (Tokyo)* **70**:404–413.
236. **Palaniappan N, Ayers S, Gupta S, Habib ES, Reynolds KA.** 2006. Production of Hygromycin A Analogs in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 2388 through Identification and Manipulation of the Biosynthetic Gene Cluster. *Chem Biol* **13**:753–764.
237. **ZALACAIN M, CUNDLIFFE E.** 1990. Methylation of 23S ribosomal RNA due to *carB*, an antibiotic-resistance determinant from the carbomycin producer, *Streptomyces thermotolerans*. *Eur J Biochem* **189**:67–72.
238. **Zhong J, Lu Z, Dai J, He W.** 2017. Identification of two regulatory genes involved in carbomycin

- biosynthesis in *Streptomyces thermotolerans*. *Arch Microbiol* **199**:1023–1033.
239. **Liu M, Douthwaite S.** 2002. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *PNAS* **99**:14658–14663.
 240. **Karray F, Darbon E, Oestreicher N, Dominguez H, Tuphile K, Gagnat J, Blondelet-Rouault MH, Gerbaud C, Pernodet JL.** 2007. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology* **153**:4111–4122.
 241. **Olano C, Rodriguez AM, Mendez C, Salas JA.** 1995. A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol Microbiol* **16**:333–343.
 242. **Gust Bertolt, Kieser Tobias, Chater Keith.** PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2) 39.
 243. **Gomez-Escribano JP, Bibb MJ.** 2011. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol* **4**:207–215.
 244. **Zaburanyi N, Rabyk M, Ostash B, Fedorenko V, Luzhetskyy A.** 2014. Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genomics* **15**.
 245. **Raynal A, Karray F, Tuphile K, Darbon-Rongère E, Pernodet JL.** 2006. Excisable cassettes: New tools for functional analysis of *Streptomyces* genomes. *Appl Environ Microbiol* **72**:4839–4844.
 246. **Lee SH, Choe H, Bae KS, Park DS, Nasir A, Kim KM.** 2016. Complete genome of *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *limoneus* KCTC 1717 (=KCCM 11405), a soil bacterium producing validamycin and diverse secondary metabolites. *J Biotechnol* **219**:1–2.
 247. **Pernodet J-L, Fish S, Le`ne M-H, Le`ne Blondelet-Rouault L, Cundliffe E.** 1996. The Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Phenotypes Characterized by Using a Specifically Deleted, Antibiotic-Sensitive Strain of *Streptomyces lividans*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:581–585.
 248. **Gregory MA, Till R, Smith MCM.** 2003. Integration Site for *Streptomyces* Phage ϕ BT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *J Bacteriol* **185**:5320–5323.
 249. **Hong H-J, Hutchings MI, Hill LM, Buttner MJ.** 2005. The Role of the Novel Fem Protein VanK in Vancomycin Resistance in *Streptomyces coelicolor*. *Am Soc Biochem Mol Biol* **280**:13055–13061.
 250. **Page MSB, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ.** 1999. Evidence that the Extracytoplasmic Function Sigma Factor E Is Required for Normal Cell Wall Structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **181**:204–211.
 251. **Larcombe DE, Braes RE, Croxford JT, Wilson JW, Figurski DH, Hoskisson PA.** 2024. Sequence and origin of the *Streptomyces* intergenetic-conjugation helper plasmid pUZ8002. *Access Microbiol* **6**.
 252. **Fernández-Martínez LT, Del Sol R, Evans MC, Fielding S, Herron PR, Chandra G, Dyson PJ.** 2011. A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek*, **99**:515–522.
 253. **Basu A, Yap MNF.** 2016. Ribosome hibernation factor promotes Staphylococcal survival and differentially represses translation. *Nucleic Acids Res* **44**:4881–4893.
 254. **Letunic I, Bork P.** 2024. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res* **52**:W78–W82.
 255. **Katoh K, Misawa K, Kuma K-I, Miyata T.** 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Researcj* **30**:3059–3066.
 256. **Darriba Di, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T.** 2020. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Mol Biol Evol* **37**:291–294.
 257. **Taboada B, Estrada K, Ciria R, Merino E.** 2018. Operon-mapper: A web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics* **34**:4118–4120.
 258. **Millman A, Dar D, Shamir M, Sorek R.** 2017. Computational prediction of regulatory, premature transcription termination in bacteria. *Nucleic Acids Res* **45**:886–893.
 259. **Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A.** 2019. RAXML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* **35**:4453–4455.

260. **Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T.** 2009. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**:1972–1973.
261. **Egorov AA, Atkinson GC.** 2023. uORF4u: a tool for annotation of conserved upstream open reading frames. *Bioinformatics* **39**.
262. **Saha CK, Pires RS, Brolin H, Delannoy M, Atkinson GC.** 2021. FlaGs and webFlaGs: Discovering novel biology through the analysis of gene neighbourhood conservation. *Bioinformatics* **37**:1312–1314.
263. **Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y.** 1989. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* **18**:1072–1074.
264. **Flett F, Mersinias V, Smith CP.** 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* **155**:223–229.
265. 2005. QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit. Instruction Manual.
266. **Qi D, Scholthof KBG.** 2008. A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis. *J Virol Methods* **149**:85–90.
267. **Brodiazhenko T, Johansson MJO, Takada H, Nissan T, Hauryliuk V, Murina V.** 2018. Elimination of Ribosome Inactivating Factors Improves the Efficiency of *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* Cell-Free Translation Systems. *Front Microbiol* **9**.
268. **Koberska M, Vesela L, Novotna M, Mahor D, Mazumdar A, Pindakova N, Petravicius PO, Pokorna J, Kamenik Z, Balikova Novotna G.** 2025. ABCF Protein-Mediated Resistance Shapes Bacterial Responses to antibiotics Based on Their Type and Concentration.
269. **Veselá L.** 2015. Influence of expression of *lmr(C)* on the biosynthesis of lincomycin in *Streptomyces lincolnensis*: Resistance or production?
270. **Kamiura R, Toya Y, Matsuda F, Shimizu H.** 2019. Theophylline-inducible riboswitch accurately regulates protein expression at low level in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **41**:743–751.
271. **Reese MG.** 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry*.
272. **Tong Y, Charusanti P, Zhang L, Weber T, Lee SY.** 2015. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synth Biol* **4**:1020–1029.
273. **Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF.** PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *PNAS* **100**:1541–1546.
274. **Yoo JS, Oh GS, Ryoo S, Roe JH.** 2016. Induction of a stable sigma factor SigR by translation-inhibiting antibiotics confers resistance to antibiotics. *Sci Rep* **6**.
275. **Lee JH, Yoo JS, Kim Y, Kim JS, Lee EJ, Roe JH.** 2020. The WBLC/WHIB7 transcription factor controls intrinsic resistance to translation-targeting antibiotics by altering ribosome composition. *MBio* **11**.
276. **Mukai K, Shibayama T, Imai Y, Hosaka T.** 2023. Phenomenological interpretations of the mechanism for the concentration-dependent positive effect of antibiotic lincomycin on *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Environ Microbiol* **89**.
277. **Traag BA, Seghezzi N, Vijgenboom E, Van Wezel GP.** 2007. Characterization of the sporulation control protein SsgA by use of an efficient method to create and screen random mutant libraries in streptomycetes. *Appl Environ Microbiol* **73**:2085–2092.
278. **Takada H, Sugimoto R, Oshima T.** 2025. Prokaryotic ABCF proteins in overcoming ribosomal stalling: mechanisms, evolution, and perspective for applications in Bio-manufacturing. *Biosci Biotechnol Biochem* **0**:1–8.
279. **Meng S, Wu H, Wang L, Zhang B, Bai L.** 2017. Enhancement of antibiotic productions by engineered nitrate utilization in actinomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**:5341–5352.
280. **Lee EJ, Karoonuthaisiri N, Kim HS, Park JH, Cha CJ, Kao CM, Roe JH.** 2005. A master regulator σ_B governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **57**:1252–1264.

281. **Hartley AJ, De Mattos-Shipley K, Collins CM, Kilaru S, Foster GD, Bailey AM.** 2009. Investigating pleuromutilin-producing *Clitopilus* species and related basidiomycetes. *FEMS Microbiol Lett* **297**:24–30.
282. **Maimone NM, de Oliveira LFP, Santos SN, de Lira SP.** 2021. Elicitation of *Streptomyces lunalinharesii* secondary metabolism through co-cultivation with *Rhizoctonia solani*. *Microbiol Res* **251**.
283. **Nicault M, Zaiter A, Dumarcay S, Chaimbault P, Gelhaye E, Leblond P, Bontemps C.** 2021. Elicitation of antimicrobial active compounds by streptomyces-fungus co-cultures. *Microorganisms* **9**:1–13.
284. **Pérez J, Munoz-Dorado J, Brana AF, Shimkets LJ, Sevillano L, Santamaría RI.** 2011. *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb Biotechnol* **4**:175–183.
285. **Lee N, Kim W, Chung J, Lee Y, Cho S, Jang KS, Kim SC, Palsson B, Cho BK.** 2020. Iron competition triggers antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* during coculture with *Myxococcus xanthus*. *ISME J* **14**:1111–1124.
286. **Wang G, Izawa M, Yang X, Xu D, Tanaka Y, Ochi K.** 2017. Identification of a novel lincomycin resistance mutation associated with activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antimicrob Agents Chemother* **61**.

9. Přílohy

Seznam publikací:

- Markéta Koběřská⁺, Ludmila Veselá⁺, Vladimír Vimberg, Jakub Lenart, Jana Veselá, Zdeněk Kameník, Jiří Janata, Gabriela Balíková Novotná; 2021. Beyond Self-Resistance: ABCF ATPase LmrC Is a Signal-Transducing Component of an Antibiotic-Driven Signaling Cascade Accelerating the Onset of Lincomycin Biosynthesis. *mBio*, 12(5).

Podíl na výsledcích:

- Příprava bakteriálních kmenů a konstruktů
- Charakterizace LmrC (rezistenční profil, produkce LIN, růstové testy)
- Charakterizace ATPáz deficientních variant LmrC
- Analýza produkce LmrC

- Markéta Koběřská⁺, Ludmila Veselá⁺, Michaela Novotná, Durga Mahor, Aninda Mazumdar, Nikola Pindřáková, Pamela Omena Petravicius, Julie Pokorná, Zdeněk Kameník, Gabriela Balíková Novotná; 2025. ABCF Protein-Mediated Resistance Shapes Bacterial Responses to Antibiotic Based on Their Type and Concentration. *BioRxiv*.

Podíl na výsledcích:

- Příprava bakteriálních kmenů a konstruktů
- Charakterizace TiaA (rezistenční profil, produkce aktinorodinu, společná kultivace s *C. passeckerianus*)
- Bioinformatické analýzy
- Příprava první verze rukopisu

⁺ Sdílené prvoautorství