

# UNIVERZITA KARLOVA

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organizmů



**Michaela Helusová**

Mechanismus účinku a rezistence na daptomycin

Mode of daptomycin action and mechanism of resistance

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Gabriela Seydlová, PhD.

Praha, 2018



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2018

.....

Michaela Helusová

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Gabriele Seydlové, PhD. za pomoc, trpělivost, cenné rady a hlavně za čas, který mi při přípravě práce věnovala. Dále děkuji všem ostatním za rady a podporu.

## Abstrakt

Daptomycin patří mezi antimikrobiální peptidy, což jsou látky vyskytující se v obranném systému všech organismů. Molekula daptomycinu se skládá z cyklického peptidu a lipidové části. Daptomycin je produkován bakterií *Streptomyces roseosporus* a používá se k léčbě infekcí způsobených gram-pozitivními bakteriemi. Je účinný i proti některým multirezistentním kmenům bakterií jako je např. kmen *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu. Jeho antimikrobiální účinek je závislý na přítomnosti vápníku a fosfatidylglycerolu v cílové membráně, ve které tvoří oligomery. Jeho mechanismus účinku tedy pravděpodobně tkví ve tvorbě pórů, které způsobují narušení membrány. Poškození membrány vede k výtoku iontů z buňky a tím k depolarizaci membránového potenciálu, což v důsledku způsobuje zastavení syntézy makromolekul a smrt buňky. Expozice daptomycinu také způsobuje změnu morfologie buněk. I přes neobvyklý mechanismus účinku byly na působení daptomycinu vytvořeny různé mechanismy rezistence u různých patogenních bakterií. Patří mezi ně např. snížení obsahu fosfatidylglycerolu v membráně, zvýšení podílu lysylfosfatidylglycerolu, uvolňování membránových lipidů nebo mutace v genech ovlivňujících syntézu peptidoglykanu.

Klíčová slova: daptomycin, mechanismus účinku, mechanismus rezistence, cytoplazmatická membrána, zásahové místo, kalcium dependentní antibiotika, membránový potenciál



## Abstract

Daptomycin is one of antimicrobial peptides. These molecules are part of immune system of all organisms. Daptomycin consists of a cyclic peptide core and a lipophilic tail. Daptomycin is produced by *Streptomyces roseosporus* and is used to treat serious gram-positive infections. Daptomycin is active also against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Its antimicrobial effect depends on the presence of calcium ions and phosphatidylglycerol. Daptomycin targets bacterial cytoplasmic membrane, where it forms oligomers. Mode of action of daptomycin probably includes pore-forming effect leading to membrane damage. This disturbance causes ion efflux from cytoplasm which leads to membrane potential disruption, which results in inhibition of macromolecular synthesis and cell death. Daptomycin also causes changes in cell morphology. Despite its unusual mode of action, several mechanisms of resistance have emerged in some pathogenic strains. These are for example decrease in the amount of phosphatidylglycerol in the membrane, increase in the amount of lysylphosphatidylglycerol, release of membrane phospholipids or mutations in genes which control peptidoglycan synthesis.

Key words: daptomycin, mode of action, mechanism of resistance, cytoplasmic membrane, membrane-targeting antibiotics, calcium-dependent antibiotics, membrane potential



# Obsah

1	Úvod.....	11
2	Historie objevu daptomycinu .....	12
3	Struktura a vlastnosti daptomycinu .....	12
3.1	Chemická struktura daptomycinu .....	12
3.2	Struktura apodaptomycinu.....	13
3.3	Struktura daptomycinu s navázaným vápníkem .....	14
3.4	Vliv primární struktury na aktivitu daptomycinu .....	15
3.4.1	Přítomnost n-dekanoylu .....	16
3.4.2	Vazba vápenatého iontu .....	16
3.4.3	Záměny aminokyselin .....	17
4	Přítomnost vápníku a jeho vazba .....	20
5	Mechanismus účinku.....	21
5.1	Interakce s membránou.....	21
5.1.1	Vliv složení cílové membrány na navázání daptomycinu .....	21
5.1.1.1	Přítomnost fosfatidylglycerolu .....	22
5.1.2	Vazba daptomycinu na membránu .....	22
5.1.3	Oligomerizace daptomycinu .....	23
5.1.3.1	Tvorba micel v roztoku .....	23
5.1.3.2	Oligomerizace daptomycinu v membráně .....	23
5.2	Účinek daptomycinu na bakteriální buňku .....	25
5.2.1	Tvorba pórů .....	25
5.2.2	Depolarizace membrány .....	26
5.2.3	Inhibice syntézy makromolekul .....	27
5.2.4	Inhibice syntézy buněčné stěny .....	27
5.2.5	Další účinky daptomycinu na membránu .....	28
5.2.5.1	Vliv na fluiditu membrán .....	28
5.2.5.2	Vychlípění membrány .....	28
5.2.6	Vliv na morfologii buněk .....	29
6	Mechanismy rezistence .....	31
6.1	Redukce syntézy fosfatidylglycerolu, produkce lysylfosfatidylglycerolu .....	31
6.2	Nadměrná exprese dlt operonu .....	32
6.3	Mutace v operonu yycFG .....	33
6.4	Aktivace regulátoru LiaRS .....	34
6.5	Uvolňování membránových fosfolipidů .....	35
7	Závěr.....	37
8	Seznam použité literatury .....	38

## Seznam použitých zkratek

AIP	Auto indukční protein	Auto inducing protein
ATP	Adenosintrifosfát	Adenosine triphosphate
CL	Kardiolipin	Cardiolipin
CMC	Kritická micelární koncentrace	Critical micelle concentration
Dap-R	Kmen rezistentní k daptomycinu	Daptomycin resistant strain
Dap-S	Kmen citlivý na daptomycin	Daptomycin susceptible strain
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMPG	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosforylglycerol	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPG	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoglycerol	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
GFP	Zelený fluorescenční protein	Green fluorescent protein
GP-DGDAG	Glycerolfosfo-diglykodiacylglycerol	Glycerolphospho-diglycodiacylglycerol
LD <sub>50</sub>	Střední smrtelná dávka	Median lethal dose
LPG	Lysylfosfatidylglycerol	Lysylphosphatidylglycerol
MeGlu	2S,3R-metylglutamová kyselina	2S,3R-methylglutamic acid
MIC	Minimální inhibiční koncentrace	Minimal inhibitory concentration
MRSA	Kmen <i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k meticilinu	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PC	Fosfatidylcholin	Phosphatidylcholine
PE	Fosfatidylethanolamin	Phosphatidylethanolamine
PG	Fosfatidylglycerol	Phosphatidylglycerol
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfoglycerol	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
PSM	Moduliny rozpustné ve fenolu	Phenol soluble modulins
WHO	Světová zdravotnická organizace	World Health Organisation

# 1 Úvod

Přemírou a nesprávným užíváním antibiotik si více a více patogenních bakterií získává rezistenci na běžně užívaná antibiotika, proto roste potřeba vývoje nových typů antibiotik. Nový směr ve výzkumu a používání antibiotik přinesl před necelými padesáti lety objev antibiotik cílících na membránu. Antibiotika cílící na membránu by mohla být budoucností pro léčbu bakteriálních onemocnění. Na jejich neobvyklý mechanismus účinku si bakterie hůře vytvářejí rezistenci, protože jako odpověď často musí kompletně přestavit celou membránu, což je pro ně nevýhodné a komplikované, jelikož se v membráně vyskytují systémy s životně důležitými funkcemi.

Daptomycin patří do skupiny tzv. antimikrobiálních peptidů. Tyto peptidy jsou produkovány nejen mikroorganismy, ale i organismy rostlinné a živočišné říše. Antimikrobiální peptidy nevykazují pouze baktericidní účinek, dokáží hubit i viry nebo houbové a další parazity. Zájem o tyto látky stoupá, jelikož jsou nadějí pro vývoj nových antimikrobiálních látek.

Daptomycin (komerčně distribuovaný pod názvem Cubicin) byl v roce 2003 schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro léčbu kožních infekcí způsobených gram-pozitivními bakteriemi (Eisenstein *et al.*, 2010). Byl také prvním schváleným antibiotikem cílícím na bakteriální membránu. O tři roky později byl schválen i pro léčbu pravostranné endokarditidy způsobené bakterií *Staphylococcus aureus* (příbalová informace Cubicinu, 2015, Merck a CO., INC (USA)). Daptomycin je často používán proti bakteriálním nákazám jako tzv. antibiotikum „poslední volby“.

Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky o daptomycinu, jako je jeho chemické složení, mechanismus účinku a mechanismus rezistence.

## 2 Historie objevu daptomycinu

Daptomycin byl objeven v roce 1987, kdy byla z bakterie *Streptomyces roseosporus* izolována rodina lipopeptidových antibiotik nazvaná A21978C. Tato rodina je tvořena skupinou lipopeptidů, které mají stejný peptidový základ, liší se však postranním acylovým řetězcem (Debono *et al.*, 1987). O rok později Boeck a kolektiv (Boeck *et al.*, 1988) izolovali z druhu *Actinoplanes utahensis* deacylázu, která dokáže acylový řetězec odštěpit. Pomocí tohoto enzymu byl z komplexu A21978C odštěpen acylový řetězec, aby tak zůstala pouze peptidová část. Na tento peptid byly postupně připojovány různě dlouhé acylové řetězce, které byly kdy u různých analogů identifikovány, a byla testována jejich antimikrobiální aktivita proti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Streptococcus faecalis* a také jejich akutní toxicita na myších. Nejlepší výsledky v těchto testech měl analog s pracovním názvem LY146032, který obsahoval n-dekanoyl. Tento analog vykazoval u obou bakterií rodu *Staphylococcus* minimální inhibiční koncentraci (minimal inhibitory concentration, MIC) 0,5 µg/ml a u *S. faecalis* MIC činila 16 µg/ml. U testu akutní toxicity měl nejnižší smrtelnou dávku pro polovinu myši (median lethal dose, LD<sub>50</sub>) rovnu 600 mg/kg při intravenózním podání. Tento analog byl vybrán pro další testování a byl pojmenován daptomycin (Debono *et al.*, 1988).

## 3 Struktura a vlastnosti daptomycinu

### 3.1 Chemická struktura daptomycinu

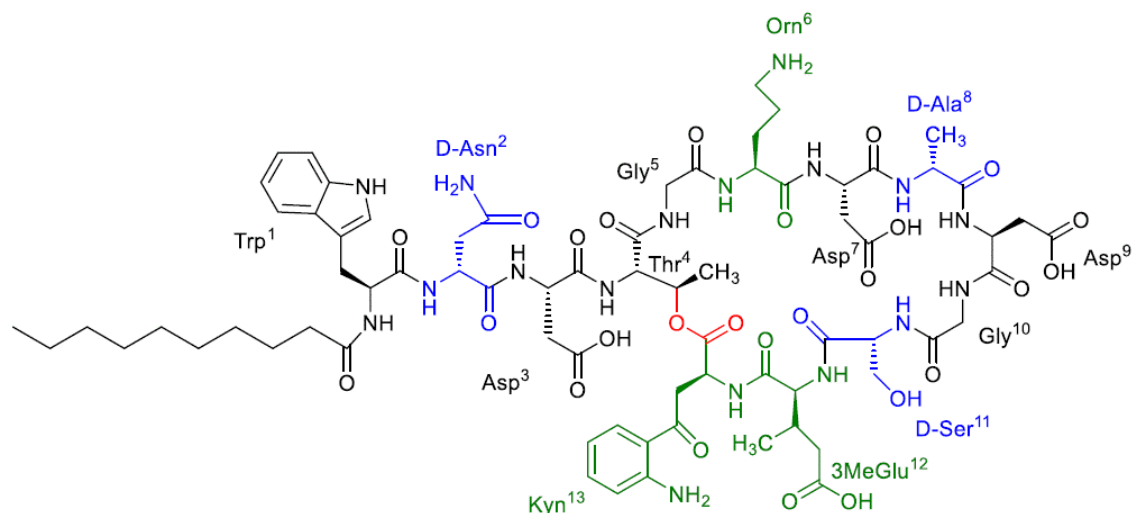
Daptomycin patří mezi lipopeptidová antibiotika. Je tvořen z peptidové části, která je společná pro celou rodinu antibiotik A21978C, a ze zbytku mastné kyseliny.

Peptidová část se skládá ze třinácti aminokyselin, z nichž deset tvoří kruh a zbývající tři tvoří postranní řetězec (Obrázek1). V cyklu se vyskytuje pět neproteinogenních aminokyselin: D-alanin, D-serin, kynurenin, ornitin a 2S,3R-metylglutamová kyselina (MeGlu), a dále pět proteinogenních, mezi něž patří threonin, dva glyciny a dvě kyseliny asparagové. Kruhová struktura je uzavřena pomocí esterové vazby mezi karboxylovou skupinou kynureninu a hydroxylovou skupinou threoninu, která je klíčová pro antimikrobiální aktivitu daptomycinu (Debono *et al.*, 1987). Tříčlenný postranní řetězec je tvořen tryptofanem, asparaginem a kyselinou asparagovou. Debono a kolektiv (Debono *et al.*, 1987) se domnívali, že daptomycin

obsahuje pouze dva D-enantiomery aminokyselin: D-alanin a D-serin, Miao však tuto domněnku po téměř 20 letech vyvrátila. Se svými spolupracovníky zjistila, že asparagin na druhé pozici je také D-enantiomer (Miao *et al.*, 2005).

Lipidickou část daptomycinu tvoří zbytek kyseliny dekanové (Debono *et al.*, 1987), jak již bylo zmíněno dříve (viz kapitola 0), který je připojen na Trp.

Daptomycin má ve fyziologickém pH náboj -3, jelikož obsahuje čtyři aminokyseliny se záporně nabitým postranním řetězcem (tři Asp a MeGlu) a jednu aminokyselinu nesoucí kladný náboj (Orn) (Chen *et al.*, 2014).



Obrázek 1 Struktura daptomycinu; Zeleně jsou znázorněny neobvyklé aminokyseliny jako je kynurenin, 2S,3R-metylglutamová kyselina a ornitin. Modře jsou vyznačeny D-enantiomery aminokyselin. Červená barva zvýrazňuje esterovou vazbu mezi threoninem a kynureninem. Černě jsou označeny L-enantiomery aminokyselin a n-dekanoyl. Převzato z Taylor a Palmer 2016.

### 3.2 Struktura apodaptomycinu

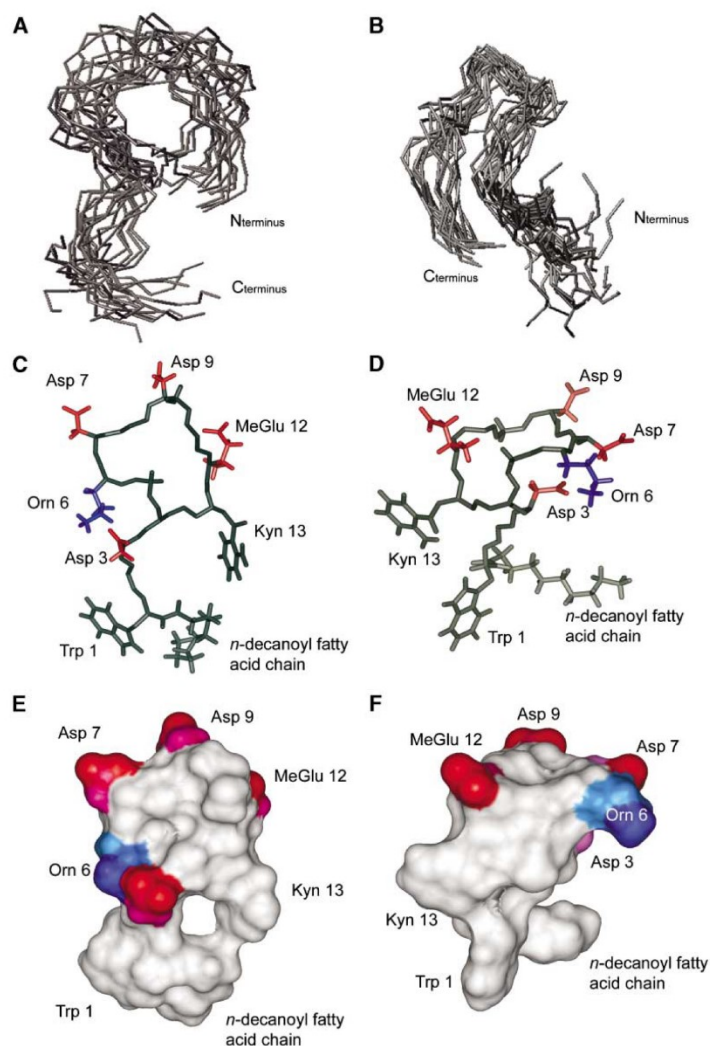
Daptomycin patří mezi kalcium-dependentní antibiotika, což znamená, že pro svou aktivitu potřebuje vápenaté ionty (více viz kapitola 4). Jako apodaptomycin je označována molekula daptomycinu, která nemá navázaný vápník. Názory na sekundární strukturu apodaptomycinu se liší.

Rotondi a Gierash (Rotondi a Gierasch, 2005) popisují strukturu jako zakřivenou  $\beta$ -vlásečku, která na jednom konci obsahuje hydrofobní shluk tryptofanu, kynureninu a dekanoylu, a na druhém konci polární aminokyseliny. Toto uspořádání stojí za amfipatickou

povahou molekuly. Mezi Asp9 a D-Ala8 je vytvořena  $\beta$ -smyčka typu II (Rotondi a Gierasch, 2005). Oproti tomu Jung a jeho spolupracovníci (Jung *et al.*, 2004) nenašli žádnou preferovanou strukturu apodaptomycinu. Došli ale k závěru, že páteř peptidu je ohnuta na Asp7 a Asp9 a v místě Gly5 je variabilní. Tato variabilita poskytuje konformační volnost pro Asp3 (více v následující kapitole 3.3.). Dále je v práci Ball *et al.* (2004) popisována struktura apodaptomycinu jako rozvolněná s ohyby u D-Ala8 a Gly10/Ser11, aminoskupiny tvořící páteř peptidu směřují dovnitř kruhu, zatímco postranní řetězce z kruhu vyčnívají a jsou vystaveny rozpouštědлу. Dekanoyl vykazuje vysokou míru flexibility (Ball *et al.*, 2004).

### 3.3 Struktura daptomycinu s navázaným vápníkem

Při navázání vápníku dojde k orientaci postranního řetězce Asp3 směrem do středu kruhu. Pro tuto orientaci je důležitá konformační variabilita Gly5, která poskytuje konformační volnost pro pohyb Asp3. Změna polohy Asp3 naznačuje, že tento řetězec může být zapojen do koordinace vápenatého iontu (Jung *et al.*, 2004). Navázáním vápníku se k sobě přiblíží postranní řetězce Kyn a Trp. Také dochází k sedlovitému ohnutí molekuly tak, že se vzájemně přiblíží postranní řetězce Asp7, Asp9, MeGlu a Orn (Obrázek 2). Změny ve struktuře daptomycinu po navázání vápníku vedou k vystavení větší plochy hydrofobní části molekuly rozpouštědлу (Jung *et al.*, 2004). Tyto změny struktury ale nejsou výrazné, proto se tyto autoři (Jung *et al.*, 2004; Rotondi a Gierasch, 2005; Ho *et al.*, 2008) shodují, že rozdíly struktur daptomycinu s navázaným vápníkem a bez vápníku jsou minoritní. Ball (Ball *et al.*, 2004) se sice s ostatními rozchází v názoru na vazbu vápníku (viz kapitola 3.4.2), nicméně jako dříve zmínění autoři se přiklání k názoru, že vazba vápníku nezpůsobuje významné změny ve struktuře peptidu.



Obrázek 2 Struktura apodaptomycinu a daptomycinu s navázaným vápníkem; V levém sloupci se vyskytují struktury apodaptomycinu, vpravo struktury daptomycinu s navázaným vápníkem. A: Znázornění souboru 15 možných struktur pro apodaptomycin, B: soubor 17 možných struktur pro daptomycin s navázaným vápníkem. C, D: Modely obou struktur, které se nejvíce blíží průměrné struktuře. Negativní náboje jsou označeny červeně, pozitivní modře. E, F: Trojrozměrný model zobrazuje povrch a rozložení nábojů v molekule. Červeně opět negativní náboje a modře pozitivní. Převzato z Jung *et al.*, 2004.

### 3.4 Vliv primární struktury na aktivitu daptomycinu

Jak již bylo zmíněno dříve (kapitola 3.1), daptomycin je tvořen peptidem skládajícím se ze třinácti aminokyselin a zbytkem kyseliny dekanové. Jak moc jsou primární struktura aminokyselin a přítomnost zbytku mastné kyseliny důležité pro aktivitu tohoto antibiotika, se

pokusilo vysvětlit několik studií pomocí záměny mastné kyseliny nebo jednotlivých aminokyselin.

### 3.4.1 Přítomnost n-dekanoylu

Zbytek kyseliny dekanové je esenciální pro aktivitu daptomycinu. Již v první práci týkající se daptomycinu (Debono *et al.*, 1987) se píše, že odstranění mastné kyseliny způsobilo ztrátu antimikrobiální aktivity. Daptomycin obsahující zbytek kyseliny dekanové měl velmi dobré výsledky v antimikrobiální aktivitě, kde dosáhl MIC 0,5 µg/ml u bakterií rodu *Staphylococcus*, což byla hodnota 2krát až 32krát menší než u ostatních analogů daptomycinu lišících se délkou alifatického řetězce. Pouze undekanoyl- a tridekanoyldaptomycin vykazovaly MIC menší než 0,5 µg/ml proti bakteriím rodu *Staphylococcus*. MIC daptomycinu se zbytkem kyseliny dekanové proti *S. faecalis* činila 16 µg/ml, což je hodnota relativně vyšší, ale tento analog daptomycinu měl nejlepší výsledek v testu akutní toxicity, kdy měl LD<sub>50</sub> rovnu 600 mg/kg při intravenózním podání. Analogy obsahující undekanoyl nebo dodekanoyl způsobovaly 90 – 100% úmrtnost pokusných zvířat (Debono *et al.*, 1988). Se zvyšujícím se počtem uhlíků mastné kyseliny rostla i *in vitro* schopnost analogů poškozovat membrány, která byla měřena pomocí změny ve vodivosti modelové membrány po účinku daptomycinu. Nejničivější efekt měl tridekanoyldaptomycin, který při koncentraci 5 µg/ml zvýšil vodivost 100krát, daptomycin s n-dekanoylem dosáhl stejného zvýšení vodivosti až při koncentraci 45 µg/ml (Lakey a Lea, 1986). Analogy daptomycinu se zbytky mastných kyselin, které byly delší než 11 uhlíků, měly lepší antimikrobiální účinek, ale zároveň vykazovaly větší toxicitu. Daptomycin se zbytkem kyseliny dekanové sice nevykazuje nejlepší antimikrobiální aktivitu, ale dosáhl nejnižší toxicity.

### 3.4.2 Vazba vápenatého iontu

Které aminokyseliny se zapojují do vazby vápníku, ještě není zcela potvrzeno. Bunkóczi (Bunkóczi *et al.*, 2005) porovnává strukturu daptomycinu s dalším kalcium-dependentním antibiotikem tsushimycinem izolovaným z rodu *Streptomyces* z kmene Z-237 (Shoji *et al.*, 1968). Tsushimycin je tvořen 11 aminokyselinami, z nichž 10 tvoří kruh a zbývající jedna aminokyselina je mimo kruh a váže delta-3-isotetradecenovou kyselinu. U tsushimycinu váží

vápník Asp1 a Asp5. Bunkóczi se tudíž domnívá, že u daptomycinu to bude obdobné a vápník budou vázat Asp3 a Asp7 (Bunkóczi *et al.*, 2005).

U daptomycinu způsobuje záměna Asp7 nebo Asp9 v kruhu za Asn ztrátu aktivity antibiotika (viz Tabulka 1). Na základě těchto výsledků autoři předpokládají, že pro navázání vápenatého iontu a pro aktivitu antibiotika jsou Asp7 a Asp9 esenciální (Grünewald *et al.*, 2004). Ke stejnému výsledku došel i Kopp a kolektiv. Záměna Asp7 a Asp9 za jiné aminokyseliny vedla ke ztrátě antimikrobiální aktivity daptomycinu (Kopp *et al.*, 2006). Toto zjištění ukazuje, že tyto dvě aminokyseliny jsou klíčové pro vazbu daptomycinu. Na vazbu vápníku mohou mít vliv také Trp a Kyn, jelikož přítomnost vápníku způsobila posunutí zbytků těchto aminokyselin v porovnání s apodaptomycinem (Ho *et al.*, 2008).

Na vazbu vápníku má však jiný názor práce Ball *et al.* (2004), podle které nejsou kyselé zbytky všech Asp a MeGlu dostatečně blízko sebe, aby umožnily vazbu s vápníkem. Autoři se domnívají, že je vápník vázán pomocí elektrostatických sil.

### 3.4.3 Záměny aminokyselin

Závislost aminokyselinového složení na aktivitě daptomycinu byla testována pomocí záměny jednotlivých aminokyselin. Tyto záměny jsou shrnuty v

Některé záměny jednotlivých aminokyselin jako např. záměna původního D-Ala za D-Ser, záměna D-Ser za D-Asn nebo D-Ala měly na baktericidní aktivitu malý vliv: zvýšily MIC proti *S. aureus* z 0,5 µg/ml na 1 µg/ml (Nguyen *et al.*, 2006). Naproti tomu některé záměny v jedné aminokyselině byly doprovázeny rapidní změnou MIC a tím pádem snížením antimikrobiálního účinku daptomycinu. Sem patří například záměna Thr za Ser na čtvrté pozici, jež zvýšila MIC proti *S. aureus* 65krát (Lohani *et al.*, 2015a).

Záměnu MeGlu za Glu testovaly hned dvě studie, každá si ale za model vybrala jinou bakterii. Analog daptomycinu s Glu místo MeGlu vykazoval zvýšení MIC proti *S. aureus* na 8 µg/ml (Nguyen *et al.*, 2010) a zvýšení MIC proti *B. subtilis* na 20 µg/ml (Grünewald *et al.*, 2004). V práci Nguyen *et al.* (2010) byl použit analog daptomycinu, který měl na Trp připojený zbytek kyseliny undekanové, namísto původní dekanové. I přes tento drobný rozdíl se oba autoři shodují, že metylová skupina MeGlu je pro antimikrobiální aktivitu daptomycinu důležitá.

Nahrazení původního D-Ala za Asn zvýšilo MIC proti *S. aureus* 16krát (Nguyen *et al.*, 2006). Při záměně Trp za Asn došlo ke snížení baktericidní aktivity proti *S. aureus* 8krát (He *et al.*, 2012). Záměna Kyn za Trp měla na antimikrobiální aktivitu daptomycinu proti *S. aureus* malý vliv, snížila ji pouze dvojnásobně, ale záměna Kyn za Ile nebo Ala zvýšila MIC proti *S. aureus* 8krát (Nguyen *et al.*, 2010). Záměna Kyn za Trp však zvýšila MIC proti *B. subtilis* na 20 µg/ml (Grünewald *et al.*, 2004). Ale je opět nutné uvažovat rozdíl ve zbytcích mastných kyselin ve výše zmiňovaných pracích, který antimikrobiální aktivitu může ovlivnit.

Na antimikrobiální aktivitu má vliv také chiralita aminokyselin. Například záměna izomeru 2S,3R-MeGlu za 2S,3S-MeGlu zvýšila MIC proti *S. aureus* 80krát (Lohani *et al.*, 2015b). Záměna L-Trp za D-Trp způsobila osminásobné snížení antimikrobiální aktivity proti *S. aureus* (He *et al.*, 2012).

Výměna Kyn za Tyr a zároveň MeGlu za Glu zvýšila MIC proti *S. aureus* 6krát (Lohani *et al.*, 2015b). Řádové snížení antimikrobiální aktivity proti *B. subtilis* způsobila změna původních D-Ser a MeGlu za D-Asp a Glu, kde MIC byla 320 µg/ml (Grünewald *et al.*, 2004). Záměna Asp7 a Asp9 za Asn antimikrobiální aktivitu daptomycinu úplně zrušila (Grünewald *et al.*, 2004).

Velkou změnu v antimikrobiální aktivitě přinesla také změna esterové vazby za amidovou. Tato záměna způsobila nárůst MIC daptomycinu proti *S. aureus* 200krát (Hart *et al.*, 2014).

Tabulka 1 Vliv změny aminokyseliny na aktivitu daptomycinu

Původní aminokyselina	Změna	MIC (µg/ml)	Bakterie	Zdroj
D-Ala	D-Asn	8 <sup>c</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>a</sup>	(Nguyen <i>et al.</i> , 2006)
	D-Ser	1 <sup>c</sup>		
D-Ala	D-Asn	128 <sup>c</sup>		
MeGlu	Glu			
Kyn	L-Trp	1 <sup>c</sup>	<i>S. aureus</i>	(Nguyen <i>et al.</i> , 2010)
	Ile	4 <sup>c</sup>		
	Val	4 <sup>c</sup>		
	L-Trp	20	<i>B. subtilis</i> <sup>b</sup>	(Grünewald <i>et al.</i> , 2004)
Kyn	Tyr	3	<i>S. aureus</i>	(Lohani <i>et al.</i> , 2015b)
MeGlu	Glu			
MeGlu	Glu	8 <sup>c</sup>	<i>S. aureus</i>	(Nguyen <i>et al.</i> , 2010)
	Glu	20	<i>B. subtilis</i>	(Grünewald <i>et al.</i> , 2004)
2S,3RMeGlu	2S,3S MeGlu	>40	<i>S. aureus</i>	(Lohani <i>et al.</i> , 2015b)
D-Ser	D-Asn	1 <sup>c</sup>	<i>S. aureus</i>	(Nguyen <i>et al.</i> , 2006)
	D-Ala	1 <sup>c</sup>		
D-Ser	D-Asn	32 <sup>c</sup>		
MeGlu	Glu			
D-Ser	D-Asp	>320	<i>B. subtilis</i>	Grünewald <i>et al.</i> , 2004)
MeGlu	Glu			
L-Trp	D-Trp	4	<i>S. aureus</i>	(He <i>et al.</i> , 2012)
	Asn	4		
Thr	Ser	32,5	<i>S. aureus</i>	(Lohani <i>et al.</i> , 2015a)
Asp7	Asn	>960	<i>B. subtilis</i>	Grünewald <i>et al.</i> , 2004)
MeGlu	Glu			
Asp9	Asn	>960		
MeGlu	Glu			

<sup>a</sup> MIC proti *S. aureus* činí 0,5 µg/ml (Nguyen *et al.*, 2010).

<sup>b</sup> MIC proti *B. subtilis* činí 1 µg/ml (Hachmann *et al.*, 2009) – 3 µg/ml (Grünewald *et al.*, 2004).

<sup>c</sup> Testy probíhaly s analogy daptomycinu, které měly místo n-dekanoylu zbytek kyseliny undekanové.

## 4 Přítomnost vápníku a jeho vazba

Přítomnost vápníku je klíčová pro antimikrobiální aktivitu daptomycinu. Již v 80. letech 20. století bylo experimentálně dokázáno, že se zvyšující se koncentrací vápníku rostla i vodivost modelové membrány, která byla následkem poškození membrány daptomycinem (Lakey a Lea, 1986). Ionty vápníku způsobují konformační změnu, která zvyšuje amfipatickou povahu molekuly, a také neutralizují záporný náboj daptomycinu, aby mohlo dojít k vazbě na membrány obsahující kyselé fosfolipidy (Jung *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2008). Vápenaté ionty ovlivňují oligomerizaci v membráně (viz kapitola 5.1.3) a také tvorbu micel, pro kterou je potřeba ekvimolární množství daptomycinu a vápenatých iontů (Ho *et al.*, 2008). Kritická micelární koncentrace (critical micelle concentration, CMC) daptomycinu je 0,8  $\mu\text{M}$  (20mM HEPES pufr, pH 7,5) (Zhang *et al.*, 2017).

Ohledně vazby vápníku a oligomerizace daptomycinu v membráně panují neshody. Taylor a kolektiv (Taylor *et al.*, 2016) se domnívají, že jedna molekula daptomycinu váže dva ionty vápníku. K navázání daptomycinu na membránu je potřeba jednoho iontu vápníku na jednu molekulu lipopeptidu, druhý iont vápníku způsobí propojení mezi monomery v membráně a vytvoření funkčního oligomeru (Taylor *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2016a). Toto tvrzení bylo o rok později potvrzeno: pro vazbu na membránu a oligomerizaci je potřeba dvou iontů vápníku na jednu molekulu daptomycinu (Zhang *et al.*, 2017). Naproti tomu se Lee se svými spolupracovníky (Lee *et al.*, 2017) na základě svých měření domnívají, že poměr vápníku ku daptomycinu je 3:2.

Daptomycin se dokáže vázat na membrány i bez přítomnosti vápníku, ale jen za vysoké koncentrace (50  $\mu\text{M}$ ), přidaný vápník snížil koncentraci daptomycinu potřebnou pro vazbu na membránu na 1  $\mu\text{M}$  (0,16  $\mu\text{g/ml}$ ) (Chen *et al.*, 2014). Nepřítomnost vápníku způsobuje snížení antimikrobiální aktivity (zvýšení MIC). Na médiu bez vápníku byla MIC daptomycinu u rodů *Streptococcus* a *Staphylococcus* 32krát vyšší než u média, kde byl vápník v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  (Eliopoulos *et al.*, 1986). U *S. aureus* byla MIC v nepřítomnosti vápníku vyšší než 64  $\mu\text{g/ml}$ , v rostoucí koncentraci vápníku (0,34 – 5 mM) klesala MIC na 2 – 0,625  $\mu\text{g/ml}$  (Jung *et al.*, 2004).

Několik výzkumných týmů se zaměřilo na aktivitu daptomycinu v přítomnosti jiných bivalentních iontů. Když byl použit  $\text{Mn}^{2+}$  místo  $\text{Ca}^{2+}$ , došlo ke zvýšení MIC daptomycinu proti *S. aureus* 32krát. Další bivalentní ionty jako např.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  nebo  $\text{Ni}^{2+}$  zvýšily MIC 64krát.

Všechny ionty byly v koncentraci 2 mM (Ho *et al.*, 2008). Hořečnaté ionty při poměru 1:1 s daptomycinem nezpůsobily žádnou změnu struktury. Ale aby bylo dosaženo stejné míry tvorby micel v roztoku jako u vápníku (1:1 s daptomycinem), musela být koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů 2,5krát vyšší než koncentrace daptomycinu (Ho *et al.*, 2008).

## 5 Mechanismus účinku

### 5.1 Interakce s membránou

Nepříliš dlouhou dobu po objevu daptomycinu se zjistilo, že zásahovým místem daptomycinu je bakteriální membrána. Již v roce 1987 si Allen a jeho kolegové (Allen *et al.*, 1987) všimli, že toto antibiotikum v přítomnosti vápníku rušilo integritu membrány, čímž docházelo k úniku intracelulárního draslíku. V návaznosti na to bylo zjištěno, že daptomycin nevstupuje do cytoplasmy buněk, ale že se v přítomnosti vápníku váže na celé buňky a poté je možno jej izolovat z buněčné stěny a z membránové frakce (Canepari *et al.*, 1990).

Interakce s membránou má dvě fáze: navázání a oligomerizaci, přičemž každá fáze vyžaduje vazbu jednoho iontu vápníku (Zhang *et al.*, 2017). V následujících kapitolách (5.2.1. – 5.2.3.) jsou obě podrobně probrány.

#### 5.1.1 Vliv složení cílové membrány na navázání daptomycinu

Gram-pozitivní a gram-negativní bakterie se liší složením a strukturou buněčné stěny. Pro vazbu daptomycinu je důležité složení fosfolipidů v cytoplazmatické membráně, kterým se gram-pozitivní a gram-negativní bakterie také odlišují.

V membráně modelové gram-negativní bakterie *Escherichia coli* převažuje z 80 % fosfatidyletanolamin (phosphatidylethanolamine, PE), dále se v membráně vyskytuje s 15% podílem fosfatidylglycerol (phosphatidylglycerol, PG) a 5% podílem kardiolipin (cardiolipin, CL) (Epanand a Epanand, 2011). Obecně se v membráně gram-negativních bakterií PE vyskytuje častěji a s větším podílem (více jak 60 %) než v membráně gram-pozitivních bakterií (Epanand *et al.*, 2007; Epanand a Epanand, 2011).

*B. subtilis* patří mezi modelové gram-pozitivní bakterie. Jeho membrána obsahuje 70 % PG, 12 % PE a 4 % CL. Zbytek tvoří např. glykofosfolipidy, diglykosyldiacylglycerol nebo

monoglykosyldiacylglycerol (Clejan *et al.*, 1986). Naproti tomu gram-pozitivní bakterie *S. aureus* ve své membráně žádný PE nemá. V její membráně se z 58 % vyskytuje PG, zbylých 42 % tvoří CL (Epanand a Epanand, 2011).

V membránách živočišných buněk, např. v membráně lidských erytrocytů, převažují fosfatidylcholin (PC), fosfatidylserin nebo sfingomyelin. Vyskytují se v nich ale také PE nebo fosfatidylinositol (Engelmann *et al.*, 1992).

Jednotlivé fosfolipidové třídy se liší nábojem. PG a CL se řadí mezi fosfolipidy nesoucí negativní náboj, naproti tomu PE nese výsledný nulový náboj, protože se vyskytuje ve formě zwitteriontu s jedním záporným a jedním kladným nábojem (Dowhan, 1997).

#### **5.1.1.1 Přítomnost fosfatidylglycerolu**

Přítomnost PG v membránách bakterií je důležitá pro oligomerizaci daptomycinu. K zahájení oligomerizace daptomycinu stačí, aby jedna molekula daptomycinu vážala jeden PG (Muraih *et al.*, 2012).

Daptomycin interaguje preferenčně s oblastmi membrány, které jsou obohaceny aniontovými lipidy, jako je právě PG. Mutantní kmen *B. subtilis*, který měl poruchu v syntéze PG, byl méně citlivý (MIC 8 µg/ml) na působení daptomycinu než divoký kmen (Hachmann *et al.*, 2009). Snížení podílu PG pravděpodobně snižuje celkový záporný náboj membrány, čímž dochází k oslabení interakcí s kladně nabitým daptomycinem v komplexu s vápníkem (Hachmann *et al.*, 2011). Daptomycin není účinný proti gram-negativním bakteriím, což je pravděpodobně způsobeno nižším podílem aniontových fosfolipidů (jako je PG) v membráně těchto bakterií (Randall *et al.*, 2013). Již Jung a kol. (Jung *et al.*, 2004) zaznamenali, že daptomycin permeabilizuje lipozómy obsahující PG i PC dvakrát více než ty, které obsahovaly pouze PC. V membráně lipozómů z PG/PC byla za přítomnosti vápníku pozorována větší konformační změna daptomycinu (Jung *et al.*, 2004).

#### **5.1.2 Vazba daptomycinu na membránu**

Již rok po objevu daptomycinu byl zkoumán způsob, jak se daptomycin váže na membránu. Došlo se k závěru, že *in vitro* na membránovém modelovém systému dochází k vazbě daptomycinu na membránu i bez přítomnosti vápenatých iontů a že se daptomycin do membrány zabudovává pouze pomocí zbytku mastné kyseliny (Lakey a Ptak, 1988). Jak již

bylo zmíněno výše (kapitola 4), vazba na membránu při vysokých koncentracích daptomycinu (50  $\mu\text{M}$ ) pozorována byla, ale přítomnost vápníku tuto hranici snižuje na 1  $\mu\text{M}$  daptomycinu (Chen *et al.*, 2014).

Jung (Jung *et al.*, 2004) se svými kolegy zjistil, že daptomycin váže vápník již v roztoku. Navázáním vápenatého iontu dochází ke konformační změně daptomycinu, která má za následek zvýšení amfipatické povahy molekuly a neutralizaci záporného náboje. Tato změna umožňuje daptomycinu se navázat na membrány s kyselými nebo neutrálními fosfolipidy (Jung *et al.*, 2004). Daptomycin se váže na membránu ve formě monomerů (Zhang *et al.*, 2013), přičemž každá molekula potřebuje k vazbě jeden iont vápníku (Zhang *et al.*, 2016a).

Vazba daptomycinu na membránu je také závislá na jeho vlastní koncentraci. Ještě při koncentraci daptomycinu 0,02  $\mu\text{M}$  (0,03  $\mu\text{g/ml}$ ) bylo navázání na membránu pozorováno, při nižší nikoliv (Zhang *et al.*, 2017). Navázáním na membránu dojde ke druhé konformační změně, což umožní hlubší zanoření do membrány (Jung *et al.*, 2004). Zanoření do membrány lze sledovat pomocí nárůstu emise fluorescence kynureninu (Lakey a Ptak, 1988), která roste úměrně hloubce zanoření molekuly do membrány.

### **5.1.3 Oligomerizace daptomycinu**

#### **5.1.3.1 Tvorba micel v roztoku**

Díky své amfipatické povaze je daptomycin schopen tvořit v roztoku micely. Daptomycin agreguje hlavně při vyšších koncentracích vápníku (50 mM), ale tendence agregovat se vyskytuje i v koncentracích okolo 10 mM (Rotondi a Gierasch, 2005). Navázání vápníku způsobí konformační změnu, která může vést ke zvýšení expozice hydrofobních skupin rozpouštědla a taková změna může podpořit agregaci v roztoku (Muraih *et al.*, 2011). Daptomycin v roztoku tvoří micely o 14 – 16 podjednotkách při molárním poměru vápníku a daptomycinu 1:1 (Ho *et al.*, 2008). Hodnota CMC u daptomycinu činí 0,8  $\mu\text{M}$  (20mM HEPES pufr, pH 7,5) (Zhang *et al.*, 2017).

#### **5.1.3.2 Oligomerizace daptomycinu v membráně**

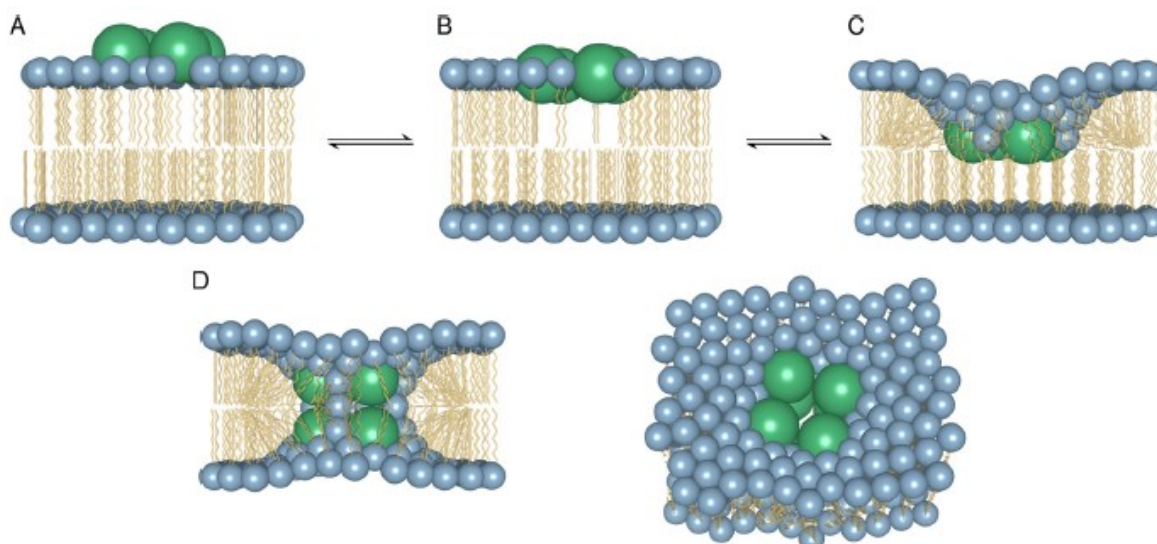
Daptomycin v membráně tvoří oligomery, které jsou základem pro jeho antimikrobiální aktivitu. Jak již bylo zmíněno dříve (viz kapitola 4), navázání jednoho iontu vápníku na jednu molekulu daptomycinu způsobí jeho vazbu na membránu. Navázané monomery v membráně

vytvoří několik volně spojených tetramerních struktur, ve kterých spolu interagují pouze acylové řetězce (Taylor *et al.*, 2016; Muraih *et al.*, 2012). Vazba druhého iontu vápníku způsobí těsnější spojení mezi molekulami a dojde k vytvoření funkčního oligomeru (Taylor *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016a). Monomery daptomycinu mohou spolu v oligomeru interagovat pomocí  $\pi$ -interakcí ( $\pi$ -stacking) mezi aromatickými zbytky Kyn a Trp (Ho *et al.*, 2008). Uspořádání monomerů v oligomeru je buď paralelní, nebo monomery navzájem tvoří ostrý úhel (Muraih *et al.*, 2012). Oligomerizace daptomycinu je také podmíněna stechiometrickou interakcí s PG (jeden daptomycin váže jeden PG), se kterým daptomycin interaguje přímo a specificky (Muraih *et al.*, 2012).

Počet monomerů v oligomeru není stále úplně jasný ani v publikacích od jedné výzkumné skupiny. Muraih s Palmerem (Muraih a Palmer, 2012) se domnívali, že je oligomer tvořen 6 – 7 monomery daptomycinu. Dále ale už neobjasnili, jestli toto číslo platí pro celý oligomer, nebo pouze pro jeho část v jednom listu membrány. Ale o dva roky později spolu se Zhangem (Zhang *et al.*, 2014b) rozpracovali jiný model, kde daptomycin tvoří v membráně dva spojené tetramery, každý v jednom listu membrány.

Oligomerizaci daptomycinu ovlivňuje nejen PG, ale také CL. Pokud cílová membrána obsahuje 10 – 20 % CL, dochází k inhibici přesmyku tetrameru z vnějšího do vnitřního listu membrány a tím pádem nemůže vznikat funkční pór (Obrázek 3). Bez přítomnosti CL se daptomycin může zanořit hlouběji do membrány tím, že vnější vrstvy membrány ohne (Zhang *et al.*, 2014a).

Tvorbu oligomerů ovlivňují nejenom polární hlavy fosfolipidů, ale i nepolární zbytky mastných kyselin. Bylo zjištěno, že se daptomycin více váže na membrány, jejichž fosfolipidy obsahují zbytek kyseliny olejové nebo palmitolejové než na ty, které mají zbytek kyseliny myristové. U membrán tvořených lipidy s kyselinou olejovou nebo palmitolejovou je podíl daptomycinu ve vnějším listu okolo 67 %, ale u membrán obsahujících kyselinu myristovou dochází k rovnoměrnému rozložení (52 %: 48 %) daptomycinu do obou listů membrány. U membrán se zbytky kyseliny olejové nebo palmitolejové se tetramery také tvoří jen ve vnějším listu jako u membrán s vyšším obsahem CL (Taylor *et al.*, 2017).



Obrázek 3 Tvorba oligomerů v membráně; A: daptomycin tvoří tetramer ve vnějším listu membrány, B: vazba na membránu s větším podílem CL, C: vazba na membránu bez CL, D: tetramer se může pomocí flip-flopu dostat do vnitřní poloviny membrány a oba tetramery spolu mohou vytvořit oktamer. Převzato ze Zhang *et al.*, 2014a.

## 5.2 Účinek daptomycinu na bakteriální buňku

### 5.2.1 Tvorba pórů

Otázka tvorby pórů ještě nemá zcela jednoznačnou odpověď. Již v 80. letech 20. století bylo zjištěno, že daptomycin způsobuje poškození membrány, následkem čehož dochází k úniku draselných iontů z bakteriálních buněk (Allen *et al.*, 1987). Pomocí *in vitro* pokusů na modelové membráně složené z 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu (DMPC) a 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosforylglycerolu (DMPG) byla dokázána schopnost daptomycinu tvořit póry, které selektivně propouštějí pouze malé, kladně nabitě látky, jako jsou např. kationty. Větší látky jako např. cholin nebo hexamethonium, ač jsou kladně nabitě, pórem neprošly (Zhang *et al.*, 2014b). O dva roky později byla selektivita póru upřesněna: daptomycinový pór má větší afinitu k draselným iontům než k sodným (66 %: 34 %) (Zhang *et al.*, 2016b). Tyto studie mohou být zdánlivě v rozporu s obrázky z elektronového mikroskopu, kde byly pozorovány bakterie *S. aureus* inkubované s daptomycinem (4  $\mu\text{g/ml}$ , 60 min). Na těchto snímcích žádné stopy po lýzi buněk, kterou by způsobovaly póry, nejsou (Cotroneo *et al.*, 2008). Tato absence lýze se dá vysvětlit tvorbou malých pórů, kterými

nedochází k úniku obsahu cytoplazmy a dezintegraci buněk, ale pouze k úniku kationtů (Zhang *et al.*, 2014b).

S odlišným výsledkem ohledně tvorby pórů přichází Kreutzberger a kol. (Kreutzberger *et al.*, 2017), který s použitím 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfoglycerol (POPG)/ 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfocholinových (POPC) lipozómů došel k názoru, že daptomycin póry netvoří. Tvorbu pórů způsobenou daptomycinem zahrnuje i studie Müller *et al.* (2016). V této práci zjišťovali pórotvorný efekt netradičně pomocí proteomové studie a dále pomocí vstupu fluorescenční sondy propidium jodid do buněk *B. subtilis* po inkubaci s daptomycinem. V rámci proteomové studie uzavřeli, že daptomycin nezvyšuje expresi stresových markerových proteinů membrány (např. LiaH nebo PspA), což považovali za důkaz, že daptomycin póry v membráně netvoří. Při inkubaci buněk *B. subtilis* s daptomycinem a propidium jodidem zjistili, že se barvivo do buněk nedostalo, což je utvrdilo v názoru na nepřítomnost pórů v membráně.

### 5.2.2 Depolarizace membrány

Ačkoliv ne všichni autoři došli u otázky tvorby pórů ke stejnému závěru, je obecně přijímaným faktem, že další mechanismus účinku daptomycinu spočívá v depolarizaci membrány.

Vytvořením pórů dochází k přechodu iontů přes membránu a tím k depolarizaci membrány. Inkubace *S. aureus* s daptomycinem (100 µg/ml) po dobu 15 minut měla za následek změnu membránového potenciálu z -155 mV na -110 mV (Alborn *et al.*, 1991). Tato dávka je však 200krát vyšší než MIC daptomycinu, která proti *S. aureus* činí 0,5 µg/ml (Nguyen *et al.*, 2010). Ke stejnému výsledku došla i studie, ve které byla použita nižší koncentrace daptomycinu (5 µg/ml), kde došlo k redukci membránového potenciálu na méně než 5 % původní hodnoty u *S. aureus* po 30 minutách inkubace (Silverman *et al.*, 2003). Ztráta membránového potenciálu není okamžitá, ale má postupnou stoupající tendenci. Při depolarizaci nedochází k úniku jen vodíku a draslíku, ale i jiných nabitých molekul jako je např. Mg<sup>2+</sup> nebo adenosintrifosfátu (adenosine triphosphate, ATP) (Hobbs *et al.*, 2008).

### 5.2.3 Inhibice syntézy makromolekul

Daptomycin způsobuje inhibici syntézy deoxyribonukleové kyseliny (deoxyribonucleic acid, DNA), ribonukleové kyseliny (ribonucleic acid, RNA) i proteinů (příbalová informace Cubicinu, 2015, Merck a CO., INC (USA)). K této inhibici ale dochází pouze následkem porušení membrány, úniku ATP a ztráty iontů. Daptomycin nemůže inhibovat biosyntézu makromolekul vazbou na cytoplazmatický enzym, neboť se dokáže pouze navázat na membránu a přesmyknout se do vnitřního listu membrány. Do cytoplazmy se tedy nedostane (Kreutzberger *et al.*, 2017). Může ale ovlivnit funkci membránově vázaných proteinů (Müller *et al.*, 2016) (viz kapitola 5.2.4) Inhibice syntézy buněčné stěny.

V přítomnosti daptomycinu (0,25 µg/ml, 18 hodin) dochází k agregaci chromozomu a následně k výtoku DNA z buněk *S. aureus* (Ma *et al.*, 2017). Po 18hodinové inkubaci *S. aureus* s daptomycinem došlo také ke změně exprese 53 membránových i cytoplazmatických proteinů. Expres většiny proteinů vážící nukleotidy byla zvýšena, dále byla zvýšena exprese 13 proteinů s katalytickou aktivitou (např. peptidázy, hydrolázy nebo karboxylázy), zbylých 10 (nejčastěji dehydrogenázy) na tom bylo opačně (Ma *et al.*, 2017).

### 5.2.4 Inhibice syntézy buněčné stěny

Na konci 80. let 20. století se mělo za to, že daptomycin ovlivňuje syntézu buněčné stěny (Allen *et al.*, 1987; Mengin-Lecreulx *et al.*, 1990), kdy u *Bacillus megaterium* (MIC 2 µg/ml) daptomycin narušuje krok v syntéze peptidoglykanu mezi glukosamin-6-fosfátem a UDP-N-acetylglukosaminem. V koncentraci daptomycinu 3 µg/ml docházelo k 93% inhibici inkorporace radioaktivně značeného N-acetylglukosaminu do membrány (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1990). U *S. aureus* došlo k 50% inhibici syntézy peptidoglykanu při koncentraci 25 µg/ml (Allen *et al.*, 1987); tato hodnota je však 50krát vyšší než MIC proti *S. aureus*. Autoři došli k závěru, že daptomycin přímo ovlivňuje některý enzym v syntéze peptidoglykanu. O rok později ale zjistili, že předchozí domněnka byla chybná. Daptomycin inhibuje tvorbu UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptidu v *B. megaterium* tím, že narušuje membránový potenciál, který je potřeba pro transport aminokyselin dovnitř buňky. Bez transportu aminokyselin se jich nedostává pro syntézu pentapeptidu, který je součástí základní stavební jednotky buněčné stěny (Allen *et al.*, 1991).

Daptomycin také způsobuje uvolňování membránový proteinů rozrušováním membránových mikrodomén, na které jsou tyto proteiny v bakteriální membráně vázány. Mikrodomény u bakterií byly objeveny vcelku nedávno (López *et al.*, 2010). Mají funkční podobnost s eukaryotickými lipidovými mikrodomény. Obsahují homolog Flotilinu-1, proteinu, který byl nalezen pouze v eukaryotických lipidických raftech (López *et al.*, 2010). Daptomycin se váže do těchto mikrodomén, ve kterých jsou vázány membránové proteiny, jako je např. protein MurG nebo PlsX, a způsobuje jejich uvolnění do cytoplazmy a tím jejich deaktivaci (Müller *et al.*, 2016). MurG je N-acetylglukosamin transferáza, která je odpovědná za syntézu posledního kroku v syntéze peptidoglykanu; lipidu II (Kobayashi *et al.*, 2003). Daptomycin způsobuje také delokalizaci proteinu PlsX, což je acyltransferáza (Lu *et al.*, 2006), která je zapojena v syntéze fosfolipidů.

## 5.2.5 Další účinky daptomycinu na membránu

### 5.2.5.1 *Vliv na fluiditu membrán*

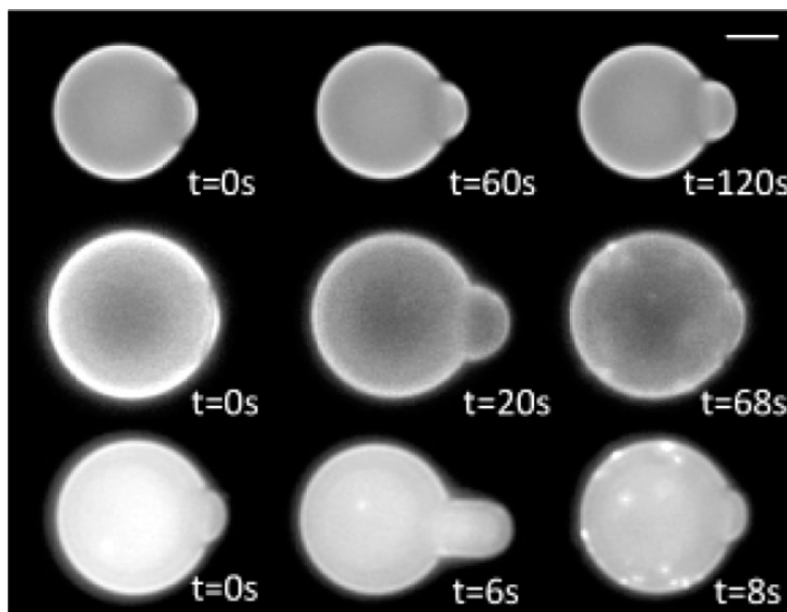
Daptomycin ovlivňuje fluiditu membrán. Již dvě minuty po přidání daptomycinu k buňkám *B. subtilis* došlo k poklesu membránové fluidity, což naznačuje, že se nejednalo o adaptaci buňky na přítomnost daptomycinu, ale o přímý účinek daptomycinu (Müller *et al.*, 2016). Ke snížení membránové fluidity došlo i u kmene *S. aureus* rezistentního k meticilinu (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), který byl kultivován v subletální koncentraci daptomycinu po dobu 20 dní (Mishra *et al.*, 2009b).

Daptomycin se váže do membránových mikrodomén, které jsou výrazně fluidnější než zbytek membrány, protože se tam vyskytují fosfolipidy s mastnými kyselinami, které mají krátké, zalomené nebo nenasyčené uhlíkaté řetězce. Při vazbě do těchto fluidnějších míst daptomycin způsobuje přibližování a seskupování těchto mikrodomén do větších shluků (Müller *et al.*, 2016).

### 5.2.5.2 *Vychlípění membrány*

Vychlípění lipidové dvojvrstvy (tzv. lipid extracting effect) bylo pozorováno na DOPG/DOPC váčcích (poměr PC:PG byl 7:3). V přítomnosti daptomycinu v koncentraci 0,3  $\mu\text{M}$  (0,49  $\mu\text{g/ml}$ ) docházelo pouze k vychlípění části membrány, při koncentracích daptomycinu 1  $\mu\text{M}$  (1,6  $\mu\text{g/ml}$ ) a 5  $\mu\text{M}$  (8,1  $\mu\text{g/ml}$ ) docházelo k dynamickému procesu tvorby

a zániku vychlípeniny (Obrázek 4). Autoři se domnívají, že při tomto vychlípění membrány dochází k vypuzení lipidů z membrány a také k úniku iontů (Chen *et al.*, 2014).



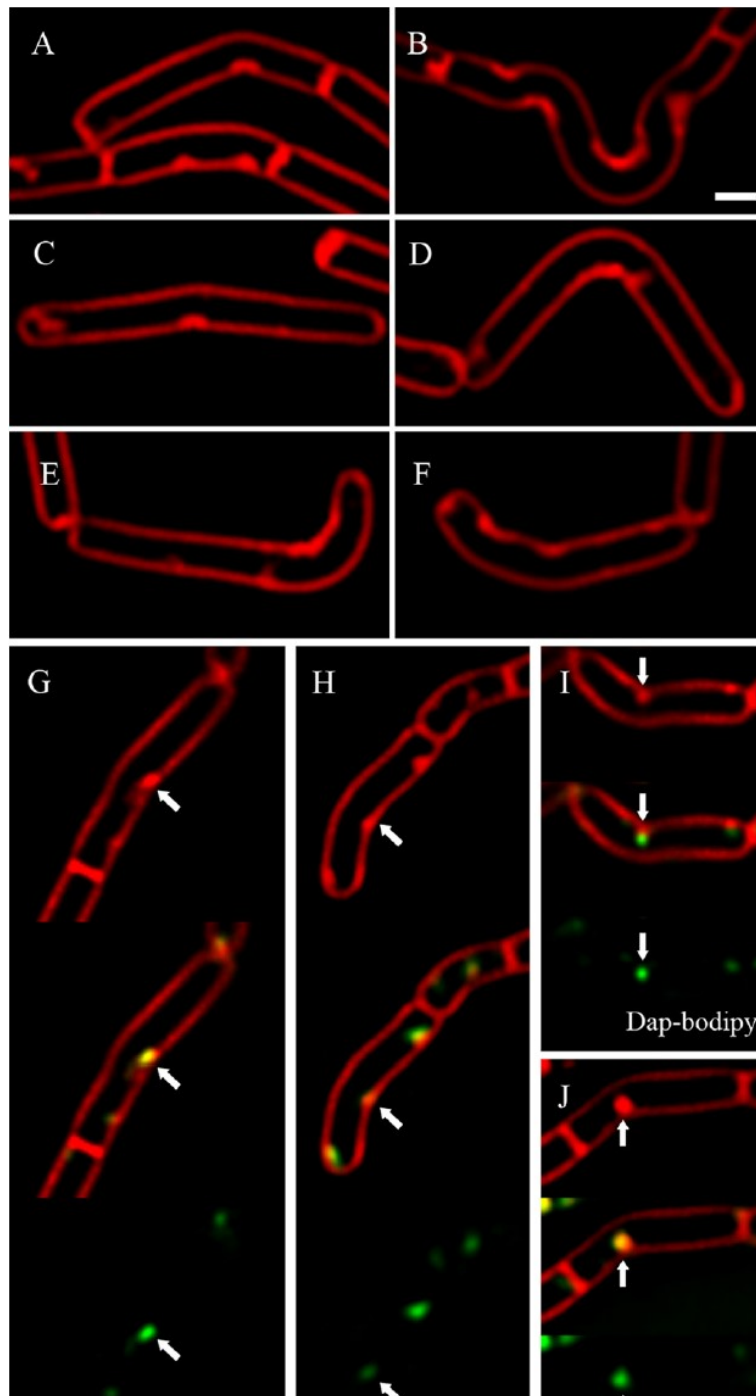
Obrázek 4 Vychlípění membrány; Vliv daptomycinu na DOPC/DOPG váčky v přítomnosti vápníku. První řádek: koncentrace 0,3  $\mu\text{M}$ , druhý 1  $\mu\text{M}$  a třetí 5  $\mu\text{M}$  daptomycinu. Velikost měřítka je 10  $\mu\text{m}$ . Převzato z Chen *et al.*, 2014.

### 5.2.6 Vliv na morfologii buněk

Již na začátku 90. let si Canepari a kol. (Canepari *et al.*, 1990) všimli, že při expozici enterokoků daptomycinu po dobu 2 – 3 hodin změnila buňky svůj tvar na tyčinky a tyčinkovité buňky *B. subtilis* se protáhly.

V přítomnosti subletální koncentrace daptomycinu (1  $\mu\text{g/ml}$ ) po dobu dvou hodin buňky *B. subtilis* rostly, došlo u nich ale ke změně morfologie; buňky byly deformované, některé byly ohnuté do tvaru připomínajícího písmeno L (Obrázek 5). Fluorescenční analog daptomycinu označený pomocí BODIPY se vyskytoval v místě ohybu buněk, což naznačuje, že je daptomycin odpovědný za tuto změnu morfologie (Pogliano *et al.*, 2012). Zároveň bylo testováno chování membránového proteinu DivIVA označeného zeleným fluorescenčním proteinem (Green fluorescent protein, GFP) v přítomnosti daptomycinu. DivIVA je protein gram-pozitivních bakterií, který se účastní procesů spojených s buněčným růstem, dělením buněk a tvorbou spory. DivIVA je akumulován v místech, kde je bakteriální membrána nejvíce zakřivená (Lenarcic *et al.*, 2009). Tento protein se vyskytoval v místech, kde došlo k poškození a ohybu membrány způsobeného daptomycinem, což naznačuje, že mezi poškozením buněk

daptomycinem a nesprávnou lokalizací DivIVA proteinu existuje souvislost (Pogliano *et al.*, 2012).



Obrázek 5 Vliv daptomycinu na morfologii buněk; A-F: Buňky *B. subtilis* (PY79) rostly v subletální koncentraci daptomycinu (1 µg/ml) po dobu dvou hodin. Membrány jsou obarveny červenou fluorescenční barvičkou FM 4-64. G-J: Lokalizace daptomycin-BODIPY na membránách *B. subtilis*. Buňky rostly v subletální koncentraci daptomycin-BODIPY (10 µg/ml) po dobu dvou hodin. Velikost měřítka je 1 µm. Převzato z Pogliano *et. al.*, 2012.

## 6 Mechanizmy rezistence

Působením antibiotika se vyselektují mutantní kmeny bakterií, které si vytvořily na dané antibiotikum rezistenci. Ani daptomycin není výjimkou. V následujících kapitolách (6.1 - 6.5) jsou mechanizmy rezistence na daptomycin podrobněji probrány.

### 6.1 Redukce syntézy fosfatidylglycerolu, produkce lysylfosfatidylglycerolu

Daptomycin s navázaným vápníkem pro svůj efekt na membránu vyžaduje přítomnost PG, který nese záporný náboj (viz kapitola 5.1.1.1.). Některé bakterie se tomuto mechanismu přizpůsobily tím, že snížily podíl negativně nabitého PG v membráně, nebo dokonce zvýšily produkci kladně nabitých fosfolipidů tak, aby došlo k elektrostatickému odpuzování daptomycinu.

Fosfolipidové složení membrán u kmenů *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* rezistentních k daptomycinu (Dap-R) a citlivých k daptomycinu (Dap-S) se liší v obsahu PG a glycerolfosfo-diglykodiacylglycerolu (GP-DGDAG). Membrána Dap-R kmene *E. faecalis* obsahuje oproti Dap-S kmenu o 3 % více GP-DGDAG a o 7 % méně PG. U *E. faecium* ale dochází k více jak dvojnásobnému snížení obsahu PG a dvojnásobnému nárůstu GP-DGDAG v porovnání s citlivým kmenem (Mishra *et al.*, 2012). Poměr obsahu fosfolipidů ve vnitřním a vnějším listu membrány ale zůstal nezměněn. U Dap-R *E. faecium* dále došlo k poklesu obsahu nenasycených mastných kyselin v membráně oproti Dap-S kmenu o 5 %, u *E. faecalis* podobné rozdíly pozorovány nebyly (Mishra *et al.*, 2012).

Gen *pgsA* je esenciálním genem pro *B. subtilis* (Kobayashi *et al.*, 2003), kóduje CDP-diacylglycerol-glycerol-3-fosfát 3-fosfatidyltransferázu PgsA (Peleg *et al.*, 2012), která se účastní syntézy PG. Při testování citlivosti na daptomycin u *B. subtilis* bylo zjištěno, že snížení exprese genu *pgsA* vedlo ke snížení produkce PG, v důsledku čehož došlo ke zvýšení MIC 8krát (Hachmann *et al.*, 2009). Ještě výraznější vliv na rezistenci měla jednobodová mutace v tomto genu (nahrazení alaninu valinem na 64. místě), která způsobila pětinasobné snížení obsahu PG v membráně a MIC proti *B. subtilis* se zvýšila dvacetinasobně (Hachmann *et al.*, 2011). O něco menší vliv měla stejná bodová mutace na rezistenci *S. aureus*, kde způsobila pouze čtyřnásobný vzrůst MIC (Peleg *et al.*, 2012).

V obsahu PG v membráně se lišily také Dap-R a Dap-S kmeny *S. aureus*. PG byl v Dap-R kmenu zastoupen o 14 % méně než v Dap-S kmenu (Jones *et al.*, 2008). Obsah kladně nabitého lysylfosfatidylglycerolu (lysylphosphatidylglycerol, LPG) se mezi oběma kmeny nelišil, odlišoval se ovšem poměr LPG mezi vnějším a vnitřním listem membrány: u Dap-R kmene bylo ve vnějším listu čtyřikrát více LPG než u Dap-S kmene (Jones *et al.*, 2008). Toto zjištění se ale odlišuje od výsledků Mishry a Bayera (Mishra a Bayer, 2013), kteří testovali devět Dap-R a Dap-S kmenů MRSA. U všech Dap-R kmenů došlo k významnému nárůstu podílu LPG (o 5 – 15 %) a zároveň ke snížení produkce PG (o 2 – 15 %) oproti Dap-S kmenům, poměr LPG mezi oběma listy membrány u Dap-R a Dap-S kmenů se nelišil (Mishra a Bayer, 2013).

LPG je kladně nabitá molekula, díky níž získává bakteriální membrána kladný náboj, který způsobuje elektrostatické odpuzování daptomycinu s navázaným vápníkem. Toto odpuzování je účinné, pouze pokud se LPG vyskytuje ve vnějším listu membrány (Ernst *et al.*, 2009). Tvorba LPG je kódována genem *mprF* (Peschel *et al.*, 2001), jehož inaktivace zapříčiňuje ztrátu tvorby LPG (Staubitz *et al.*, 2004). Gen *mprF* kóduje protein MprF, který má lysyl-syntázovou a flopázovou aktivitu (Oku *et al.*, 2004). U kmenů *S. aureus* rezistentních k daptomycinu byla nalezena jednobodová mutace v *mprF* genu, při které došlo k výměně Ser za Leu na pozici 295 a která zvýšila flopázovou aktivitu toho proteinu (Yang *et al.*, 2009b). Jiná jednobodová mutace, konkrétně výměna původního Thr za Ala na pozici 345, zase zvýšila syntázovou aktivitu MprF proteinu (Yang *et al.*, 2010). Pouhé zvýšení exprese genu *mprF* v citlivém kmenu nevedlo ke vzniku daptomycinové rezistence u *S. aureus* (Mehta *et al.*, 2012), u *B. subtilis* došlo dokonce ke zvýšení citlivosti na daptomycin (Hachmann *et al.*, 2009).

## 6.2 Nadměrná exprese *dlt* operonu

Produkty operonu *dltABCD* řídí alanylaci teichoových kyselin buněčné stěny gram-pozitivních bakterií, čímž dochází k neutralizaci jejich záporného náboje (Perego *et al.*, 1995). U Dap-R MRSA byla zaznamenána nadměrná exprese genu *dltA* (Bertsche *et al.*, 2011), který kóduje ligázu D-alanin-D-alanyl carrier proteinu (Perego *et al.*, 1995). Nadměrná exprese celého operonu *dlt* vedla ke čtyřnásobnému zvýšení MIC daptomycinu proti *S. aureus* (Yang *et al.*, 2009a). Nadměrná exprese má za následek dvojnásobný nárůst obsahu kyseliny teichoové v buněčné stěně MRSA, dvounásobnou alanylaci této kyseliny a také ztlustění buněčné stěny, která je u Dap-R kmenu dvojnásobná oproti Dap-S kmenu (Bertsche *et al.*, 2011; Bertsche *et*

*al.*, 2013). U Dap-R kmenů byl potvrzen nárůst celkového pozitivního povrchového náboje oproti Dap-S kmenům (Bertsche *et al.*, 2013). Pozitivní povrchový náboj a zesílená buněčná stěna pravděpodobně způsobují elektrostatické odpuzování daptomycinu s navázaným vápníkem a/nebo prostorově zamezují přístupu daptomycinu k bakteriální buňce (Bertsche *et al.*, 2013). Mutantní kmeny *S. aureus*, které byly defektní v *dltA*, *dltB* a *dltD*, neměly alanylovánu žádnou teichoovou kyselinu a byly senzitivnější k účinku kationtových antibiotik obecně (Peschel *et al.*, 1999). Pro objasnění mechanismu, jakým způsobem daptomycin ovlivňuje zvýšení exprese operonu *dlt*, je potřeba dalších studií.

### 6.3 Mutace v operonu *yycFG*

Mutaci v genu *mprF* často doprovází také mutace v *yycFG* operonu, který kóduje proteiny dvoukomponentového systému YycFG (nově označovaného jako WalkR (Dubrac *et al.*, 2007)). YycF je histidinová kináza a YycG je response regulátor (Winkler a Hoch, 2008). Mutace v tomto operonu se podílejí na rezistenci k antibiotikům, např. u MRSA kmenů vede ke zvýšení MIC daptomycinu 8krát (Friedman *et al.*, 2006). Jelikož je gen *yycFG* pro buňku esenciální (Fabret a Hoch 1998), autoři se domnívali, že mutace v *yycFG* povede ke smrti buňky. Jelikož buňky přežily, domnívají se, že mohlo dojít ke vzniku alternativní sensorové kinázy nebo ke vzniku úplně nového proteinu s touto mutací (Friedman *et al.*, 2006). Další mutace v genu pro YycG kinázu u *E. faecium* způsobila záměnu Ser za Leu na pozici 333, která vedla ke zvýšení MIC na 16 µg/ml (Tran *et al.*, 2013), MIC daptomycinu proti citlivému kmenu *E. faecium* je 2 µg/ml (Cantón *et al.*, 2010). Změny v aktivitě proteinu YycG mají tedy pravděpodobně vliv na daptomycinovou rezistenci (Tran *et al.*, 2013).

YycFG proteiny ovlivňují u *S. aureus* expresi devíti genů, které kódují enzymy účastníci se degradace buněčné stěny (Dubrac a Msadek, 2004; Dubrac *et al.*, 2007). Mezi tyto geny patří např. *lytM* kódující protein LytM, což je glycyl-glycin endopeptidáza, *isaA* kódující transglykosylázu nebo *ssaA*, což je gen pro amidázu (Dubrac a Msadek, 2004; Dubrac *et al.*, 2007). U *B. subtilis* YycFG zvyšuje expresi genů kódující hydrolázy *yocH* (Bisicchia *et al.*, 2007) a *lytE* (Howell *et al.*, 2003), a naopak snižuje expresi genů, jako jsou *tagAB* a *tagDEF*, které se podílejí na syntéze teichoové kyseliny (Howell *et al.*, 2003; Howell *et al.*, 2006). Snižování transkripce *yycFG* operonu snížilo biosyntézu peptidoglykanu a způsobilo modifikace buněčné stěny, jako je zvýšení četnosti příčných propojení peptidoglykanu a prodloužení délky

řetězců peptidoglykanu (Dubrac *et al.*, 2007). Přesný mechanismus, jak operon *yycFG* přímo ovlivňuje rezistenci na daptomycin, však zatím není objasněn.

## 6.4 Aktivace regulátoru LiaRS

LiaRS je dvoukomponentový systém, který reguluje buněčnou odpověď na stres z vnějšího prostředí, jako je např. poškození povrchových struktur bakterie (Mascher *et al.*, 2003). Někdy je označován jako tříkomponentový LiaFSR, kde LiaF je inhibítor LiaS (Jordan *et al.*, 2006). LiaS je senzorová histidinová kináza a LiaR je response regulátor (Jordan *et al.*, 2006; Muthaiyan *et al.*, 2008). U *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. faecium* nebo u *Streptococcus mutans* je systém nazýván LiaRS, u *S. aureus* byl pojmenován VraSR (Kuroda *et al.*, 2003) (jedná se o homology). LiaFSR indukuje transkripci několika genů, které se podílejí na syntéze membránových proteinů a biosyntéze peptidoglykanu, nebo genů transkripčních regulátorů, jako jsou např.: *murB* (UDP-N-acetylenolpyruvoylglukosamin reduktáza), *rgpG* (účastní se prvního kroku syntézy buněčné stěny u *S. mutans*), *ropA* (peptidyl-prolyl cis/trans izomeráza) nebo *ftsH* (chaperon) u *S. mutans* (Suntharalingam *et al.*, 2009).

Expozice daptomycinu indukuje nadměrnou expresi LiaRS (VraRS) (Mehta *et al.*, 2012). U *S. aureus* došlo k desetinásobnému zvýšení exprese genů *vraR* a *vraS* v přítomnosti daptomycinu (Muthaiyan *et al.*, 2008). Mutantní kmeny, které mají operon *liaIHGFSR* deletován, jsou citlivější vůči daptomycinu. Ztráta genu *liaR* snížila MIC daptomycinu proti *E. faecium* z 3 µg/ml na 0,064 µg/ml (Panesso *et al.*, 2015). Delece celého *liaIHGFSR* operonu snížila MIC daptomycinu proti *B. subtilis* z 1 µg/ml na 0,3 µg/ml (Hachmann *et al.*, 2009). Mutant MRSA s delecí *vraSR* genů měl dvakrát vyšší citlivost k daptomycinu než původní MRSA kmen (Mehta *et al.*, 2012).

I pouze jednobodové mutace v operonu *lia*, které způsobily záměnu aminokyseliny, poskytovaly svým nositelům výhodu při expozici daptomycinu. Mutantní kmeny *E. faecium*, které obsahovaly jednobodové mutace v *liaS* a v *liaR*, měly MIC daptomycinu 3 až 48 µg/ml (Diaz *et al.*, 2014) oproti 2 µg/ml u divokého kmene (Cantón *et al.*, 2010). Delece v genu *liaF* u *E. faecalis* vedla ke ztrátě Ile na pozici 177, která způsobila dokonce rezistenci na daptomycin (Munita *et al.*, 2013).

Způsob, jakým LiaRS ovlivňuje rezistenci bakterií vůči daptomycinu, ještě také není zcela objasněn. V práci Arias *et al.* (2011) se autoři domnívají, že rezistence na daptomycin má dvě fáze. První začíná aktivací LiaFSR, která nastane díky mutaci v *liaF* nebo jiné části LiaFSR

systému. Ta může ovlivnit geny syntézy peptidoglykanu nebo membránových proteinů tak, aby došlo k opravě poškození způsobené antibiotikem. V druhé fázi dojde ke změně složení cytoplazmatické membrány, která nastane v důsledku změn exprese enzymů, které se podílejí na metabolismu fosfolipidů (Arias *et al.*, 2011). Jiná studie naznačuje, že mechanismus rezistence tkví v rozložení fosfolipidů v membráně, jelikož LiaRS je také hlavním regulátorem rozložení membránových fosfolipidů (Reyes *et al.*, 2015). Mehta a kol. (Mehta *et al.*, 2012) se domnívají, že nárůst exprese LiaRS pravděpodobně mění syntézu komponent buněčné stěny, čímž vzniká rezistentní fenotyp. Jaké komponenty buněčné stěny mají na mysli nebo jak je zvýšená exprese LiaRS mění, ale dále nespecifikují. Pro přesný a jasný mechanismus, jakým LiaRS ovlivňuje rezistenci na daptomycin, je třeba ještě dalších studií.

## 6.5 Uvolňování membránových fosfolipidů

Unikátní mechanismus rezistence bakterií vůči daptomycinu v podobně uvolňování membránových fosfolipidů byl objeven vcelku nedávno u *S. aureus*. Fosfolipidy jsou bakteriemi aktivně uvolňovány jako odpověď na expozici daptomycinu, nejedná se pouze o následek poškození membrány. Fosfolipidové váčky vyvazují daptomycin, čímž mu zabráňují integrovat s membránou. Poprvé byl tento jev pozorován u mutantů MRSA postrádajících operon *agr*, které byly rezistentní na daptomycin (Pader *et al.*, 2016).

Operon *agr* je quorum-sensing systém a hlavní regulátor virulence u *S. aureus* (Ji *et al.*, 1995). Dysfunkční operon *agr* se pak jeví jako výhoda při expozici vůči daptomycinu. MRSA citlivý na daptomycin má funkční operon *agr*, díky čemuž vzniká AgrA protein, který silně zvyšuje produkci modulinů rozpustných ve fenolu (phenol soluble modulins, PSM) vazbou na jejich promotor (Queck *et al.*, 2008). PSM jsou virulenční faktory, leukocidiny, které jsou odpovědné za cytolytickou aktivitu *S. aureus* (Wang *et al.*, 2007). Mutantní kmeny *S. aureus* s poruchou v syntéze PSM byly také rezistentní na daptomycin (Pader *et al.*, 2016). Následně bylo zjištěno, že PSM dokáže vázat uvolňované fosfolipidy z buněk. Mutantní kmen s delecí operonu *agr* je rezistentní k daptomycinu, jelikož neprodukuje PSM. Fosfolipidy tedy nejsou vyvazovány, tudíž se mohou vázat na daptomycin a tím mu zabránit ve vazbě na membránu. Citlivý kmen MRSA sice také uvolňuje fosfolipidy do prostředí, ale produkuje i PSM, který fosfolipidy vyvazuje. Fosfolipidové váčky se tak dále nemohou vázat na daptomycin, aby ho inaktivovaly, a daptomycin se tak může vázat na membrány buněk a způsobovat jejich smrt (Pader *et al.*, 2016).

Uvolnění membránových fosfolipidů po expozici daptomycinu bylo pozorováno i u *Streptococcus pyogenes* nebo u *E. faecalis*, toto uvolnění také není důsledkem poškození membrány, ale jedná se o aktivní proces. Množství uvolněných fosfolipidů ale bylo pětinašobně nižší než u MRSA (Ledger *et al.*, 2017).

## 7 Závěr

Výzkum daptomycinu od doby jeho objevení po současnost velmi pokročil. Zajímavé je, že toto antibiotiku bylo schváleno pro léčbu lidských bakteriálních onemocnění, i když se vědci dosud zcela neshodují na přesném mechanismu účinku, kterým bakterie zabíjí. Stále ale převažuje názor, že daptomycin tvoří diskrétní póry, jimiž dochází k úniku iontů a tím k depolarizaci membrány, jejímž následkem dochází k zastavení syntézy makromolekul. Výhodou daptomycinu není jen jeho neobvyklý mechanismus účinku, ale také fakt, že ke svému účinku potřebuje PG, který se na savčích membránách téměř nevyskytuje, tudíž daptomycin na ně nemá žádný efekt.

Intenzivní výzkum je třeba věnovat rezistenci bakterií na daptomycin, aby se objasnily mechanismy všech typů rezistencí. Na základě těchto zjištění by se mohl daptomycin kombinovat s antibiotikem, které má jiný mechanismus účinku, aby došlo k likvidaci i rezistentních kmenů.

Vývoji a výzkumu nových antibiotik se věnuje nemnoho farmaceutických firem, jelikož to pro ně není zcela ekonomicky výhodné. Je ale důležité, aby se ve vývoji antibiotik pokračovalo, jelikož nadměrným nebo nesprávným používáním antibiotik (často jako prevence), si bakterie rychleji vytvářejí rezistenci. Podle světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) dospěl svět do post-antibiotické éry, kdy řada běžných onemocnění nebo i menších zranění může být znovu smrtelná ([www.who.int](http://www.who.int)). WHO také vytvořila seznam bakterií, pro které je potřeba prioritní výzkum a vývoj nových antibiotik kvůli jejich narůstající rezistenci. Kritickou prioritou má vývoj antibiotik proti *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a proti enterobakteriím, do skupiny s druhou nejvyšší prioritou patří vývoj antibiotik proti *E. faecium*, MRSA nebo *Helicobacter pylori*.

Novým směrem ve vývoji antimikrobiálních látek by mohla být i antibiotika mířící na membránové mikrodomény. Poškození mikrodomén obnovuje citlivost multirezistentního kmene MRSA k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům (García-Fernández *et al.*, 2017). Daptomycin působí také na membránové mikrodomény, proto je dobrým kandidátem pro boj s multirezistentními kmeny.

## 8 Seznam použité literatury

- Alborn, W.E., Allen, N.E. a Preston, D.A., 1991. Daptomycin disrupts membrane-potential in growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(11), pp.2282–2287.
- Allen, N.E., Alborn, W.E. a Hobbs, J.N., 1991. Inhibition of membrane potential-dependent amino acid transport by daptomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(12), pp.2639–2642.
- Allen, N.E., Hobbs, J.N. a Alborn, W.E., 1987. Inhibition of peptidoglycan biosynthesis in gram-positive bacteria by LY146032. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 31(7), pp.1093–1099.
- Arias, C.A., Panesso, D., McGrath, D.M., Xiang, Q. a Weinstock, G.M., 2011. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. *New England Journal of Medicine*, 365(10), pp.713–724.
- Ball, L.-J., Goult, C.M., Donarski, J.A., Micklefield, J. a Ramesh, V., 2004. NMR structure determination and calcium binding effects of lipopeptide antibiotic daptomycin. *Organic a Biomolecular Chemistry*, 2(13), pp.1872–1878.
- Bertsche, U., Weidenmaier, C., Kuehner, D., Yang, S.J., Baur, S., Wanner, S., Francois, P., Schrenzel, J., Yeaman, M.R. a Bayer, A.S., 2011. Correlation of daptomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), pp.3922–3928.
- Bertsche, U., Yang, S.J., Kuehner, D., Wanner, S., Mishra, N.N., Roth, T., Nega, M., Schneider, A., Mayer, C., Grau, T., Bayer, A.S. a Weidenmaier, C., 2013. Increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation are common phenotypes among daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates. *PLoS ONE*, 8(6), pp.1–11.
- Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H. a Devine, K.M., 2007. The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 65(1), pp.180–200.
- Boeck, L.D., Fukuda, D.S., Abbott, B.J. a Debono, M., 1988. Deacylation of A21978C, an acidic lipopeptide antibiotic complex, by *Actinoplanes utahensis*. *The Journal of antibiotics*, 41(8), pp.1085–1092.
- Bunkóczi, G., Vértesy, L. a Sheldrick, G.M., 2005. Structure of the lipopeptide antibiotic tsushimycin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(8), pp.1160–1164.
- Canepari, P., Boaretti, M., Lleó, M.M. a Satta, G., 1990. Lipoteichoic acid as a new target for activity of antibiotics: mode of action of daptomycin (LY146032). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(6), pp.1220–1226.
- Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., Chaves, R.L. a Johnson, A.P., 2010. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: What is the evidence? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), pp.1126–1136.
- Clejan, S., Krulwich, T.A., Mondrus, K.R. a Seto-Young, D., 1986. Membrane lipid composition of obligatively and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* spp. *Journal of Bacteriology*, 168(1), pp.334–340.

- Cotroneo, N., Harris, R., Perlmutter, N., Beveridge, T. a Silverman, J.A., 2008. Daptomycin exerts bactericidal activity without lysis of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), pp.2223–2225.
- Debono, M., Abbott, B.J., Molloy, R.M., Fukuda, D.S., Hunt, A.H., Daupert, V.M., Counter, F.T., Ott, J.L., Carrell, C.B., Howard, L.C., Boeck, L.D. a Hamill, R.L., 1988. Enzymatic and chemical modifications of lipopeptide antibiotic A21978C: The synthesis and evaluation of daptomycin (LY146032). *The Journal of antibiotics*, 41(8), pp.1093–1105.
- Debono, M., Barnhart, M., Carrell, C.B., Hoffmann, J. a, Occolowitz, J.L., Abbott, B.J., Fukuda, D.S., Hamill, R.L., Biemann, K. a Herlihy, W.C., 1987. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. *The Journal of antibiotics*, 40(6), pp.761–777.
- Diaz, L., Tran, T.T., Munita, J.M., Miller, W.R., Rincon, S., Carvajal, L.P., Wollam, A., Reyes, J., Panesso, D., Rojas, N.L., Shamoo, Y., Murray, B.E., Weinstock, G.M. a Ariasa, C.A., 2014. Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), pp.4527–4534.
- Dowhan, W., 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), pp.199–232.
- Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O. a Msadek, T., 2007. New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 189(22), pp.8257–8269.
- Dubrac, S. a Msadek, T., 2004. Identification of genes controlled by the essential YycG / YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 186(4), pp.1175–1181.
- Eisenstein, B.I., Oleson, Jr., F.B. a Baltz, R.H., 2010. Daptomycin: From the mountain to the clinic, with essential help from Francis Tally, MD. *Clinical Infectious Diseases*, 50(s1), pp.S10–S15.
- Eliopoulos, G.M., Willey, S., Reiszner, E., Spitzer, P.G., Caputo, G. a Moellering, R.C., 1986. In vitro and in vivo activity of LY146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30(4), pp.532–535.
- Engelmann, B., Streich, S., Schönthier, U.M., Richter, W.O. a Duhm, J., 1992. Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyperlipidemias. Increased phosphatidylcholine and reduced sphingomyelin in patients with elevated levels of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1165(1), pp.32–37.
- Epanand, R.F., Savage, P.B. a Epanand, R.M., 2007. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(10), pp.2500–2509.
- Epanand, R.M. a Epanand, R.F., 2011. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Journal of Peptide Science*, 17(5), pp.298–305.
- Ernst, C.M., Staubitz, P., Mishra, N.N., Yang, S.J., Hornig, G., Kalbacher, H., Bayer, A.S., Kraus, D. a Peschel, A., 2009. The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathogens*, 5(11), pp.1–9.

- Fabret, C. a Hoch, J.A., 1998. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: Implications for anti-infective therapy. *Journal of Bacteriology*, 180(23), pp.6375–6383.
- Friedman, L., Alder, J.D. a Silverman, J.A., 2006. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), pp.2137–2145.
- García-Fernández, E., Koch, G., Wagner, R.M., Fekete, A., Stengel, S.T., Schneider, J., Mielich-Süss, B., Geibel, S., Markert, S.M., Stigloher, C. a Lopez, D., 2017. Membrane microdomain disassembly inhibits MRSA antibiotic resistance. *Cell*, 171(6), pp.1354–1367.
- Grünewald, J., Sieber, S.A., Mahlert, C., Linne, U. a Marahiel, M.A., 2004. Synthesis and derivatization of daptomycin: A chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 126(51), pp.17025–17031.
- Hachmann, A.-B., Angert, E.R. a Helmann, J.D., 2009. Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), pp.1598–1609.
- Hachmann, A.B., Sevim, E., Gaballa, A., Popham, D.L., Antelmann, H. a Helmann, J.D., 2011. Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), pp.4326–4337.
- Hart, P. 't, Kleijn, L.H.J., de Bruin, G., Oppedijk, S.F., Kemmink, J. a Martin, N.I., 2014. A combined solid- and solution-phase approach provides convenient access to analogues of the calcium-dependent lipopeptide antibiotics. *Org. Biomol. Chem.*, 12(6), pp.913–918.
- He, Y., Li, J., Yin, N., Herradura, P.S., Martel, L., Zhang, Y., Pearson, A.L., Kulkarni, V., Mascio, C., Howland, K., Silverman, J.A., Keith, D.D. a Metcalf, C.A., 2012. Reduced pulmonary surfactant interaction of daptomycin analogs via tryptophan replacement with alternative amino acids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(19), pp.6248–6251.
- Ho, S.W., Jung, D., Calhoun, J.R., Lear, J.D., Okon, M., Scott, W.R.P., Hancock, R.E.W. a Straus, S.K., 2008. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *European Biophysics Journal*, 37(4), pp.421–433.
- Hobbs, J.K., Miller, K., Oaapos;Neill, A.J. a Chopra, I., 2008. Consequences of daptomycin-mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), pp.1003–1008.
- Howell, A., Dubrac, S., Krogh, K., Noone, D., Fert, J., Msadek, T. a Devine, K., 2003. Genes controlled by the essential YycG / YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Molecular Microbiology*, 49(6), pp.1639–1655.
- Howell, A., Dubrac, S., Noone, D., Varughese, K.I. a Devine, K., 2006. Interactions between the YycFG and PhoPR two-component systems in *Bacillus subtilis*: The PhoR kinase phosphorylates the non-cognate YycF response regulator upon phosphate limitation. *Molecular Microbiology*, 59(4), pp.1199–1215.
- Chen, Y.F., Sun, T.L., Sun, Y. a Huang, H.W., 2014. Interaction of daptomycin with lipid bilayers: A lipid extracting effect. *Biochemistry*, 53(33), pp.5384–5392.
- Ji, G., Beavis, R.C. a Novick, R.P., 1995. Cell density control of staphylococcal virulence

- mediated by an octapeptide pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(26), pp.12055–12059.
- Jones, T., Yeaman, M.R., Sakoulas, G., Yang, S.J., Proctor, R.A., Sahl, H.G., Schrenzel, J., Xiong, Y.Q. a Bayer, A.S., 2008. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), pp.269–278.
- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J.D. a Mascher, T., 2006. Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: Identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *Journal of Bacteriology*, 188(14), pp.5153–5166.
- Jung, D., Rozek, A., Okon, M. a Hancock, R.E.W., 2004. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chemistry a Biology*, 11(7), pp.949–957.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F. M. L., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H. B., Vagner, V., van Dijl, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U. a Ogasawara, N. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), pp.4678–4683.
- Kopp, F., Grünewald, J., Mahlert, C. a Marahiel, M.A., 2006. Chemoenzymatic design of acidic lipopeptide hybrids: New insights into the structure-activity relationship of daptomycin and A54145. *Biochemistry*, 45(35), pp.10474–10481.
- Kreutzberger, M.A., Pokorny, A. a Almeida, P.F., 2017. Daptomycin-phosphatidylglycerol domains in lipid membranes. *Langmuir*, 33(47), pp.13669–13679.
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H. a Hiramatsu, K., 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 49(3), pp.807–821.
- Lakey, J.H. a Lea, E.J.A., 1986. The role of acyl chain character and other determinants on the bilayer activity of A21978C an acidic lipopeptide antibiotic. *Biochimica et Biophysica Acta*, 859(2), pp.219–226.
- Lakey, J.H. a Ptak, M., 1988. Fluorescence indicates a calcium-dependent interaction between the lipopeptide antibiotic LY146032 and phospholipid membranes. *Biochemistry*, 27(13), pp.4639–4645.

- Ledger, E.V.K., Pader, V. a Edwards, A.M., 2017. *Enterococcus faecalis* and pathogenic streptococci inactivate daptomycin by releasing phospholipids. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(10), pp.1502–1508.
- Lee, M.T., Hung, W.C., Hsieh, M.H., Chen, H., Chang, Y.Y. a Huang, H.W., 2017. Molecular state of the membrane-active antibiotic daptomycin. *Biophysical Journal*, 113(1), pp.82–90.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L.J., Errington, J., Marenduzzo, D. a Hamoen, L.W., 2009. Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO Journal*, 28(15), pp.2272–2282.
- Lohani, C.R., Taylor, R., Palmer, M. a Taylor, S.D., 2015a. Solid-phase synthesis and in vitro biological activity of a Thr4→Ser4 analog of daptomycin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(23), pp.5490–5494.
- Lohani, C.R., Taylor, R., Palmer, M. a Taylor, S.D., 2015b. Solid-phase total synthesis of daptomycin and analogs. *Organic Letters*, 17(3), pp.748–751.
- López, D., Kolter, R. a Lo, D., 2010. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes and Development*, 24(17), pp.1893–1902.
- Lu, Y.J., Zhang, Y.M., Grimes, K.D., Qi, J., Lee, R.E. a Rock, C.O., 2006. Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in gram-positive pathogens. *Molecular Cell*, 23(5), pp.765–772.
- Ma, W., Zhang, D., Li, G., Liu, J., He, G., Zhang, P., Yang, L., Zhu, H., Xu, N. a Liang, S., 2017. Antibacterial mechanism of daptomycin antibiotic against *Staphylococcus aureus* based on a quantitative bacterial proteome analysis. *Journal of Proteomics*, 150, pp.242–251.
- Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W. a Helmann, J.D., 2003. Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: The regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular Microbiology*, 50(5), pp.1591–1604.
- Mehta, S., Cuirolo, A.X., Plata, K.B., Riosa, S., Silverman, J.A., Rubio, A., Rosato, R.R. a Rosato, A.E., 2012. VraSR two-component regulatory system contributes to mprF-mediated decreased susceptibility to daptomycin in in vivo-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), pp.92–102.
- Mengin-Lecreulx, D., Allen, N.E., Hobbs, J.N. a van Heijenoort, J., 1990. Inhibition of peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus megaterium* by daptomycin. *FEMS Microbiology Letters*, 69(3), pp.245–248.
- Miao, V., Coëffet-LeGal, M.F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C.J., Wrigley, S.K. a Baltz, R.H., 2005. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: Cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*, 151(5), pp.1507–1523.
- Mishra, N.N. a Bayer, A.S., 2013. Correlation of cell membrane lipid profiles with daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), pp.1082–1085.
- Mishra, N.N., Bayer, A.S., Tran, T.T., Shamoo, Y., Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Guan, Z. a Arias, C.A., 2012. Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. *PLoS ONE*, 7(8), pp.1–10.

- Mishra, N.N., Yang, S.J., Sawa, A., Rubio, A., Nast, C.C., Yeaman, M.R. a Bayer, A.S., 2009. Analysis of cell membrane characteristics of in vitro-selected daptomycin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), pp.2312–2318.
- Müller, A., Wenzel, M., Strahl, H., Grein, F., Saaki, T.N. V., Kohl, B., Siersma, T., Bandow, J.E., Sahl, H.-G., Schneider, T. a Hamoen, L.W., 2016. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), pp.e7077–e7086.
- Munita, J.M., Panesso, D., Diaz, L., Tran, T.T., Reyes, J., Wanger, A., Murray, B.E., Arias, C.A., Diaz, L., Panesso, D., Reyes, J., Murray, B.E. a Ariasa, C.A., 2013. A *liaF* codon deletion abolishes daptomycin bactericidal activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), pp.2831–2833.
- Muraih, J.K., Harris, J., Taylor, S.D. a Palmer, M., 2012. Characterization of daptomycin oligomerization with perylene excimer fluorescence: Stoichiometric binding of phosphatidylglycerol triggers oligomer formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(3), pp.673–678.
- Muraih, J.K. a Palmer, M., 2012. Estimation of the subunit stoichiometry of the membrane-associated daptomycin oligomer by FRET. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(7), pp.1642–1647.
- Muraih, J.K., Pearson, A., Silverman, J. a Palmer, M., 2011. Oligomerization of daptomycin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(4), pp.1154–1160. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2011.01.001>.
- Muthaiyan, A., Silverman, J.A., Jayaswal, R.K. a Wilkinson, B.J., 2008. Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), pp.980–990.
- Nguyen, K.T., He, X., Alexander, D.C., Li, C., Gu, J.Q., Mascio, C., Van Praagh, A., Mortin, L., Chu, M., Silverman, J.A., Brian, P. a Baltz, R.H., 2010. Genetically engineered lipopeptide antibiotics related to A54145 and daptomycin with improved properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4), pp.1404–1413.
- Nguyen, K.T., Ritz, D., Gu, J.-Q., Alexander, D., Chu, M., Miao, V., Brian, P. a Baltz, R.H., 2006. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), pp.17462–17467.
- Oku, Y., Kurokawa, K., Ichihashi, N. a Sekimizu, K., 2004. Characterization of the *Staphylococcus aureus mprF* gene, involved in lysinylation of phosphatidylglycerol. *Microbiology*, 150(1), pp.45–51.
- Pader, V., Hakim, S., Painter, K.L., Wigneshweraraj, S., Clarke, T.B. a Edwards, A.M., 2016. *Staphylococcus aureus* inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids. *Nature Microbiology*, 2(1), pp.1–8.
- Panesso, D., Reyes, J., Gaston, E., Deal, M., Londoño, A., Nigo, M., Munita, J.M., Miller, W., Shamoo, Y., Tran, T.T. a Arias, C.A., 2015. Deletion of *liaR* reverses daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* independent of the genetic background. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), pp.7327–7334.
- Peleg, A.Y., Miyakis, S., Ward, D. V., Earl, A.M., Rubio, A., Cameron, D.R., Pillai, S., Moellering, R.C. a Eliopoulos, G.M., 2012. Whole genome characterization of the

- mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, 7(1), p.e28316.
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M.A., Leopold, K. a Fischer, W., 1995. Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*: Identification of genes and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(26), pp.15598–15606.
- Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K.P.M. a van Strijp, J.A.G., 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor Mprf is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(9), pp.1067–1076.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. a Götz, F., 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(13), pp.8405–8410.
- Pogliano, J., Pogliano, N. a Silverman, J.A., 2012. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. *Journal of Bacteriology*, 194(17), pp.4494–4504.
- Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.H.L., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Li, M. a Otto, M., 2008. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: Insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Cell*, 32(1), pp.150–158.
- Randall, C.P., Mariner, K.R., Chopra, I. a O'Neill, A.J., 2013. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), pp.637–639.
- Reyes, J., Panesso, D., Tran, T.T., Mishra, N.N., Cruz, M.R., Munita, J.M., Singh, K. V., Yeaman, M.R., Murray, B.E., Shamoo, Y., Garsin, D., Bayer, A.S. a Arias, C.A., 2015. A *liaR* deletion restores susceptibility to daptomycin and antimicrobial peptides in multidrug-resistant *Enterococcus faecalis*. *Journal of Infectious Diseases*, 211(8), pp.1317–1325.
- Rotondi, K.S. a Gierasch, L.M., 2005. A well-defined amphipathic conformation for the calcium-free cyclic lipopeptide antibiotic, daptomycin, in aqueous solution. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 80(2–3), pp.374–385.
- Shoji, J., Kozuki, S., Okamoto, S., Sakazaki, R. a Otsuka, H., 1968. Studies on Tsushimycin. Isolation and characterization of an acidic acylpeptide containing a new fatty acid. *The Journal of antibiotics*, 21(7), pp.439–443.
- Silverman, J.A., Perlmutter, N.G., Howard, M. a Shapiro, H.M., 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), pp.2538–2544.
- Staubitz, P., Neumann, H., Schneider, T., Wiedemann, I. a Peschel, A., 2004. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 231(1), pp.67–71.
- Suntharalingam, P., Senadheera, M.D., Mair, R.W., Levesque, C.M. a Cvitkovitch, D.G., 2009. The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 191(9), pp.2973–2984.

- Taylor, R., Beriashvili, D., Taylor, S. a Palmer, M., 2017. Daptomycin pore formation is restricted by lipid acyl chain composition. *ACS Infectious Diseases*, 3(11), pp.797–801.
- Taylor, R., Butt, K., Scott, B., Zhang, T., Muraih, J.K., Mintzer, E., Taylor, S. a Palmer, M., 2016. Two successive calcium-dependent transitions mediate membrane binding and oligomerization of daptomycin and the related antibiotic A54145. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(9), pp.1999–2005.
- Taylor, S. a Palmer, M., 2016. The action mechanism of daptomycin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24 (24), pp. 6253-6268
- Tran, T.T., Panesso, D., Gao, H., Roh, J.H., Munita, J.M., Reyes, J., Diaz, L., Lobos, E.A., Shamoo, Y., Mishra, N.N., Bayer, A.S., Murray, B.E., Weinstock, G.M. a Arias, C.A., 2013. Whole-genome analysis of a daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* strain and its daptomycin-resistant variant arising during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), pp.261–268.
- Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H.L., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R. a Otto, M., 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature Medicine*, 13(12), pp.1510–1514.
- Winkler, M.E. a Hoch, J.A., 2008. Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 190(8), pp.2645–2648.
- Yang, S., Kreiswirth, B.N., Sakoulas, G., Yeaman, M.R., Xiong, Y.Q., Sawa, A. a Bayer, A.S., 2009a. Enhanced expression of *dltABCD* is associated with the development of daptomycin nonsusceptibility in a clinical endocarditis isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(12), pp.1916–1920.
- Yang, S.J., Nast, C.C., Mishra, N.N., Yeaman, M.R., Fey, P.D. a Bayer, A.S., 2010. Cell wall thickening is not a universal accompaniment of the daptomycin nonsusceptibility phenotype in *Staphylococcus aureus*: Evidence for multiple resistance mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), pp.3079–3085.
- Yang, S.J., Xiong, Y.Q., Dunman, P.M., Schrenzel, J., François, P., Peschel, A. a Bayer, A.S., 2009b. Regulation of *mprF* in daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), pp.2636–2637.
- Zhang, J., Scoten, K. a Straus, S.K., 2016b. Daptomycin leakage is selective. *ACS Infectious Diseases*, 2(10), pp.682–687.
- Zhang, J., Scott, W.R.P., Gabel, F., Wu, M., Desmond, R., Bae, J.H., Zaccari, G., Algar, W.R. a Straus, S.K., 2017. On the quest for the elusive mechanism of action of daptomycin: Binding, fusion, and oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865(11), pp.1490–1499.
- Zhang, T. hua, Muraih, J.K., Mintzer, E., Tishbi, N., Desert, C., Silverman, J., Taylor, S. a Palmer, M., 2013. Mutual inhibition through hybrid oligomer formation of daptomycin and the semisynthetic lipopeptide antibiotic CB-182,462. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(2), pp.302–308.
- Zhang, T.H., Muraih, J.K., MacCormick, B., Silverman, J. a Palmer, M., 2014b. Daptomycin forms cation- and size-selective pores in model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(10), pp.2425–2430.

Zhang, T.H., Muraih, J.K., Tishbi, N., Herskowitz, J., Victor, R.L., Silverman, J., Uyumarenogie, S., Taylor, S.D., Palmer, M. a Mintzer, E., 2014a. Cardiolipin prevents membrane translocation and permeabilization by daptomycin. *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), pp.11584–11591.

Zhang, T.H., Taylor, S.D., Palmer, M. a Duhamel, J., 2016a. Membrane binding and oligomerization of the lipopeptide A54145 studied by pyrene fluorescence. *Biophysical Journal*, 111(6), pp.1267–1277.

### **Internetové zdroje**

Příbalová informace Cubicinu, *Prescribing information* [online], 2015 [cit. 30.3.2018]  
Dostupné zde: [https://www.merck.com/product/usa/pi\\_circulars/c/cubicin/cubicin\\_pi.pdf](https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/c/cubicin/cubicin_pi.pdf)

WHO, *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed* [online], 2017 [cit. 30.4.2018], Dostupné zde: <http://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

WHO, *Antibiotic resistance* [online], 2018 [cit. 30.4.2018], Dostupné zde: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>