

Svoluji k zapůjčení své diplomové 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: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Michaela Novotná

Mechanismus inducibilní genové exprese rezistenčního proteinu
Vga_{LC} ze *Staphylococcus haemolyticus*

Mechanism of inducible gene expression of resistance protein
Vga(A)_{LC} from *Staphylococcus haemolyticus*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Gabriela Balíková Novotná, Ph.D.

Praha, 2021

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, 11.8.2021

.....

Bc. Michaela Novotná

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné, Ph.D. a MSc. Vladimíru Vimbergovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady a připomínky a vstřícný přístup. Poděkování patří také všem ostatním členům Laboratoře biologie sekundárního metabolismu MBÚ AV ČR za jejich přínosné rady a vytváření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich vydatnou podporu v době mého studia.

Abstrakt

Protein VgaA za stafylokoků patří do skupiny ARE ABCF proteinů, které udílejí rezistenci k antibiotikům vázajícím se na 50S ribozomální podjednotku mechanismem ochrany cílového místa. VgaA udílí rezistenci k linkosamidům, streptograminům A a pleuromutilinům a poskytuje tak tzv. LS_{AP} rezistenční fenotyp. Exprese rezistenčních genů v nepřítomnosti antibiotika často snižuje fitness, proto je jejich exprese přísně kontrolována a spouštěna pouze v odpovědi na přítomnost antibiotika, ke kterému daný protein udílí rezistenci. V případě genu *vgaA* byla inducibilní exprese taktéž pozorována, její mechanismus však nebyl dosud objasněn.

V rámci diplomové práce bylo ukázáno, že gen *vgaALC* ze *Staphylococcus haemolyticus* je regulován pomocí ribozomem zprostředkované atenuace. Tento mechanismus je založen na detekci inhibitorů translace prostřednictvím ribozomu překládajícího speciální regulační otevřený čtecí rámeček (uORF), který je součástí atenuátoru lokalizovaného v 5' nepřekládané oblasti mRNA. Gen *vgaALC* je regulován na transkripční úrovni v odpovědi na LS_{AP} antibiotika, přičemž antibiotická specifická indukce je ovlivňována nejen charakterem peptidu kódovaného uORF, ale také antibiotickou specificitou rezistenčního proteinu. Technikou fluorescenční mikroskopie bylo ukázáno, že protein kontrolovaný přirozeným regulátorem je v rámci populace buněk produkován heterogenně.

Klíčová slova

ARE ABCF proteiny, Vga_{ALC}, *Staphylococcus haemolyticus*, antibiotická rezistence, linkosamidy, streptograminy, pleuromutiliny, regulace genové exprese, r5'UTR element, ribozomem zprostředkovaná atenuace, SRC

Abstract

The staphylococcal protein VgaA belongs to ARE ABCF family, which confers resistance to ribosome binding antibiotics by the target protection mechanism. VgaA confers resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins and thus provides the so-called LS_{AP} resistance phenotype. The expression of resistance genes often reduces fitness in the absence of an antibiotic, therefore the expression of resistance genes is often tightly controlled and triggered only in response to the presence of an antibiotic to which the protein confers resistance. The inducible expression has also been observed for the *vgaA* gene, nevertheless, its mechanism has not been elucidated.

In the diploma thesis, it was shown that the *vgaA_{LC}* gene from *Staphylococcus haemolyticus* is regulated by ribosome-mediated attenuation. The mechanism is based on the detection of translation inhibitors via a ribosome translating a special regulatory open reading frame (uORF), which is part of an attenuator located in the 5' untranslated region of the mRNA. The *vgaA_{LC}* gene is regulated at the transcriptional level in response to LS_{AP} antibiotics. Antibiotic specificity of induction is affected not only by the nature of the peptide encoded by uORF but also by the antibiotic specificity of the resistance protein. Fluorescence microscopy has shown that the protein regulated by its natural regulator is produced heterogeneously within the cell population.

Keywords

ARE ABCF proteins, VgaA_{LC}, *Staphylococcus haemolyticus*, antibiotic resistance, lincosamides, streptogramins, pleuromutilins, regulation of gene expression, r5'UTR element, ribosome mediated attenuation, SRC

Obsah

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	PŘEHLED LITERATURY	11
3.1	ANTIBIOTIKA BLOKUJÍCÍ TRANSLACI	11
3.1.1	Makrolidy	11
3.1.2	Linkosamidy	13
3.1.3	Streptograminy	14
3.1.4	Pleuromutiliny	14
3.1.5	Fenikoly	15
3.1.6	Oxazolidinony	16
3.1.7	Tetracykliny.....	16
3.2	BAKTERIÁLNÍ ABCF PROTEINY	17
3.2.1	Struktura a funkce.....	18
3.2.2	ARE ABCF.....	21
3.3	REGULACE GENOVÉ EXPRESE RIBOZOMEM ZPROSTŘEDKOVANOU ATENUACÍ	25
3.3.1	Antibiotiky řízená atenuace	27
3.3.1.1	Atenuace řízená erythromycinem a telithromycinem	28
3.3.1.2	Atenuace řízená fenikoly a oxazolidinony.....	32
3.3.1.3	Atenuace řízená tetracyklinem.....	33
3.3.1.4	Atenuace řízená linkomycinem a dalšími LS _A P antibiotiky	34
4	MATERIÁL A METODY	36
4.1	MATERIÁL	36
4.1.1	Bakteriální kmeny.....	36
4.1.2	Kultivační média.....	37
4.1.3	Antibiotika.....	38
4.1.4	Vektory	38
4.1.5	Oligonukleotidy	38
4.1.6	Roztoky a pufry	41
4.1.7	Enzymy	42
4.1.8	Protilátky a substrát pro WB analýzu	43
4.1.9	Fluorescenční barvičky	43
4.1.10	Použité chemikálie.....	43
4.1.11	Speciální dezinfekční a čistící prostředky.....	44
4.1.12	Komerční soupravy a standardy	44
4.1.13	Software a internetové aplikace.....	45
4.2	METODY	46
4.2.1	Kultivace a uchovávání bakterií	46
4.2.1.1	Kultivace a uchovávání <i>Escherichia coli</i>	46
4.2.1.2	Kultivace a uchovávání <i>Staphylococcus aureus</i>	47
4.2.2	Příprava a transformace kompetentních buněk	47
4.2.2.1	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro transformaci teplotním šokem.....	47
4.2.2.2	Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> teplotním šokem	48
4.2.2.3	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro transformaci elektroporací	48

4.2.2.4	Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> elektroporací	49
4.2.2.5	Příprava kompetentních buněk <i>Staphylococcus aureus</i> pro transformaci elektroporací	49
4.2.2.6	Transformace kompetentních buněk <i>Staphylococcus aureus</i> elektroporací	50
4.2.3	Metody práce s DNA	50
4.2.3.1	Polymerasová řetězová reakce (PCR)	50
4.2.3.2	Elektroforéza v agarosovém gelu	54
4.2.3.3	Purifikace PCR produktu a izolace DNA z gelu	55
4.2.3.4	Ošetření PCR produktu pomocí DpnI	56
4.2.3.5	Fosforylace PCR produktu pomocí kinasy	56
4.2.3.6	SLICE reakce	56
4.2.3.7	Štěpení DNA restrikčními enzymy	57
4.2.3.8	Ligace DNA	58
4.2.3.9	Izolace plasmidové DNA	58
4.2.3.10	Sekvence DNA	59
4.2.4	Metody práce s RNA	59
4.2.4.1	Izolace celkové RNA	60
4.2.4.2	Ošetření izolované RNA pomocí DNase I	60
4.2.4.3	TRIzolová extrakce	61
4.2.4.4	Reverzní transkripce RNA a následná PCR (RT-PCR)	61
4.2.5	Metody práce s proteiny	63
4.2.5.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE	63
4.2.5.2	Denaturující elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	63
4.2.5.3	Western blot	64
4.2.6	Stanovení citlivosti na antimikrobiální látky	65
4.2.6.1	Mikrodiluční metoda	65
4.2.7	Měření fluorescence reportéru exprese eqFP650	66
4.2.7.1	Kmeny s konstrukty, které nekódují kompletní rezistenční protein, pouze fluorescenční reportér pod kontrolou přirozeného regulátoru <i>vga_{ALC}</i>	66
4.2.7.2	Kmeny s konstrukty, které kódují kompletní rezistenční protein v <i>in cis</i> uspořádání s přirozeným regulátorem <i>vga_{ALC}</i>	67
4.2.8	Fluorescenční mikroskopie	68
4.2.8.1	Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii	68
4.2.8.2	Fluorescenční mikroskopie	69
5	VÝSLEDKY	70
5.1	EXPRESE REZISTENČNÍHO GENU <i>vga_{ALC}</i> JE REGULOVÁNA RIBOZOMEM ZPROSTŘEDKOVANOU ATENUACÍ	70
5.1.1	Příprava konstruktů nesoucích fluorescenční reportér pod kontrolou mutovaných regulačních oblastí <i>vga_{ALC}</i>	71
5.1.1.1	Příprava konstruktů LCreg_375 a LCreg_247 s různou délkou upstream oblasti genu <i>vga_{ALC}</i>	71
5.1.1.2	Příprava konstruktů uORF_mut se substitucí ve start kodonu uORF	72
5.1.2	Stanovení přibližné pozice promotoru	73
5.1.3	Identifikace uORF	75
5.1.4	Vazba antibiotika do ribozomu jako prekvizita spuštění genové exprese	76
5.2	GEN <i>vga_{ALC}</i> JE REGULOVÁN NA TRANSKRIPČNÍ ÚROVNI	78
5.2.1	Příprava konstruktů s genem <i>vga_{ALC}</i> pod kontrolou přirozeného regulátoru	79
5.2.1.1	Příprava konstruktů LCreg-Vga _{ALC}	79
5.2.2	Testování vlivu zvyšující se koncentrace linkomycinu na množství transkriptu <i>vga_{ALC}</i>	80
5.3	ANTIBIOTICKÁ SPECIFICITA INDUKCE <i>vga_{ALC}</i> JE DÁNA ANTIBIOTICKOU SPECIFICITOU REZISTENČNÍHO PROTEINU	82
5.3.1	Příprava konstruktů s genem <i>vga_{ALC}</i> a jeho variantami s odlišným rezistenčním fenotypem pod kontrolou přirozeného regulátoru	84
5.3.1.1	Příprava konstruktů LCreg-Vga _{ALC} -eqFP650	84
5.3.1.2	Příprava konstruktů LCreg-Vga _{ALC} _EQ1+2 a LCreg-Vga _{ALC} _EQ1+2-eqFP650	86

5.3.1.3	Příprava konstruktů LCreg-VgaA _{LC} _LTGAG, LCreg-VgaA _{LC} _LTGAG-eqFP650, LCreg-VgaA _{LC} _SGAG, LCreg-VgaA _{LC} _SGAG-eqFP650, LCreg-VgaA _{LC} _SGTG a LCreg-VgaA _{LC} _SGTG-eqFP650.....	87
5.3.2	Stanovení profilu genové exprese VgaA variant s odlišným rezistenčním fenotypem v přítomnosti vybraných LS _{AP} antibiotik	88
5.4	ANTIBIOTICKÁ SPECIFICITA ATENUÁTORU <i>vgaA_{LC}</i> JE V NEPŘÍTOMNOSTI REZISTENČNÍHO PROTEINU ZÁVISLÁ NA CHARAKTERU uORF	93
5.4.1	Příprava konstruktů nesoucích fluorescenční reportér pod kontrolou regulačních oblastí genu <i>vgaA_{LC}</i> s různými variantami uORF.....	94
5.4.1.1	Příprava konstruktů uORF_9AA, uORF_MGG, uORF_MKF, uORF_MRQ, uORF_MRL a uORF_MRLR	94
5.4.2	Testování vlivu délky a sekvence uORF na indukční profil atenuátoru <i>vgaA_{LC}</i>	95
5.5	BUNĚČNÁ LOKALIZACE REZISTENČNÍHO PROTEINU VgaA_{LC} SYNTETIZOVANÉHO VE FYZIOLOGICKÉM MNOŽSTVÍ	99
5.5.1	Stanovení růstové křivky kmenu <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220 nesoucího konstrukt LCreg-VgaA _{LC} -eqFP650.....	100
5.5.2	Vizualizace VgaA _{LC} pomocí fluorescenční mikroskopie	101
6	DISKUZE.....	112
7	SOUHRN.....	119
8	POUŽITÁ LITERATURA	120
9	PŘÍLOHY	I
	Příloha 1: Publikované výsledky.....	I
	Příloha 2: Predikce sekundárního uspořádání transkriptu <i>vgaA_{LC}</i>	XII
	Příloha 3: Mikroskopie – rozložené kanály.....	XIV

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP-binding cassette proteins	nadrodina ATP-vazebných proteinů
ARD	antibiotic resistance domain	doména antibiotické rezistence
ARE ABCF	antibiotic resistance proteins of ABCF family	proteiny antibiotické rezistence z rodiny ABCF
CAM	chloramphenicol	chloramfenikol
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CLI	clindamycin	klindamycin
CTD/CTE	C-terminal domain/extension	C-terminální doména/prodloužení
ERY	erythromycin	erythromycin
LIN	lincomycin	linkomycin
LS _A P	lincosamides, streptogramins A, pleuromutilins	linkosamidy, streptograminy A, pleuromutiliny
MFS	major facilitator superfamily	hlavní nadrodina přenašečů
MIC	minimal inhibitory concentration	minimální inhibiční koncentrace
MLS _B	macrolides, lincosamides, streptogramins B	makrolidy, linkosamidy, streptograminy B
MRSA	methicilin-resistance <i>Staphylococcus aureus</i>	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NBD	nucleotid-binding domain	nukleotid-vazebná doména
NPET	nascent peptide exit tunnel	výstupní kanál nascentního peptidu
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PhO	phenicols, oxazolidinones	fenikoly, oxazolidinony
PIIA	pristinamycin IIA	pristinamycin IIA
PRE	pH-responsive RNA element	RNA element citlivý ke změnám pH
PTC	peptidyl transferase center	peptidyltransferasové centrum
PtIM	P-site tRNA interaction motif	peptidyl-tRNA interakční motiv
r5'UTR	regulatory 5' untranslated region of mRNA	regulační element lokalizovaný v 5' koncové nepřekládané oblasti mRNA
RBS	ribosome binding site (for structural gene)	ribozom-vazebné místo (pro strukturální gen)
RBS'	ribosome binding site (for uORF)	ribozom-vazebné místo (pro uORF)
RT	reverse transcription/reverse transcriptase	reverzní transkripce/reverzní transkriptasa
RT-PCR	reverse transcription – polymerase chain reaction	reverzní transkripce a následná polymerasová řetězová reakce
SPI	spiramycin	spiramycin
SRC	stalled ribosomal complex	uzamčený ribozomální komplex
TET	tetracycline	tetracyklin
TIA	tiamulin	tiamulin
TMD	transmembrane domain	transmembránová doména
uORF	upstream open reading frame	upstream lokalizovaný otevřený čtecí rámec
WB	western blot	western blot

1 ÚVOD

Ještě na počátku minulého století byly infekční nemoci hlavní příčinnou úmrtí. Zásadní změna přišla v průběhu 40. let, kdy byla do klinické praxe zavedena antibiotika, která úmrtnost spojenou s infekčními onemocněními výrazně snížila. Problém s bakteriálními infekcemi ale definitivně vyřešen nebyl. Bakterie se na vzniklý silný selekční tlak začaly rychle adaptovat a důsledkem je, že antibiotika postupně ztrácí svou původní účinnost.

Podle Světové zdravotnické organizace platí v současnosti antimikrobiální rezistence za jednu z nejvýznamnějších hrozeb pro veřejné zdraví (World Health Organisation, 2020). Velkou potíží představují zejména nosokomiální patogeny *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp. (souhrnně ESKAPE), které nezdávka vykazují antibiotickou multirezistenci. Předpokládá se, že během několika málo let nebudeme schopni infekce způsobené těmito patogeny vůbec léčit (Mulani et al., 2019; Rice, 2008).

Z pohledu bakterie však nemusí velké množství rezistenčních genů v genomu znamenat jednoznačnou výhodu. Pokud není antibiotikum v prostředí právě přítomno, znamená exprese rezistenčních determinant velmi často snížení fitness projevující se zejména zpomalením růstu a jinými defekty (Andersson and Hughes, 2010; Andersson and Levin, 1999). Rezistenční mechanismy jsou často založeny na modifikaci zásahového místa antibiotika. Každá taková změna zvyšující odolnost dané buněčné komponenty ale s sebou zároveň nese i riziko snížení její funkčnosti. Takovým příkladem mohou být rezistenční geny *erm* kódující enzym pro modifikaci ribozomu. Jeho činností se ribozom stává odolným vůči mnoha ribozom-vazebným antibiotikům, zároveň ale tato modifikace vede k narušení syntézy řady proteinů (Gupta et al., 2013). Přítěží ale může být také produkce enzymu štěpícího antibiotikum. Bylo ukázáno, že neregulovaná exprese β -laktamasy AmpC snižuje růstovou rychlost a invazivitu buněk salmonely (Morosini et al., 2000).

Negativní vliv nadprodukce určitého proteinu je možné omezit zajištěním inducibility jeho exprese. Proto také exprese mnoha rezistenčních genů je důsledně regulována a spouštěna pouze v odpovědi na přítomnost antibiotika (Dar and Sorek, 2017). Výhodou je nejen zachování fitness v nepřítomnosti antibiotika, ale také zamezení plýtvání zdroji a energií. Inducibilně exprimované rezistenční geny se mezi bakteriemi snáze šíří a v populaci přetrvávají déle (Chancey et al., 2012; Depardieu et al., 2007).

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem inducibility genové exprese stafylokokového proteinu Vga_{ALC}, který udílí rezistenci k antibiotikům cílícím na ribozom.

2 CÍLE PRÁCE

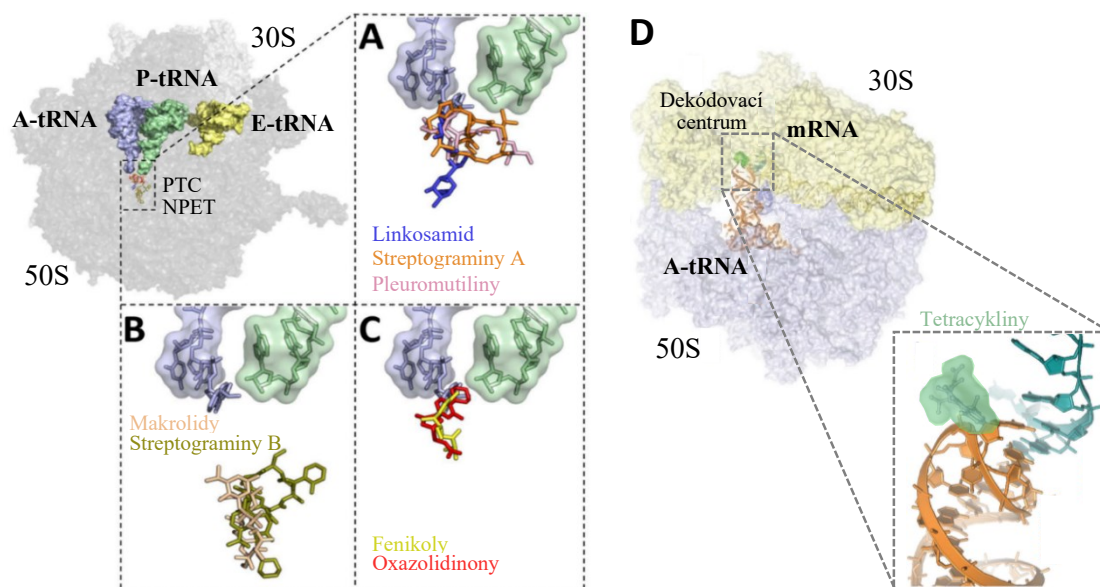
Experimentální část diplomové práce si klade za cíl objasnit na molekulární úrovni mechanismus přirozené inducibilní exprese genu *vgaALC* pocházejícího ze *Staphylococcus haemolyticus*, který kóduje rezistenční ARE ABCF protein. A dále pak ukázat buněčnou lokalizaci tohoto proteinu exprimovaného z vlastního promotoru. Hlavních dvou cílů bylo dosaženo plněním dílčích cílů, které jsou uvedeny v následujících bodech:

1. Prokázat regulaci ribozomem zprostředkovanou atenuací u genu *vgaALC*
 - Ukázat, že exprese *vgaALC* je regulována prostřednictvím 5'UTR oblasti mRNA
 - Identifikovat uORF a ukázat nezbytnost jeho přítomnosti pro indukci genové exprese
 - Ukázat nezbytnost vazby antibiotika do ribozomu pro indukci genové exprese
2. Určit, zda se jedná o regulaci na úrovni transkripce či translace
 - Pomocí RT-PCR ukázat, zda je transkripce v přítomnosti linkomycinu předčasně ukončována či nikoli
3. Otestovat vliv rezistenčního fenotypu VgaA variant na antibiotickou specifitu indukce genové exprese
 - Připravit mutantní varianty proteinu Vga_{ALC} s posunutou antibiotickou specifitou a sledovat vliv na antibiotickou specifitu indukce genové exprese
4. Ukázat závislost antibiotické specifity indukce genové exprese na délce a aminokyselinové sekvenci vedoucího peptidu v nepřítomnosti rezistenčního proteinu
 - Připravit sadu mutantních variant regulační oblasti *vgaALC* s pozměněným uORF a sledovat vliv na antibiotickou specifitu indukce genové exprese
5. Pomocí fluorescenční mikroskopie určit buněčnou lokalizaci rezistenčního proteinu Vga_{ALC} exprimovaného v přirozeném množství v přítomnosti různých koncentrací indukujícího antibiotika linkomycinu v různých růstových fázích

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 ANTIBIOTIKA BLOKUJÍCÍ TRANSLACI

Bakteriální proteosyntéza je nejčastějším cílem působení antimikrobiálních látek v buňce (Wilson, 2014). K inhibici translace dochází nejčastěji v důsledku vazby těchto látek do velké (50S) či malé (30S) ribozomální podjednotky, případně na další komponenty translační mašinerie (např. elongační faktory EF-G a EF-Tu) (Wilson, 2009). Předložená diplomová práce se zabývá skupinami antibiotik, které indukují expresi rezistenčních genů různých typů regulovaných ribozomem zprostředkovanou atenuací. Jedná se o makrolidy, linkosamidy, streptograminy, pleuromutiliny, fenikoly a oxazolidinony cílící na 50S podjednotku ribozomu (k těmto antibiotikům udílí rezistenci ARE ABCF proteiny) (Obr. 1A-C), a dále tetracykliny cílící na 30S podjednotku ribozomu (Obr. 1D).



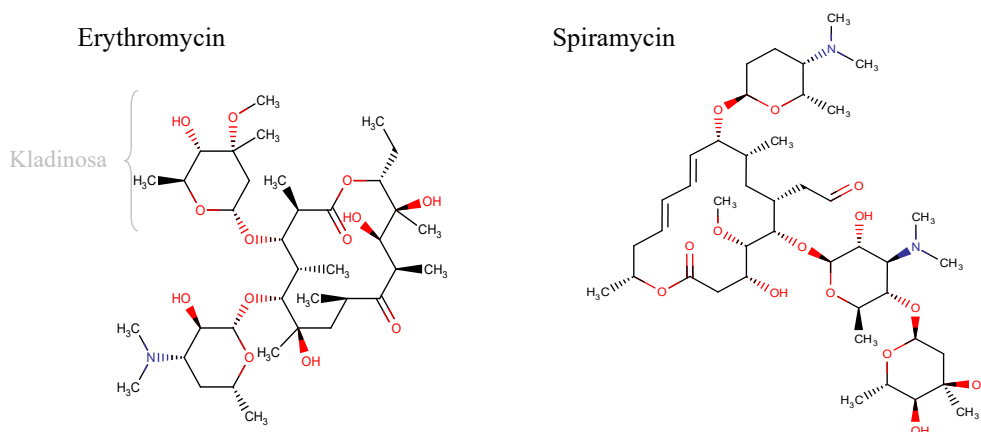
Obr. 1: Vazebná místa vybraných skupin antibiotik cílících na 50S a 30S ribozomální podjednotku. (A) Linkosamidy, streptograminy A a pleuromutiliny se vážou na 50S podjednotku do těsné blízkosti peptidyltransferasového centra (PTC). (B) Makrolidy a streptograminy B se vážou na 50S podjednotku dále do výstupního tunelu nascentního peptidu (NPET). (C) Fenikoly a oxazolidinony se vážou na 50S podjednotku do těsné blízkosti PTC. (D) Tetracykliny se vážou na 30S podjednotku do blízkosti dekódovacího centra. (Nguyen et al., 2014; Sharkey and O'Neill, 2018) – upraveno

3.1.1 MAKROLIDY

Makrolidová antibiotika jsou používána v klinické praxi od 50. let minulého století (Hutchings et al., 2019) a mají velmi široké spektrum účinku. Užívají se pro potlačení infekcí způsobených především grampozitivními koky (mimo enterokoky) a také dalšími

grampozitivními a gramnegativními bakteriemi, anaerobními a intracelulárními patogeny (Katz and Ashley, 2005). V České republice tvořila spotřeba makrolidů společně s linkosamidy a streptograminy za rok 2019 více než pětinu celkové spotřeby všech antibakteriálních látek (statistika ECDC). Makrolidová antibiotika jsou produkována převážně půdními aktinomycetami, nebo mají semisyntetický původ (Katz and Ashley, 2005).

Makrolidy sestávají z typického makrolaktonového kruhu (14-členný, 15-členný, nebo 16-členný), na který mohou být napojeny neutrální cukry, aminocukry, případně další skupiny (Kannan and Mankin, 2011). Makrolaktonový kruh jako celek a jeho postranní řetězce určují vazebnou afinitu antibiotika k ribozomu. Tyto postranní skupiny jsou v přímém kontaktu s nukleotidy rRNA a určují tak konkrétní mechanismus působení daného makrolidu a jeho schopnost indukovat expresi rezistenčních genů. Naopak variace ve struktuře makrolaktonového kruhu ovlivňují způsob vazby antibiotika a způsob inhibice proteosyntézy jen nepatrně (Dunkle et al., 2010; Hansen et al., 2002; Kannan and Mankin, 2011). Na obrázku níže (Obr. 2) je ukázána struktura erythromycinu (14-členný makrolid obsahující kladinosu) a spiramycinu (16-členný makrolid), které byly použity v rámci experimentální části této práce.



Obr. 2: Chemická struktura erythromycinu (14-členný makrolid) a spiramycinu (16-členný makrolid).
Obrázky byly získány z databáze DrugBank (<https://go.drugbank.com/>).

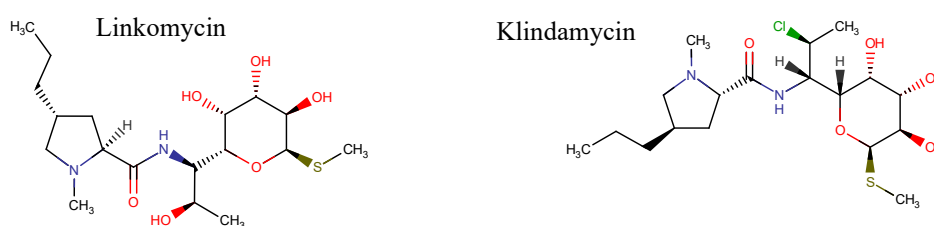
Makrolidy se vážou do výstupního kanálu nascentního peptidu (NPET) nedaleko peptidyltransferasového centra (PTC), čímž způsobují jeho ztuhlání (Dunkle et al., 2010; Schlünzen et al., 2001; Tu et al., 2005). Původně se předpokládalo, že toto ztuhlání vede u všech proteinů bez rozdílu k předčasnému ukončení jejich elongace (po polymeraci dvou až deseti aminokyselin (Tenson et al., 2003)) a odpoutání peptidyl-tRNA z ribozomu (Menninger and Otto, 1982; Otaka and Kaji, 1975; Tenson et al., 2003). Relativně nedávno se však ukázalo, že většina makrolidů inhibuje tvorbu peptidové vazby pouze ve specifickém kontextu, tedy v závislosti na aminokyselinové sekvenci nascentního peptidu (Hardesty et al., 1990; Kannan

et al., 2012, 2014; Starosta et al., 2010). Například v přítomnosti erythromycinu není syntéza narušena přibližně u 5 % proteinů (Kannan et al., 2012), v případě spiramycinu u 15 % (Poulsen et al., 2000) a v případě pikromycinu dokonce až u 40 % proteinů (Almutairi et al., 2017). U tzv. vedoucích peptidů (regulační čtecí rámce genů regulovaných ribozomem zprostředkovanou atenuací; viz odd. 3.3) pak dochází za určitých podmínek k programovanému „uzamknutí“ ribozomu na mRNA, aniž by nastal rozpad ribozomálního komplexu a uvolnění peptidyl-tRNA (Arenz et al., 2014b, 2014a; Johansson et al., 2014; Ramu et al., 2011; Vázquez-Laslop et al., 2008; Weisblum, 1995a).

3.1.2 LINKOSAMIDY

Linkosamidy jsou malou přesto klinicky významnou skupinou antibiotik používanou zejména proti grampozitivním bakteriím, anaerobním bakteriím a některým protozoím (Spížek and Řezanka, 2017). Patří mezi ně přirozená antibiotika linkomycin a celesticetin, která jsou produkována streptomycetami, a dále několik semisyntetických derivátů linkomycinu, které se vyznačují lepší účinností a širším spektrem účinku. V současnosti je v praxi nepoužívanějším linkosamidem právě semisyntetický klindamycin, naopak linkomycin se z důvodu časté rezistence v praxi již nevyužívá (Schwarz et al., 2016).

Linkosamidová antibiotika se skládají z alkylovaného prolinu, který je peptidickou vazbou propojen s aminocukrem (Bryskier, 2005). Na obrázku níže (Obr. 3) je ukázána struktura linkomycinu a klindamycinu, které byly použity v rámci experimentální části této práce.

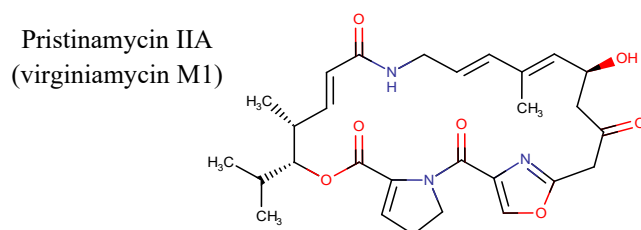


Obr. 3: Chemická struktura linkomycinu a semisyntetického klindamycinu. Obrázky byly získány z databáze DrugBank (<https://go.drugbank.com/>).

Linkosamidy se vážou do oblasti PTC a znemožňují aminoacyl-tRNA zaujmout optimální polohu v A-místě ribozomu, čímž inhibují peptidyltransferasovou reakci (Dunkle et al., 2010; Schlünzen et al., 2001; Tu et al., 2005). Výsledkem je uvolnění peptidyl-tRNA z ribozomu po polymeraci dvou až čtyř aminokyselin (Menninger and Coleman, 1993; Tenson et al., 2003).

3.1.3 STREPTOGRAMINY

Streptograminy zahrnují dvě podskupiny označované A a B, které se liší svou chemickou strukturou a vazebným místem na ribozomu. Streptograminy A jsou polynesaturované makrolaktony vázající se do těsné blízkosti PTC, zatímco streptograminy B jsou cyklické hexadepsipeptidy vázající se do NPET nedaleko PTC (Hansen et al., 2003; Harms et al., 2004; Tu et al., 2005). Streptograminy zahrnují přirozená antibiotika produkovaná streptomycetami (v podobě směsi streptograminů A a B) a několik semisyntetických variant. Streptograminy jsou účinné zejména proti grampozitivním bakteriím (Mast and Wohlleben, 2014). Na obrázku níže (Obr. 4) je ukázána struktura pristinamycinu IIA (neboli virginiamycin M1) (streptogramin A), který byl použit v rámci experimentální části této práce.



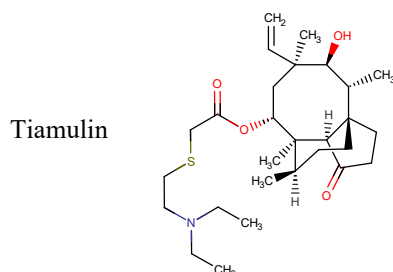
Obr. 4: Chemická struktura pristinamycinu IIA. Obrázek byl získán z databáze DrugBank (<https://go.drugbank.com/>).

Streptograminy A pozměňují konformaci ribozomálního A- a P-místa. Důsledkem je, že aminoyacyl-tRNA nemůže zaujmout optimální polohu v ribozomu a peptidyltransferasová reakce je inhibována (Chinali et al., 1984). Streptograminy B nebrání přímo vzniku peptidové vazby, ale inhibují elongaci nascentního proteinu a způsobují uvolnění peptidyl-tRNA po polymeraci přibližně šesti aminokyselin (Chinali et al., 1988a, 1988b; Tenson et al., 2003). Streptograminy A a B aplikované odděleně mají bakteriostatický efekt, ve směsi ale fungují synergicky a mají baktericidní efekt (Cocito et al., 1997).

3.1.4 PLEUROMUTILINY

Pleuromutiliny jsou využívány především ve veterinární medicíně, nicméně postupně jsou zaváděny také do té humánní (Goethe et al., 2019). Jejich spektrum účinku zahrnuje zejména bakterie grampozitivní aerobní i anaerobní a některé bakterie gramnegativní (Schwarz et al., 2016). V klinické praxi jsou využívány semisyntetické deriváty (např. tiamulin, retapamulin, lefamulin) (Goethe et al., 2019), které jsou odvozené od pleuromutilinu produkovaného basidiomycetami rodu *Clitopilus* (Kavanagh et al., 1951).

Struktura pleuromutilinů zahrnuje tricyklické mutilinové jádro (5-členný, 6-členný a 8-členný kruh), jehož čtrnáctý uhlík nese výrazný postranní řetězec, který je charakteristický pro jednotlivé typy pleuromutilinů (Goethe et al., 2019). Na obrázku níže (Obr. 5) je ukázána struktura tiamulinu, který byl použit v rámci experimentální části této práce.

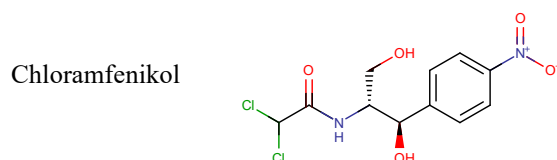


Obr. 5: Chemická struktura tiamulinu. Obrázek byl získán z databáze DrugBank (<https://go.drugbank.com/>).

Pleuromutiliny se vážou do oblastí PTC. Jejich mutilinové jádro a výrazný postranní řetězec zasahují do A-místa, resp. P-místa ribozomu, a blokují tak peptidyltransferasovou reakci (Davidovich et al., 2007; Gürel et al., 2009; Schlünzen et al., 2004).

3.1.5 FENIKOLY

Fenikoly jsou širokospektrá antibiotika, která byla hojně využívána v klinické praxi do 60. let 20. století, kdy byla odhalena jejich vysoká toxicita. Z tohoto důvodu se fenikoly v současnosti využívají jen ve výjimečných případech v humánní medicíně a omezeně ve veterinární medicíně (Schwarz et al., 2004). Skupina fenikolů zahrnuje chloramfenikol produkovaný streptomycetami (Ehrlich et al., 1947) a několik jeho semisyntetických derivátů, např. florfenikol a thiamfenikol (Schwarz et al., 2004). Na obrázku níže (Obr. 6) je ukázána struktura chloramfenikolu, který byl použit v rámci experimentální části této práce.



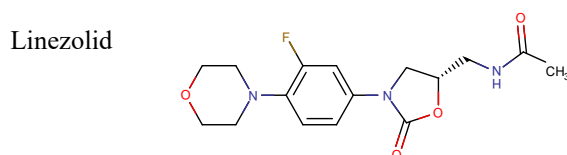
Obr. 6: Chemická struktura chloramfenikolu. Obrázek byl získán z databáze DrugBank (<https://go.drugbank.com/>).

Fenikoly se vážou do oblasti PTC a znemožňují tvorbu peptidové vazby pravděpodobně narušením optimální orientace aminokyselin účastnících se této reakce (Bulkley et al., 2010; Choi et al., 2020; Dunkle et al., 2010; Hansen et al., 2003; Schlünzen et al., 2001). Původně se

předpokládalo, že tato antibiotika fungují jako univerzální inhibitory proteosyntézy (Wilson, 2011), nicméně nedávno se zjistilo, že translaci inhibují pouze ve specifickém kontextu (Marks et al., 2016). Chloramfenikol nejefektivněji blokuje translaci, pokud se na předposlední pozici nascentního peptidu (pozice -1) nachází alanin, případně serin nebo threonin (Choi et al., 2020; Marks et al., 2016). Naopak pokud se na poslední pozici nascentního peptidu (pozice 0) nachází glycin nebo pokud tato aminokyselina přichází v podobně glycyl-tRNA (pozice +1) translace narušena není (Choi et al., 2020; Marks et al., 2016). Chloramfenikol nezpůsobuje uvolnění peptidyl-tRNA z ribozomu, ale vyvolává uzamčení ribozomu na mRNA (Wilson, 2009).

3.1.6 OXAZOLIDINONY

Oxazolidinony zahrnují výhradně syntetická antibiotika, která jsou účinná proti širokému spektru gram pozitivních aerobních i anaerobních mikroorganismů (Wilson, 2009). Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je linezolid (Obr. 7), který byl zaveden do klinické praxe v roce 2000 (Wilson, 2009).



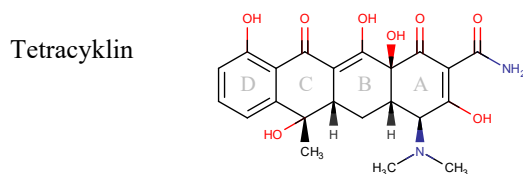
Obr. 7: Chemická struktura linezolidu. Obrázek byl získán z databáze DrugBank (<https://go.drugbank.com/>).

Přestože se linezolid svou chemickou strukturou značně liší od výše zmíněného chloramfenikolu, sdílí obě tato antibiotika vazebné místo a také mechanismus účinku. Linezolid se váže do ribozomálního A-místa, čímž brání aminoacyl-tRNA v zaujetí optimální polohy pro syntézu nové peptidové vazby (Ippolito et al., 2008; Kloss et al., 1999; Leach et al., 2007; Wilson et al., 2008). K inhibici proteosyntézy dochází ve specifickém kontextu, nejefektivněji pokud se na předposlední pozici nascentního peptidu nachází alanin, případně serin nebo threonin. Naopak přítomnost glycinu na poslední pozici nascentního peptidu nebo přistupující glycyl-tRNA neutralizují inhibiční efekt antibiotika (Choi et al., 2020; Marks et al., 2016).

3.1.7 TETRACYKLINY

Skupina tetracyklinů zahrnuje látky přírodního původu produkované půdními streptomycetami a látky semisyntetické, které jsou od těchto odvozené (Nguyen et al., 2014). Jedná se o širokospektrá antibiotika účinkující proti řadě gram pozitivních a gramnegativních

bakterií, včetně obligátně intracelulárních patogenů. Jejich význam v klinické praxi nicméně postupně klesá z důvodu rychle se šířící rezistence (Grossman, 2016). Chemická struktura tetracyklinů zahrnuje charakteristické tzv. DCBA naftacenové jádro, na které jsou připojené funkční skupiny (Nguyen et al., 2014). Na obrázku níže (Obr. 8) je ukázána struktura tetracyklinu, který byl použit v rámci experimentální části této práce.



Obr. 8: Chemická struktura tetracyklinu. Obrázek byl získán z databáze DrugBank (<https://go.drugbank.com/>).

Primární vazebné místo tetracyklinů se nachází na 30S podjednotce ribozomu v oblasti dekódovacího centra, kde dochází k párování mezi kodonem mRNA a antikodonem aminoacyl-tRNA (Brodersen et al., 2000; Jenner et al., 2013; Pioletti et al., 2001). Toto vazebné místo se částečně překrývá s vazebným místem antikodonového ramena tRNA, v důsledku čehož se ternární komplex aminoacyl-tRNA•EF-Tu•GTP nemůže stabilně vázat a translace je zastavena. Konkrétně se jedná o sterický překryv kruhů D a C naftacenového jádra tetracyklinu s prvním nukleotidem antikodonu aminoacyl-tRNA, který interaguje s třetí (tzv. wobble) bází kodonu mRNA (Brodersen et al., 2000; Jenner et al., 2013; Nguyen et al., 2014; Wilson, 2009).

3.2 BAKTERIÁLNÍ ABCF PROTEINY

Nadrodina ABC ATPas (ATP-binding cassette) představuje jednu z největších, nejrozšířenějších a nejancestrálnějších skupin proteinů, která se vyskytuje u bakterií, archaeí, eukaryot i některých virů (Caetano-Anollés et al., 2011; Krishnan et al., 2020; Murina et al., 2019; Thomas and Tampé, 2020). ABC proteiny se dělí do osmi rodin označovaných abecedně ABCA až ABCH (Dean et al., 2001; Murina et al., 2019). Velká většina těchto proteinů funguje jako membránový importér či exportér transportující množství různých typů látek (např. ionty, lipidy, antibiotika, toxiny, vitaminy nebo peptidy). Cytosolické ABC proteiny (rodiny E a F) se pak podílejí na opravě DNA, účastní se translace a její regulace, nebo udílejí rezistenci k ribozom-vazebným antibiotikům blokujícím translaci (mechanismem ochrany cílového místa, nikoli effluxem) (Davidson et al., 2008; Fostier et al., 2020; Sharkey et al., 2016).

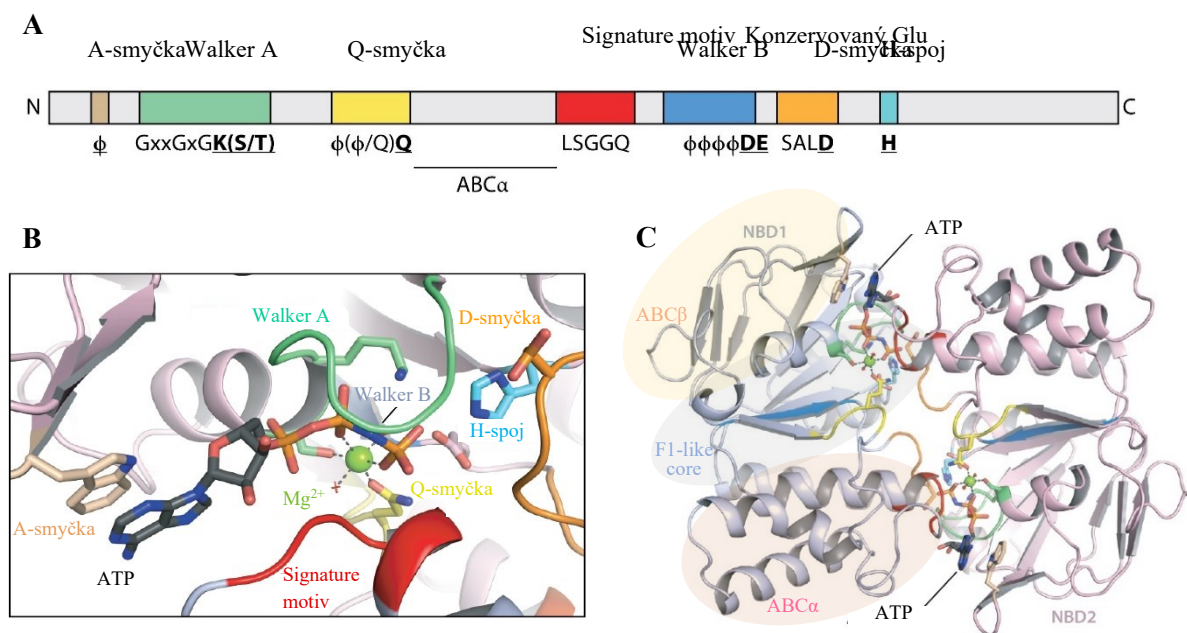
Společnou vlastností všech ABC proteinů je přítomnost dvou vysoce konzervovaných hydrofilních ABC domén (označovaných také jako NBD – nukleotid-vazebné domény), jejichž

funkcí je vazba a hydrolýza ATP. Většina ABC proteinů má dále dvě variabilní transmembránové domény (TMD). Tyto domény zcela chybí u zmiňovaných cytosolických proteinů s netransportní funkcí (Kerr, 2004; Rees et al., 2009).

V následujících podkapitolách je detailněji charakterizována bakteriální rodina ABCF zahrnující translační regulátory a proteiny antibiotické rezistence včetně proteinu Vga_{ALC}, kterému se věnuje tato diplomová práce.

3.2.1 STRUKTURA A FUNKCE

Všechny ABCF proteiny se skládají ze dvou NBD domén (NBD₁ a NBD₂), které jsou součástí jednoho polypeptidového řetězce (Boël et al., 2014; Fostier et al., 2020). Každá z těchto domén pak obsahuje tři subdomény: tzv. F1-like core, subdoménu ABC α skládající se ze třech α -helixů a subdoménu ABC β skládající se ze třech antiparalelních β -sheetů (Obr. 9C) (Davidson et al., 2008; Fostier et al., 2020). F1-like core obsahuje dva význačné sekvenční motivy Walker A a Walker B, které byly poprvé identifikovány u F1 ATPasy (Walker et al., 1982). Motiv Walker A (GxxGxGKS/T; x je libovolná aminokyselina) je označován také jako P-smyčka, neboť tvoří vodíkové vazby s fosfáty ATP, čímž ho udržuje ve správné orientaci a podílí se na jeho hydrolýze. Motiv Walker B ($\varphi\varphi\varphi\varphi$ D; φ je hydrofobní aminokyselina) prostřednictvím svého aspartátu vytváří koordinační vazbu s iontem Mg²⁺, který funguje jako kofaktor enzymatického štěpení ATP. Těsně za Walker B motivem se nachází konzervovaný glutamát, který hraje zásadní roli v hydrolýze ATP, neboť polarizuje molekulu vody. Pokud je tento glutamát zaměněn za glutamin (tzv. EQ mutace), protein ztrácí schopnost štěpit ATP. Součástí F1-like core je dále A-smyčka, D-smyčka, Q-smyčka a H-spoj. A-smyčka obsahuje aromatickou aminokyselinu, která vytváří stacking interakce s adeninem ATP a udržuje ho tak ve vhodné orientaci. D-smyčka je tvořena konzervovanou aminokyselinovou sekvencí SALD a zajišťuje optimální orientaci molekuly vody pro hydrolýzu ATP. Q-smyčka je spojkou mezi F1-like core a subdoménou ABC α a obsahuje konzervovaný glutamin, který se podílí na vazbě fosfátu ATP. H-smyčka prostřednictvím histidinu váže fosfáty ATP a stabilizuje tranzitní stav katalyzované hydrolýzy. Součástí subdomény ABC α je tzv. signature motiv, vysoce konzervovaný motiv unikátní pro ABC proteiny o aminokyselinové sekvenci LSGGQ/E, který se podílí na vazbě a hydrolýze ATP. Každá ze dvou molekul ATP je vázána oběma NBD doménami za vzniku tzv. ATP-sendviče – ATP je vázáno signature motivem NBD₁ a motivy Walker A, Walker B, A-smyčkou, Q-smyčkou a H-spojem NBD₂ (Obr. 9B) (Boël et al., 2014; Fostier et al., 2020; Thomas and Tampé, 2020).



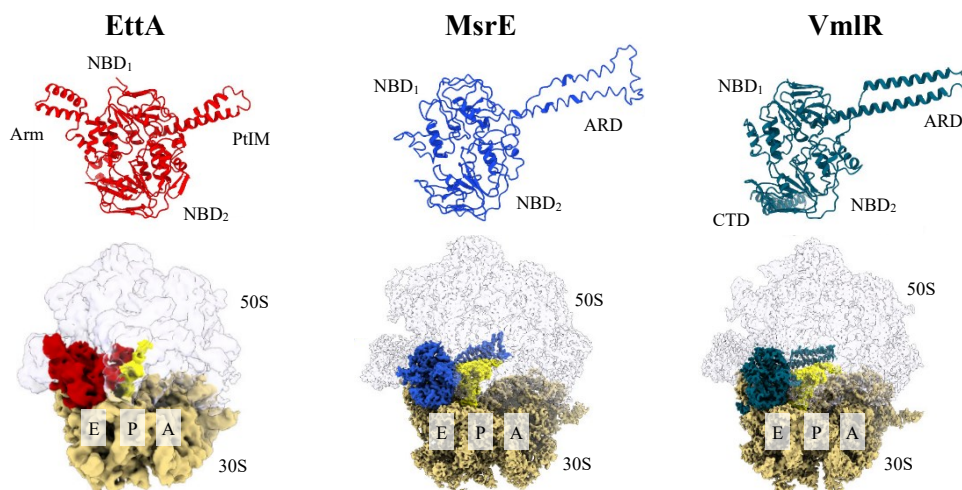
Obr. 9: Obecná struktura NBD domény ABC proteinů. (A) Lineární uspořádání význačných sekvenčních motivů uvnitř NBD domény. **(B)** Nukleotid-vazebné místo. Aminokyselinové zbytky důležité pro vazbu a hydrolyzu jsou znázorněny tyčinkovým modelem, kofaktor Mg²⁺ jako zelená kulička. **(C)** Terciární uspořádání dvou nukleotid-vazebných domén. (Thomas and Tampé, 2020) – upraveno

Definujícím znakem ABCF proteinů je výrazný interdoménový linker spojující obě NBD domény (Obr. 10) (Murina et al., 2019; Ousalem et al., 2019), jehož koncová část se u rezistenčních proteinů označuje jako doména antibiotické rezistence (ARD) (Crowe-McAuliffe et al., 2018) a u nerezistenčních proteinů jako peptidyl-tRNA interakční motiv (PtIM) (Boěl et al., 2014). Linker se skládá ze dvou α -helixů oddělených smyčkou (Chen et al., 2014; Crowe-McAuliffe et al., 2018, 2020; Su et al., 2018) a dosahuje délky 60 až 100 aminokyselin (delší linkery jsou typické pro rezistenční proteiny) (Boěl et al., 2014; Murina et al., 2019). Tato struktura nápadně vyčnívající do prostoru představuje klíčovou funkční část proteinu, neboť pomocí ní se ABCF protein dostává skrz ribozomální E-místo do přímého kontaktu s vnitřkem ribozomu, kde plní svou úlohu (platí alespoň pro ABCF proteiny, u nichž byla objasněna jejich funkce) (Obr. 10) (Boěl et al., 2014; Chen et al., 2014; Crowe-McAuliffe et al., 2018, 2020; Murina et al., 2018, 2019; Ousalem et al., 2019; Sharkey et al., 2016; Su et al., 2018).

U některých bakteriálních ABCF proteinů je dále přítomna tzv. arm subdoména, která je součástí NBD₁ a podobně jako linker vyčnívá do prostoru (Obr. 10) (Murina et al., 2019; Ousalem et al., 2019). V případě bakteriálního ABCF proteinu EttA je arm subdoména v přímém kontaktu s výčnělkem ribozomálního proteinu L1 a omezuje jeho dynamiku (Boěl et al., 2014; Chen et al., 2014). Subdoména arm je přítomna také u některých rezistenčních proteinů (zejména u proteinů vyskytujících se u producentů antibiotik; Obr. 11) (Murina et al.,

2019). Její funkce zde však není zcela objasněna. Předpokládá se, že stejně jako u EttA proteinu moduluje aktivitu ribozomu (Koběrská et al., 2021).

Poslední významnou strukturou je C-terminální prodloužení či C-terminální doména (CTE, resp. CTD), která směřuje k mRNA výstupnímu kanálu ribozomu. Stejně jako subdoména arm je CTD doména pro ABCF proteiny specifická, nevyskytuje se však u všech proteinů této skupiny (Obr. 11) (Murina et al., 2019; Ousalem et al., 2019). Funkce CTD není zcela objasněna. Její delece u rezistenčních proteinů VmlR a VgaA ale vede ke snížení úrovně udělované rezistence (Crowe-McAuliffe et al., 2018; Jacquet et al., 2008). U ABCF proteinu Uup bylo ukázáno, že jeho CTD doména váže DNA, není nicméně jasné, zda se jedná o její primární funkci (Burgos Zepeda et al., 2010; Carlier et al., 2012; Murina et al., 2019).



Obr. 10: Struktura vybraných ABCF proteinů a jejich vazebné místo na ribozomu. ABCF proteiny se skládají ze dvou NBD domén, které jsou spojeny linkerem označovaným PtIM u non-ARE proteinů a ARD u ARE proteinů. Přítomna může být arm subdoména a/nebo CTD doména. Všechny dosud charakterizované ABCF proteiny se vážou do E-místa ribozomu. Krátký linker EttA se dostává do kontaktu s tRNA v P-místě. Dlouhé linkery ARE proteinů deformují tRNA v P-místě a zasahují až do oblasti PTC (VmlR) či NPET (MsrE). (Fostier et al., 2020) – upraveno

Jak již bylo naznačeno, funkce všech dosud charakterizovaných bakteriálních ABCF proteinů je spjata s translací, a to zejména s translací ve stresových podmínkách. Nutno ale dodat, že funkce většiny z nich zůstává prozatím neobjasněna (Fostier et al., 2020). Nejprostudovanější v rámci rodiny ABCF jsou proteiny udílející rezistenci k antibiotikům blokujícím translaci, které jsou souhrnně označovány jako ARE ABCF (antibiotic resistance). Těmto proteinům je věnována samostatná podkapitola 3.2.2.

Prvním ABCF proteinem, který byl detailně charakterizován, je translační regulátor iniciační fáze proteosyntézy EttA (energy-dependent translational throttle A), který patří mezi nejrozšířenější bakteriální ABCF proteiny (Boěl et al., 2014; Chen et al., 2014; Murina et al., 2019). Předpokládá se, že tento protein monitoruje energetický stav buňky a na jeho základě

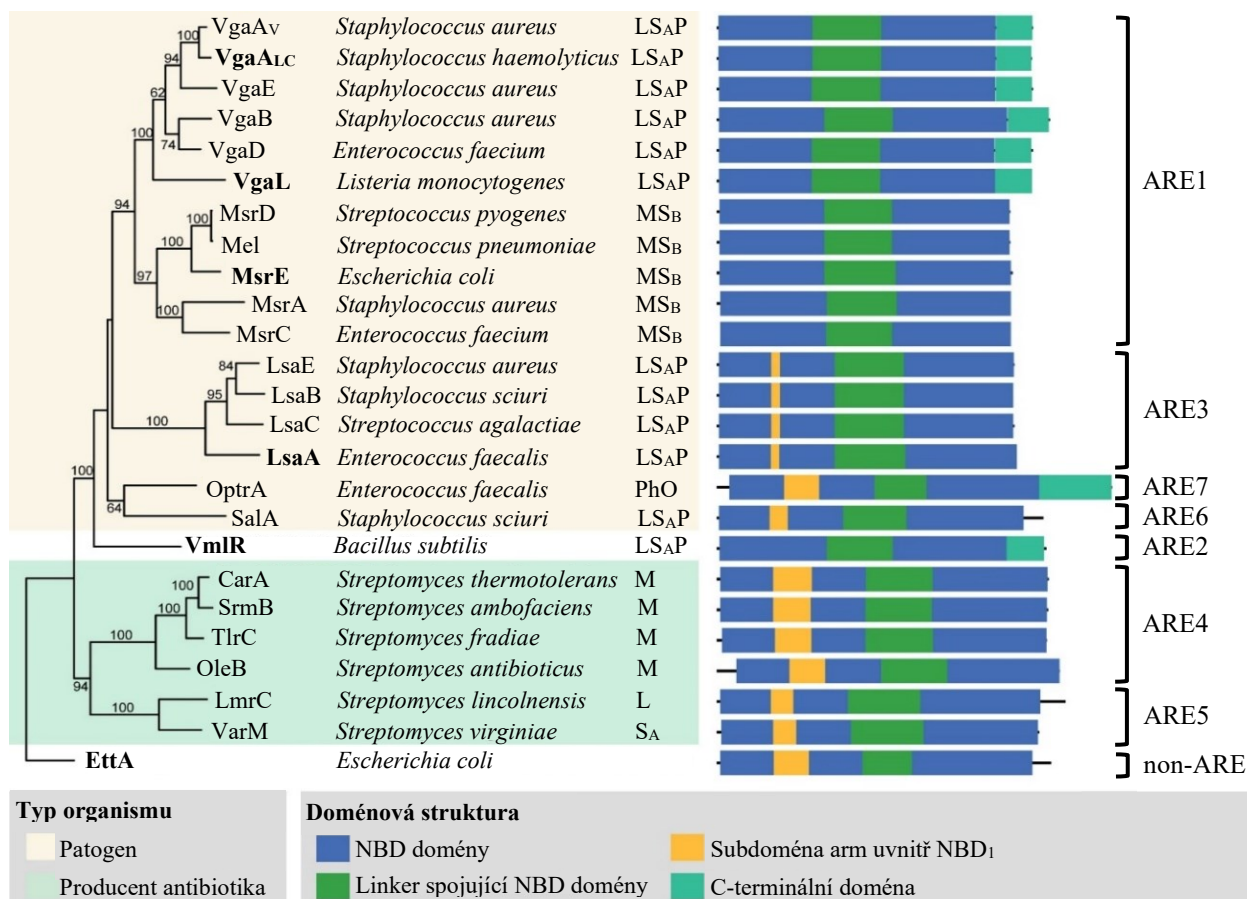
pak inhibuje, nebo stimuluje syntézu první peptidové vazby. EttA se s navázaným ADP/ATP váže do E-místa ribozomálního iniciačního komplexu způsobem, kdy svou PtIM doménou interaguje s iniciátorovou tRNA^{Met} v P-místě a svou arm subdoménou s výčnělkem ribozomálního proteinu L1. EttA s navázaným ATP stabilizuje CCA akceptorové rameno P-tRNA, čímž podporuje tvorbu peptidové vazby. Protože interakce EttA s ribozomem zároveň stimuluje štěpení ATP navázaného na translační faktor, dochází k hydrolyze této molekuly a k odpoutání EttA z ribozomu. Ribozom následně vstupuje do elongační fáze a přestává být vůči EttA citlivý (E-místo je obsazeno odstupující tRNA). V případě vazby ADP na EttA (buňka je energeticky vyčerpaná) zůstává protein na ribozomu navázán déle, neboť není stimulována jeho disociace. Protože arm subdoména translačního faktoru omezuje dynamiku ribozomu, dostává se ribozom do tzv. hibernačního stavu a translace neprobíhá. Pro buňku je činnost proteinu EttA klíčová zejména v pozdní stacionární fázi, kdy jsou buňky energeticky vyčerpané (poměr ATP/ADP je nízký). Jeho delece totiž znamenala pro *E. coli* v této růstové fázi značné snížení fitness a v důsledku toho snížení schopnosti kompetice (Boěl et al., 2014; Chen et al., 2014).

Bližší charakterizace ostatních ABCF proteinů chybí. Pouze pro EttA paralogy YheS, YbiT a Uup a protein YdiF se předpokládá, že fungují jako translační faktory (Murina et al., 2019).

3.2.2 ARE ABCF

Rezistenční ABCF proteiny (ARE ABCF) udílejí rezistenci k antibiotikům, která se vážou do oblasti PTC a NPET velké ribozomální podjednotky a blokují tak bakteriální proteosyntézu. U ARE proteinů rozlišujeme tři rezistenční fenotypy (Obr. 11). Proteiny s LS_AP fenotypem udílejí rezistenci k linkosamidům, streptograminům A a pleuromutilinům. Proteiny s MS_B fenotypem udílejí rezistenci k makrolidům (včetně ketolidů) a streptograminům B. A proteiny s PhO fenotypem udílejí rezistenci k fenikolům a oxazolidinonům. Tato zkřížená rezistence odpovídá částečně se překrývajícím vazebným místům jednotlivých skupin antibiotik (Obr. 1) (Sharkey and O'Neill, 2018). Z fylogenetického hlediska tvoří rezistenční ABCF proteiny sedm podrodin označovaných ARE1-7 (Obr. 11) (Murina et al., 2019; Ousalem et al., 2019).

Mezi nejstudovanější ARE ABCF patří stafylokokové proteiny VgaA ze skupiny ARE1 vyskytující se v několika variantách: VgaA (Allignet et al., 1992), VgaA_V (Haroche et al., 2000), VgaA_{LC} (Novotná and Janata, 2006), VgaA_{NEW}, VgaA_{LIKE1} a VgaA_{LIKE2} (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) (čtyři posledně jmenované varianty byly popsány v naší laboratoři). Zdokumentovány jsou také další VgaA varianty, ty však nemají vlastní označení (např. Lozano et al., 2012; Mendes et al., 2011; Qin et al., 2011; Tessé et al., 2013).



Obr. 11: Fylogenetický strom a doménová struktura ARE ABCF a EttA. Fylogenetický strom byl sestaven za použití metody maximum likelihood. Čísla u jednotlivých větvení ukazují bootstrap podporu ze sta replikátů. Tučně jsou vyznačeny proteiny, pro které je k dispozici cryo-EM struktura. V tabulce je dále uveden rezistenční fenotyp: L – linkosamidy, S_A – streptograminy A, P – pleuromutiliny, M – makrolidy, S_B – streptograminy B, Ph – fenikoly, O – oxazolidinony a příslušnost k třídě ARE. Všechny ABCF proteiny obsahují domény NBD₁ a NBD₂ (modře) oddělené linkerem (zeleně). Přítomna může být subdoména arm (žlutě) nebo C-terminální doména (tyrkysově). (Murina et al., 2018, 2019) – upraveno a doplněno

Přestože se jednotlivé varianty proteinu VgaA mezi sebou na úrovni aminokyselinové sekvence většinou příliš neliší, liší se významně úrovní udělované rezistence k jednotlivým LSAP antibiotikům. Analýza tohoto fenoménu přinesla v roce 2015 (Lenart et al., 2015) první přesvědčivý důkaz pro mechanismus fungování ARE ABCF proteinů, který byl do té doby nejasný (Ousalem et al., 2019). Původně se předpokládaly dvě hypotézy: (1) asociace solubního ARE ABCF proteinu s membránovým transportérem a následný efflux antibiotika z buňky a (2) ochrana zásahového místa antibiotik (tedy ribozomu) ARE ABCF proteinem (Kerr et al., 2005). V rámci zmiňované studie z naší laboratoře (Lenart et al., 2015) bylo zjištěno, že za rozdílnou antibiotickou specificitu jednotlivých VgaA variant odpovídá aminokyselinová variabilita zejména na pozicích 212, 218, 219, 220 a 226. Tyto aminokyseliny jsou lokalizovány v hrotové oblasti linkerové domény. V kontextu o rok dříve zjištěné funkce nerezistenčního ABCF proteinu EttA na ribozomu (Boël et al., 2014; Chen et al., 2014) bylo navrženo, že také ARE ABCF proteiny se vážou na ribozom a svým (oproti EttA značně delším)

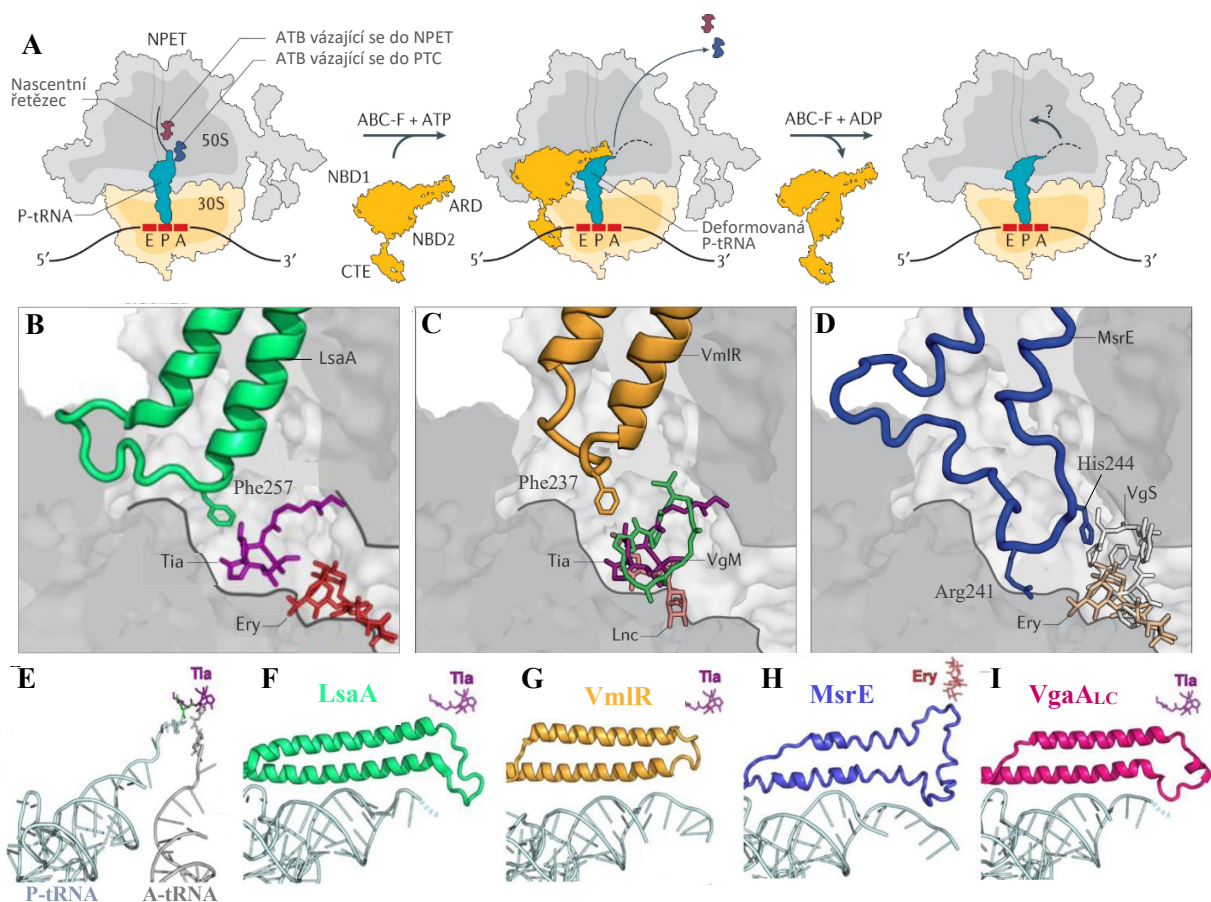
linkerem přímo či nepřímo odstraňují navázané antibiotikum z ribozomu (Lenart et al., 2015). Definitivní důkaz potvrzující tuto hypotézu přinesla v roce 2016 biochemická studie (Sharkey et al., 2016), která ukázala, že po přidání purifikovaných ARE proteinů VgaA a LsaA do *in vitro* translační eseye je z velké části neutralizován inhibiční efekt přítomného linkomycinu (L) či pristinamycinu IIA (S_A).

Rezistenční ABCF proteiny tedy udílejí rezistenci k ribozom-vazebným antibiotikům mechanismem ochrany zásahového místa (Obr. 12A). ARE protein se váže do ribozomálního E-místa a svou ARD doménou směřuje do katalytického centra ribozomu. K této vazbě dochází pouze pokud je E-místo prázdné, což typicky nastává ve fázi iniciačního komplexu nebo u ribozomu blokováného antibiotikem (Fostier et al., 2020). Zatímco EttA se preferenčně váže do E-místa iniciačního komplexu (Boël et al., 2014), ARE proteiny se vážou do antibiotiky blokováného ribozomu (ve fázi elongace či ve fázi iniciačního komplexu) (Crowe-McAuliffe et al., 2018, 2020; Su et al., 2018). Protože v ribozomálním P-místě je přítomna peptidyl-tRNA bránící linkeru v dosažení PTC, linker tuto tRNA výrazně deformuje a ohýbá její CCA akceptorové rameno směrem do A-místa mimo její kanonickou pozici (Obr. 12E-I) (Crowe-McAuliffe et al., 2018, 2020; Su et al., 2018). Tento ohyb je patrný jak v případě peptidyl-tRNA nesoucí pouze iniciační aminokyselinu fMet (Crowe-McAuliffe et al., 2020), tak i v případě peptidyl-tRNA nesoucí heptapeptid (Crowe-McAuliffe et al., 2018). Mechanismus navrácení peptidyl-tRNA s takto dlouhým nascentním řetězcem zpět do P-místa, resp. NPET není jasný. Předpokládá se, že tomuto procesu napomáhá příchozí ternární komplex doručující aminoacyl-tRNA do A-místa ribozomu (Crowe-McAuliffe et al., 2020).

Schopnost jednotlivých ARE ABCF proteinů udílet rezistenci zásadně závisí na délce linkeru a charakteru aminokyselin lokalizovaných nejen na jeho hrotu (Crowe-McAuliffe et al., 2018, 2020; Lenart et al., 2015; Novotná and Janata, 2006; Su et al., 2018). Bylo ukázáno, že fenylalanin 237 lokalizovaný na hrotu ARD domény proteinu VmlR se stericky překrývá s vazebným místem linkomycinu (L), pristinamycinu IIA (S_A) a tiamulinu (P) (Obr. 12C). Přesto však záměna tohoto fenylalaninu za výrazně menší alanin, který se přímo nepřekrývá s vazebným místem uvedených antibiotik, nevedla ke ztrátě rezistence (Crowe-McAuliffe et al., 2018). Naopak v případě proteinu MsrE vedla mutace leucinu 242 stericky se překrývajícího s vazebným místem azithromycinu (M) na alanin, který do vazebného místa tohoto antibiotika nezasahuje, k téměř kompletní ztrátě rezistence (Su et al., 2018).

Jiným zajímavým zjištěním bylo, že u proteinu LsaA mutace lysinu 244, který tvoří vodíkový můstek s G2251 a G2252 23S rRNA, ale nezasahuje do oblasti PTC, na alanin znamená značné snížení úrovně udělované rezistence k linkomycinu (L), pristinamycinu IIA

(S_A) a tiamulinu (P) (Crowe-McAuliffe et al., 2020). Stejně tak mutace aminokyselin proteinu Vga_{ALC}, které interagují s nukleotidy 23S rRNA, nikoli však s antibiotiky, vedly ke změně rezistenčního fenotypu. Z uvedeného tak vyplývá, že rezistenční mechanismus ARE ABCF proteinů na molekulární úrovni je komplexní proces, který zahrnuje přímé i nepřímé interakce rezistenčního proteinu s antibiotikem. Svou roli hraje jak sterický překryv aminokyselinových zbytků ARD domény a navázaného antibiotika, tak také allosterické působení rezistenčního proteinu, kdy přímý kontakt mezi aminokyselinami ARD domény a nukleotidy 23S rRNA vyvolává změnu vazebného místa antibiotika vedoucí k jeho odpoutání (Crowe-McAuliffe et al., 2018, 2020; Su et al., 2018).



Obr. 12: Mechanismus fungování ARE ABCF proteinů. (A) Model fungování ARE ABCF na ribozomu. Protein s navázaným ATP přistupuje k ribozomu blokovánemu antibiotikem přes E-místo. Svou ARD doménou způsobuje ohyb přítomné peptidyl-tRNA a dostává se do místa vazby antibiotika (PTC či NPET). Hrot ARD domény indukuje přímo či nepřímo vyvázání antibiotika. Hydrolyzou ATP získává ARE protein otevřenou konformaci a uvolňuje se z ribozomu. Deformovaná peptidyl-tRNA se vrací do své původní polohy. Způsob pohybu peptidyl-tRNA nesoucí delší oligopeptid není znám (B-D) Vazebná místa antibiotik a pozice ARD domény v ribozomu. ARD doména proteinů LsaA (B) a VmlR (C) se dostává do blízkosti antibiotik cílících na PTC (Tia – tiamulin, Lnc – linkomycin, VgM – virginamycin M (pristinamycin IIa)); S_A), nikoli antibiotik vázajících se dále do NPET (Ery – erythromycin). Delší ARD doména proteinu MsrE (D) zasahuje do místa vazby antibiotik cílících na NPET (VgS – virginamycin S; S_B). (E-I) Konformace peptidyl-tRNA v přítomnosti a nepřítomnosti ARE ABCF proteinu. (E) V nepřítomnosti ARE proteinu zaujímá peptidyl-tRNA kanonickou polohu ve svém P-místě. Po vazbě ARE proteinu je indukována deformace peptidyl-tRNA směrem k ribozomálnímu A-místu. Na obrázku je znázorněna poloha peptidyl-tRNA a ARD domény proteinů LsaA (F), VmlR (G), MsrE (H) a Vga_{ALC} (I). (Crowe-McAuliffe et al., 2020; Wilson et al., 2020) – upraveno

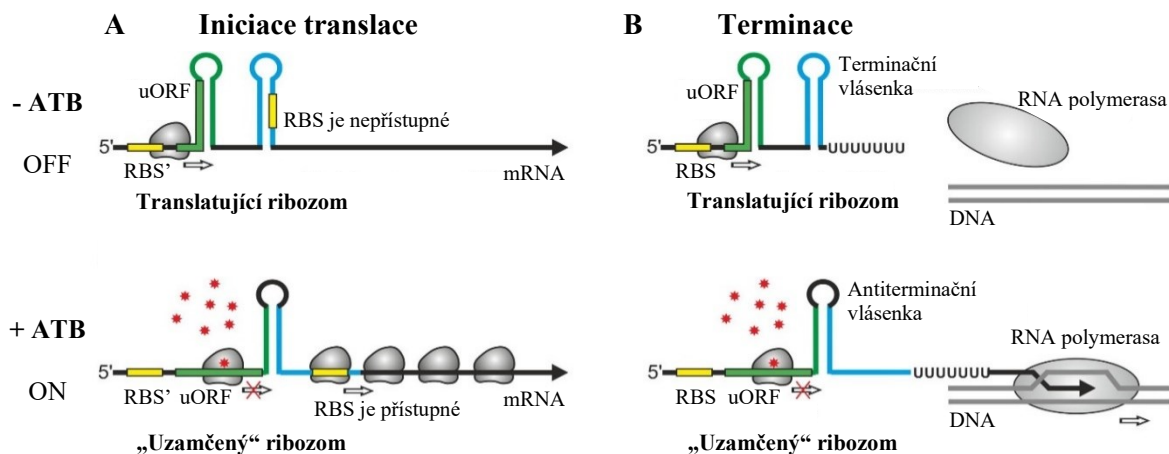
3.3 REGULACE GENOVÉ EXPRESE RIBOZOMEM ZPROSTŘEDKOVANOU ATENUACÍ

Expresi genů udílejících rezistenci k antibiotikům, která blokuje translaci, je často kontrolována pomocí tzv. vnitřního regulačního RNA elementu mechanismem zvaným ribozomem zprostředkovaná atenuace (Dar and Sorek, 2017; Dersch et al., 2017).

Vnitřní regulační RNA elementy jsou specializované úseky RNA lokalizované v 5' koncové nepřekládané oblasti messengerové RNA regulovaného genu. Tyto tzv. r5'UTR elementy fungují jako atenuátory – v odpovědi na určitý signál předčasně ukončují expresi downstream lokalizovaného genu, a to buď na transkripční, nebo na translační úrovni. Existuje sedm základních tříd r5'UTR elementů: RNA teploměr reagující na změny teploty, PRE (pH-responsive) element detekující změny pH, riboswitch detekující přítomnost různých látek (iontů, nukleotidových derivátů, aminokyselin a jiných metabolitů), T-box detekující nenabitě tRNA, r5'UTR element detekující ribozomální proteiny, r5'UTR element detekující terminátorové/antiterminátorové proteiny, a konečně r5'UTR element typu leader peptid detekující inhibitory translace a jiné látky vázající se do ribozomu (nenabitě tRNA, antibiotika a další malé molekuly) (Grundy and Henkin, 2006; Mandin et al., 2013; Naville and Gautheret, 2009; Romby and Charpentier, 2010).

Regulační působení vnitřních regulačních RNA elementů je založené na jejich schopnosti zaujmout dvě různé vzájemně se vylučující sekundární struktury. Transkripční atenuátor tvoří terminátorovou vlásenku, která předčasně ukončuje transkripci (obvykle Rho nezávisle), nebo antiterminátorovou vlásenku, která umožňuje tvorbu kompletního transkriptu. Translační atenuátor pak vytváří vlásenku maskující ribozom-vazebné místo, čímž znemožňuje translaci dané mRNA, nebo naopak strukturu, která nechává RBS pro ribozom volně přístupné. Grafická podoba těchto struktur je ukázána na obrázku níže na příkladu r5'UTR elementu typu leader peptid (Obr. 13). Přesměkání z jedné struktury do druhé se děje v odpovědi na specifický signál, pro jehož detekci je regulační RNA element uzpůsoben. Jak již bylo naznačeno, může se jednat o signál fyzikálně-chemického charakteru (změna teploty či pH) nebo látkového charakteru (iont, chemická sloučenina, tRNA nebo např. protein). Přítomnost tohoto signálu může mít buď negativní, anebo pozitivní vliv na expresi genu. r5'UTR elementy detekují (vážou) signál většinu přímo bez nutnosti účasti dalších buněčných faktorů. Výjimkou je pouze element typu leader peptid, který přítomnost translačních inhibitorů detekuje prostřednictvím translujícího ribozomu (Mandin et al., 2013; Naville and Gautheret, 2009; Romby and Charpentier, 2010).

Ribozomem zprostředkovaná atenuace je tedy zajišťována r5'UTR elementem typu leader peptid. Tento element se vyznačuje přítomností speciálního otevřeného čtecího rámce o různé délce, označovaného jako leader ORF (vedoucí ORF) či uORF (upstream ORF). Jeho funkcí je monitorování schopnosti ribozomu plynule translatovat. V přítomnosti ribozom-vazebné molekuly, na kterou regulační element reaguje, se ribozom v průběhu syntézy vedoucího peptidu „uzamkne“ a zformuje tzv. SRC (stalled ribosomal complex). Ribozom v tomto stavu nemůže katalyzovat syntézu nové peptidové vazby a zároveň se nemůže odpoutat od mRNA. Důsledkem je přeorganizování sekundární struktury RNA řetězce a ovlivnění exprese (na transkripční či translační úrovni) downstream lokalizovaného genu. Pokud ribozom přeloží uORF plynule, strukturní uspořádání mRNA zůstává v základním stavu (Mandin et al., 2013; Naville and Gautheret, 2009) (Obr. 13).



Obr. 13: Mechanismus regulace genů antibiotické rezistence r5'UTR elementem typu leader peptid. Ribozom-vazebné místo (RBS) je znázorněno žlutě, uORF zeleně, antibiotikum červenou hvězdičkou. (A) Translační atenuace. V nepřítomnosti antibiotika ribozom plynule translatuje uORF, na mRNA se tvoří vlásenka maskující RBS. V přítomnosti antibiotika se ribozom na uORF „uzamkne“, změní se uspořádání mRNA a RBS se uvolní. Exprese probíhá. (B) Transkripční atenuace. V nepřítomnosti antibiotika ribozom plynule translatuje uORF, na mRNA se tvoří terminační vlásenka. V přítomnosti antibiotika se ribozom na uORF „uzamkne“, zformuje se antiterminační vlásenka a transkripce pokračuje. (Dersch et al., 2017) – upraveno

Regulace ribozomem zprostředkovanou atenuací je běžná u genů účastnících se biosyntézy aminokyselin, syntézy aminoacyl-tRNA, u genů antibiotické rezistence nebo u genů pro využití zdroje uhlíku. Klasickým příkladem je *trp* operon *E. coli*, kódující enzymy pro syntézu L-tryptofanu (Bertrand et al., 1975; Jackson and Yanofsky, 1973; Lee and Yanofsky, 1977). Zde uORF obsahuje dva sousedící kodony pro tryptofan. Je-li v buňce dostatek tryptofanyl-tRNA (indikuje dostatek L-tryptofanu), ribozom se pročítá přes uORF plynule a na mRNA se tvoří terminátorová vlásenka předčasně ukončující transkripci. Pokud je tryptofanyl-tRNA nedostatek, váže se do ribozomu při překladu tryptofanových kodonů nenabitá tRNA a vzniká SRC. Ten následně vyvolává zformování antiterminátorové vlásenky a geny pro syntézu

tryptofanu jsou přepisovány. Obdobný systém byl popsán také u genů *pheS* a *pheT* z *E. coli* kódující α a β podjednotku fenylalanin-tRNA synthetasy, které jsou součástí genového klastru *thrS-infC-pheS-pheT*. (Trudel et al., 1984; Wu et al., 1984). Transkripční atenuátor se v tomto případě nachází uprostřed klastru (před geny *pheS* a *pheT*) a obsahuje uORF kódující celkem pět fenylalaninů. Pokud je dostatek fenylalanyl-tRNA, tvoří se terminátorová vlásenka a transkript nese pouze geny *thrS* a *infC*. Pokud je fenylalanyl-tRNA nedostatek, SRC indukuje zformování antiterminátorové vlásenky a RNA polymeráza přepíše klastr kompletně.

V uvedených dvou případech tedy SRC vzniká v důsledku vazby nenabitě tRNA do ribozomu. Zcela odlišný princip vzniku SRC byl popsán u *tna* operonu kódujícího tři ORF, *tnaC* (vedoucí peptid), *tnaA* (tryptofanasa) a *tnaB* (tryptofanová permeasa), u kterého dochází k předčasné terminaci transkripce netypicky Rho-dependentním způsobem (Bischoff et al., 2014; Gong and Yanofsky, 2002). V nepřítomnosti volného L-tryptofanu přeloží ribozom regulační uORF a odpoutá se od mRNA. Přítomná Rho-dependentní terminační místa za *tnaC* poté ukončí transkripci mRNA. Pokud je volný L-tryptofan v nadbytku, vážou se dvě tyto molekuly do hydrofobních kapes nascentního řetězce vedoucího peptidu TnaC, které jsou vytvořeny ještě uvnitř ribozomu. Výsledkem je zformování SRC bránícího přístupu Rho faktoru. Transkripce mRNA tak pokračuje a geny *tnaA* a *tnaB* jsou exprimovány. Tento mechanismus umožňuje využití přebytečného tryptofanu jako zdroje uhlíku, dusíku a energie (Hopkins and Cole, 1903). Obdobně jako molekula tryptofanu mohou vznik SRC vyvolávat také ribozom-vazebná antibiotika. Tento případ je detailně popsán v následující podkapitole.

3.3.1 ANTIBIOTIKY ŘÍZENÁ ATENUACE

U genů antibiotické rezistence dochází ke vzniku SRC v důsledku vazby antibiotika do ribozomu. Atenuátor je schopen jednotlivá antibiotika inhibující translaci rozlišovat a spouštět expresi daného rezistenčního genu pouze v přítomnosti tzv. indukujících antibiotik (Ramu et al., 2009; Vázquez-Laslop et al., 2011a). Mezi indukující antibiotika patří vždy alespoň část antibiotik, ke kterým daný gen udílí rezistenci. Mohou jimi ale být i antibiotika, vůči kterým gen rezistenci neposkytuje. To bylo popsáno např. u chloramfenikolového rezistenčního genu *catA86*, který je navíc indukován erythromycinem (Rogers and Lovett, 1990), u teracyklinového rezistenčního genu *tetQ*, který je navíc indukován linkomycinem a erythromycinem (Wang et al., 2004) nebo u MLS_B rezistenčního genu *erm47*, který je navíc indukován chloramfenikolem a linezolidem a dále pak linkosamidy, streptograminy, ketolidy a 16-člennými makrolidy, což jsou antibiotika, ke kterým *erm* geny sice udílejí rezistenci, ale jako induktory genové exprese obvykle nefungují (Guerin et al., 2020).

Přestože je regulace ribozomem zprostředkovanou atenuací značně rozšířená a týká se klinicky významných genů, není ve většině případů znám detailní mechanismus, který antibiotickou specificitu indukce vzniku SRC (a tedy specificitu indukce genové exprese) zajišťuje. Z dosavadních studií však vyplývá, že zásadní roli hraje charakter regulačního uORF, zejména jeho aminokyselinová sekvence a také délka. „Uzamknutí“ ribozomu na uORF nastává v důsledku přímých a nepřímých interakcí mezi specifickými aminokyselinovými motivy vedoucího peptidu, konkrétním antibiotikem navázaným v ribozomu a nukleotidy 23S rRNA (Arenz et al., 2014b, 2014a; Marks et al., 2016; Ramu et al., 2009; Sothiselvam et al., 2014; Vázquez-Laslop et al., 2011a). U genů udílejících rezistenci mechanismem ochrany ribozomu se navíc uplatňuje zpětnovazebná autoregulace rezistenčním proteinem, která může významným způsobem ovlivnit i to, která antibiotika ve výsledku efektivně fungují jako indukující a která nikoli (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1; Wang et al., 2004) (viz dále).

Ribozomem zprostředkovaná atenuace byla experimentálně potvrzena u ARE ABCF genů *vgaL* (Dar et al., 2016) a *lmrC* (Koběřská et al., 2021). Velmi pravděpodobně se uplatňuje také u *vmlR* (Dar et al., 2016; Ohki et al., 2005) a u genů *msr* (Chancey et al., 2015; Matsuoka et al., 1999; Ross et al., 1990; Singh et al., 2001). Mezi systémy nejlépe prostudované pak patří indukce *erm* genů erythromycinem (Arenz et al., 2014b, 2014a; Gupta et al., 2016; Sothiselvam et al., 2014; Vázquez-Laslop et al., 2011b) a také indukce chloramfenikolem a linezolidem (Lovett, 1990, 1996; Lovett and Rogers, 1996; Marks et al., 2016; Stokes and Hall, 1991).

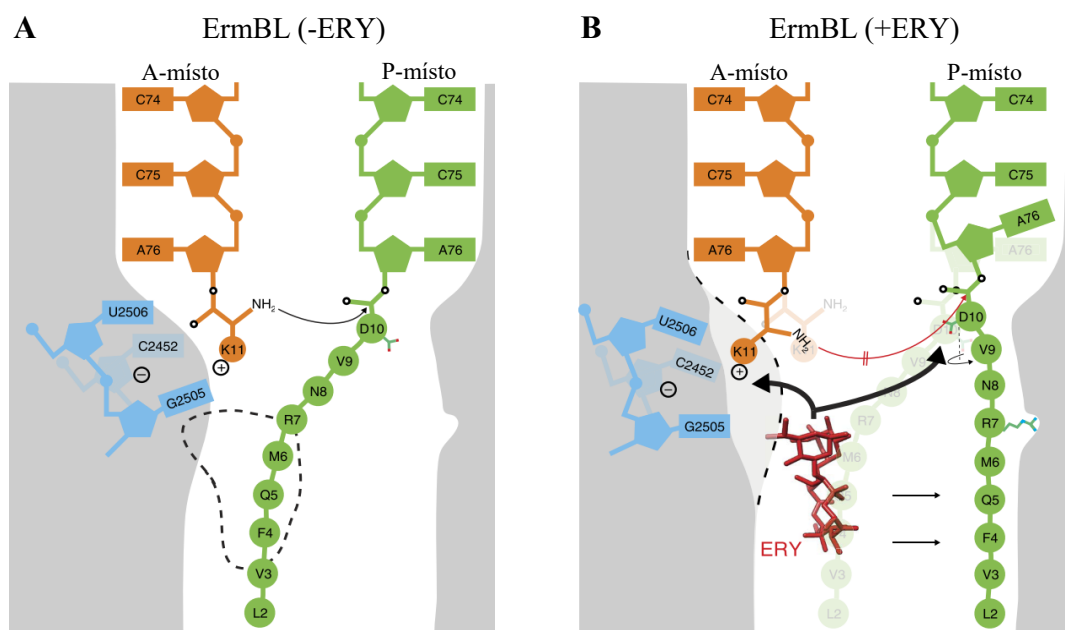
3.3.1.1 Atenuace řízená erythromycinem a telithromycinem

Tradičními modelovými geny pro studium ribozomem zprostředkované atenuace jsou geny skupiny *erm*, které prostřednictvím methylace 23S rRNA udílejí rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminům B, ale jejich induktory jsou obvykle pouze některé makrolidy (Vázquez-Laslop et al., 2011b; Weisblum, 1995b). Pro tři geny z této skupiny, *ermB*, *ermC* a *ermD* byla pořízena podrobná cryo-EM struktura SRC, která umožnila objasnit přesný mechanismus programovaného „uzamknutí“ ribozomu (Arenz et al., 2014b, 2014a, 2016; Beckert et al., 2021). Pro žádné jiné rezistenční geny taková struktura k dispozici není.

U vedoucích peptidů (známých či putativních) erythromycinem indukovaných rezistenčních genů bylo popsáno několik konzervovaných aminokyselinových motivů, které specificky navozují vznik SRC v odpovědi na antibiotikum navázané v ribozomu. Jedná se o motivy RxVD (x je libovolná aminokyselina), IFVI, IAVV a RLR (Ramu et al., 2009; Vázquez-Laslop et al., 2011a). Zatímco motivy IFVI a IAVV reagují na přítomnost 14-členných a 15-členných makrolidů s kladinosou, motivy RxVD a RLR jsou univerzálnější a reagují i na 14-

členné a 15-členné makrolidy bez kladinosy včetně ketolidů (Beckert et al., 2021; Gupta et al., 2016; Sothiselvam et al., 2014; Vázquez-Laslop et al., 2011b).

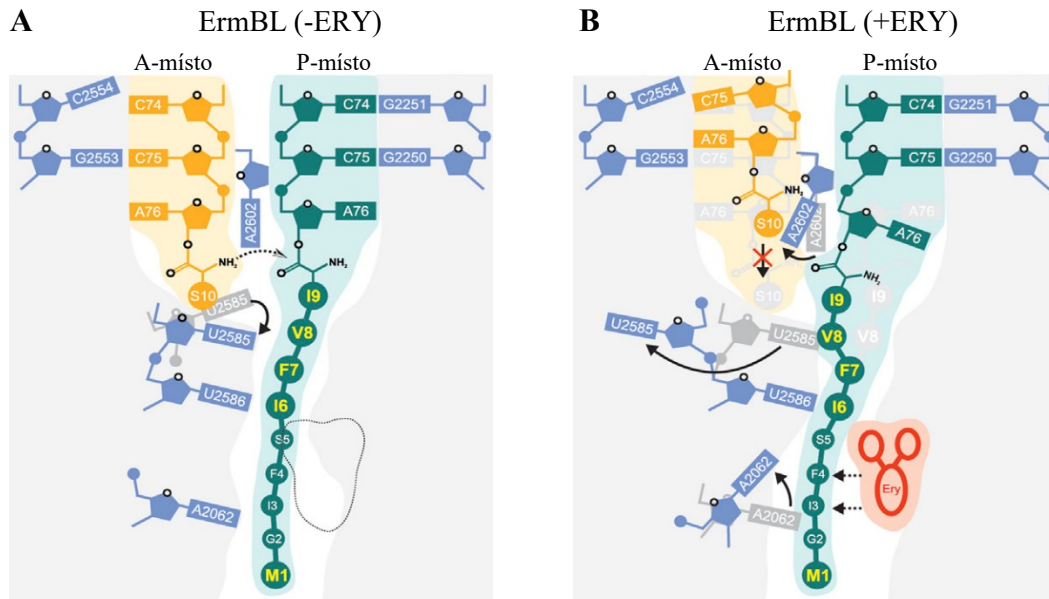
Motiv RxVD byl popsán u vedoucího peptidu genu *ermB*, jehož exprese je kontrolována na translační úrovni (Arenz et al., 2014a; Min et al., 2008). Tento gen nese uORF (označovaný jako *ermBL*) kódující peptid o délce 27 aminokyselin. V přítomnosti erythromycinu dochází ke vzniku SRC po polymeraci deseti aminokyselin MLVFQMRNVD (Min et al., 2008; Vázquez-Laslop et al., 2010). Cryo-EM struktura ukázala, že navázaný erythromycin jednak zásadně mění konformaci peptidyl-tRNA a jednak stabilizuje aminoacyl-tRNA v nekanonické poloze. Důsledkem těchto změn je nemožnost vzniku nové peptidové vazby. Zásadní vliv má zejména pozměněná orientace nukleotidu A76 peptidyl-tRNA a rotovaný postranní řetězec Asp10 ErmDL. Stabilizace lysyl-tRNA v A-místě je pak dána elektrostatickými interakcemi mezi kladně nabitým Lys11 a záporně nabitým prostředím vytvářeným nukleotidy G2505, U2506 a C2452, jejichž poloha je v důsledku vazby erythromycinu pozměněna (Obr. 14) (Arenz et al., 2016).



Obr. 14: Schematický model programovaného zablokování translace ErmCL v přítomnosti erythromycinu. Aminoacyl-tRNA je znázorněna oranžově, peptidyl-tRNA zeleně, nukleotidy rRNA modře a erythromycin červeně. (A) Při absenci erythromycinu není narušena tvorba peptidové vazby mezi Asp10 a Lys11 a vedoucí peptid je syntetizován prodlužován. (B) V přítomnosti erythromycinu dochází ke změně pozice nascentního řetězce ErmBL ve výstupním tunelu ribozomu a ke stabilizaci lysyl-tRNA v nekanonické poloze. V důsledku toho se netvoří nová peptidová vazba a formuje se SRC. (Arenz et al., 2016) - upraveno

U genu *ermC* regulovaného na translační úrovni se vyskytuje motiv IFVI (Arenz et al., 2014b; Gryczan et al., 1980; Horinouchi and Weisblum, 1980; Shivakumar et al., 1980). uORF tohoto genu, *ermCL*, kóduje peptid o délce 19 aminokyselin. Pokud je přítomen erythromycin,

vzniká SRC po polymeraci devíti aminokyselin MGIFSIFVI (Johansson et al., 2014; Vázquez-Laslop et al., 2008). Na základě cryo-EM struktury bylo ukázáno, že ke vzniku SRC dochází zejména vlivem interakcí mezi Val8/Phe7 ErmCL a U2506 23S rRNA, Ile6 ErmCL a U2586 23S rRNA a Ile3 ErmCL a A2062 23S rRNA. Tyto interakce zapříčiňují značné vychýlení bází U2585 a A2602 23S rRNA, v důsledku čehož seryl-tRNA nemůže zaujmout optimální polohu v A-místě a nová peptidová vazba se netvoří (Obr. 15) (Arenz et al., 2014b).

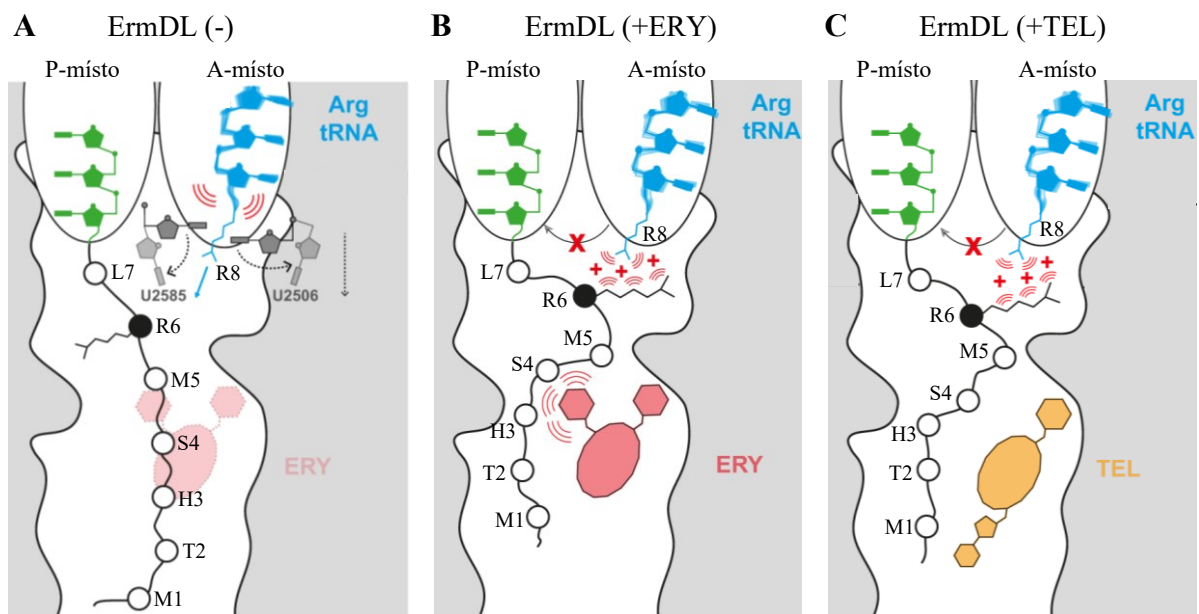


Obr. 15: Schematický model programovaného zablokování translace ErmCL v přítomnosti erythromycinu. AA-tRNA je znázorněna žlutě, P-tRNA zeleně, nukleotidy rRNA modře a erythromycin červeně. (A) V nepřítomnosti antibiotika je umožněn normální průběh translace. Ser-tRNA vstupuje do ribozomového A-místa, vytváří se nová peptidová vazba mezi I9 a S10 a řetězec ErmCL je prodlužován. (B) V přítomnosti erythromycinu zaujímá nascentní řetězec ErmCL abnormální polohu, která si vynucuje konformační změny 23S rRNA patrně především u nukleotidů A2062, U2585 a A2602. Tato změna nedovoluje syntézu nové peptidové vazby a vzniká SRC. (Arenz et al., 2014b) – upraveno

Motiv IFVI se rovněž vyskytuje v jednom ze dvou vedoucích peptidů genu *ermA*. Předpokládá se, že pro spuštění exprese methyltransferasy ErmA je nutné nejprve vytvoření SRC na uORF *ermAL1*, které odhalí RBS pro *ermAL2*, a poté také na uORF *ermAL2*, které odhalí RBS pro *ermA* (Murphy, 1985; Sandler and Weisblum, 1988). Mechanismus vzniku SRC na *ermAL2* je pravděpodobně totožný jako ten u výše popisovaného uORF *ermCL*, neboť nastává po polymeraci devíti aminokyselin MGTFSIFVI, naopak u *ermAL1* nastává po polymeraci osmi aminokyselin MCTSIAVV (následuje glutamát) (Ramu et al., 2011; Vázquez-Laslop et al., 2010). Pro vznik SRC jsou v tomto případě esenciální aminokyseliny IAVV a současně také aminokyselina následující za tímto motivem. Tvorba SRC je podporována, pokud je touto aminokyselinou tzv. slabý akceptor nascentního peptidu ErmAL1 (jedná se o aminokyseliny E, D, K, R, H, případně W, I, Y). Naopak pokud je za tímto motivem přítomný

tzv. silný akceptor nascentního peptidu ErmAL1 (aminokyseliny A, F, M, C), efekt IAVV motivu je neutralizován, vzniká peptidová vazba a SRC formován není (Ramu et al., 2011).

Nejrozšířenějším motivem pro rozpoznání erythromycinu a dalších makrolidů a ketolidů je tzv. RLR motiv (resp. R/K-x-R/K motiv; x je libovolná aminokyselina), který je součástí mj. vedoucího peptidu genu *ermD*. Pro SRC formovaný na uORF tohoto genu byla velmi nedávno získána podrobná cryo-EM struktura, a to jak pro SRC indukovaný erythromycinem, tak pro SRC indukovaný telithromycinem (ketolid) (Beckert et al., 2021). Obě tato antibiotika způsobují změnu konformace nascentního vedoucího peptidu, která mj. znamená rotování kladně nabitého postranního řetězce Arg6 směrem k A-místu, kde se dostává do kolize s kladně nabitým Arg8 přicházejícím v podobě arginyl-tRNA. Arginyl-tRNA v důsledku toho nevyvolává reorientaci nukleotidů 23S rRNA U2506 a U2585, která je nezbytná pro proběhnutí peptidyltransferasové reakce. Syntéza vedoucího peptidu se tak zastavuje a vzniká SRC. Zatímco v případě telithromycinu vede přítomnost RLR motivu ke zformování SRC vždy, u erythromycinu je vznik SRC závislý také na charakteru aminokyselin nacházejících se v jeho okolí. V případě ErmDL bylo ukázáno, že pro indukci jsou významné zejména aminokyseliny Ser4 a Met5, které jsou v kontaktu s kladnosou erythromycinu (Obr. 16) (Beckert et al., 2021).



Obr. 16: Schematický model programovaného zablokování translace ErmDL v přítomnosti erythromycinu a telithromycinu. AA-tRNA je znázorněna modře, P-tRNA zeleně, nukleotidy rRNA šedě, erythromycin červeně a telithromycin žlutě. (A) V nepřítomnosti antibiotika vyvolává přichodí AA-tRNA reorientaci nukleotidů U2506 a U2585. Díky tomu je umožněn vznik peptidové vazby mezi Leu7 a Arg8 a řetězec ErmDL je prodlužován. (B) V přítomnosti erythromycinu zaujímá nascentní řetězec ErmDL abnormální polohu a postranní řetězec Arg6 směřující k A-místu brání přichodí arginyl-tRNA zaujmout optimální polohu pro vznik nové peptidové vazby. Pro indukci vzniku SRC jsou dále důležité aminokyseliny Ser4 a Met5, které jsou v přímém kontaktu s antibiotikem. (C) V přítomnosti telithromycinu zaujímá nascentní řetězec ErmDL abnormální polohu a postranní řetězec Arg6, obdobně jako v předchozím případě, směřuje k A-místu, čímž brání přichodí arginyl-tRNA zaujmout optimální polohu pro vznik nové peptidové vazby. Zde vznik SRC závisí pouze na přítomnosti RLR motivu. (Beckert et al., 2021) – upraveno

Pozice RLR motivu je v rámci známých i putativních vedoucích peptidů *erm* a dalších genů vysoce variabilní (Sothiselvam et al., 2016; Vázquez-Laslop et al., 2011a). Zajímavým zjištěním bylo, že tento motiv je schopen vznik SRC v přítomnosti erythromycinu indukovat také v případě, že se nachází hned za iniciačním methionienem (tedy na druhé až čtvrté pozici vedoucího peptidu. To znamená, že RLR motiv nutně nevyžaduje pro navození vzniku SRC přímý kontakt N-terminálního konce nascentního vedoucího peptidu s antibiotikem. Pravděpodobným důvodem je, že erythromycin svou vazbou do ribozomu vyvolává konformační změny nejen v oblasti NPET, ale i v PTC, které následně brání tvorbě peptidové vazby mezi specifickým donorem a akceptorem (Sothiselvam et al., 2014). Tvorba peptidové vazby mezi Leu2 a Arg3 RLR motivu je z důvodu značné velikosti argininů a jejich náboje problematická i v nepřítomnosti antibiotika (Sothiselvam et al., 2014, 2016). Motiv R/K-L-R/K se vyskytuje nejen u *erm* genů, ale také např. u putativních vedoucích peptidů ARE ABCF genů *msrSA*, *msrA* a *msrC* (Matsuoka et al., 1999; Ross et al., 1990; Singh et al., 2001; Vázquez-Laslop et al., 2011a).

3.3.1.2 Atenuace řízená fenikoly a oxazolidinony

Jak bylo uvedeno výše v odděleních 3.1.5 a 3.1.6, fenikoly a oxazolidinony inhibují proteosyntézu kontextově specificky a zároveň nezpůsobují disociaci peptidyl-tRNA a v důsledku toho ani uvolnění ribozomu z mRNA (Choi et al., 2020; Marks et al., 2016). Proto není v tomto případě pro vznik SRC nezbytný specifický aminokyselinový motiv tak, jako tomu je u makrolidy řízeného vzniku SRC. Dostačující je tak pouze přítomnost jediné konkrétní aminokyseliny. V přítomnosti antibiotika dochází k „uzamknutí“ ribozomu, pokud se na předposlední pozici nascentního vedoucího peptidu nachází alanin, případně serin či threonin. Naopak má-li být tvořena peptidová vazba s glycinem, SRC se s největší pravděpodobností nevytvoří (Marks et al., 2016). V případě genu *catA86* kódujícího chloramfenikolovou acetyltransferasu vzniká SRC na uORF po polymeraci pěti aminokyselin MVKTD (Alexieva et al., 1988; Lovett, 1990). Pokud je kritický threonin mutován za alanin, který vznik SRC indukuje efektivněji, je v toeprintingové esaji (technika pro určení přesné pozice SRC) patrný výrazně silnější signál značící účinnější indukci (Marks et al., 2016).

Dalším příkladem fenikoly indukovaných genů jsou geny *cmlA* (Marks et al., 2016; Stokes and Hall, 1991) a *fexA* (Kehrenberg and Schwarz, 2004) kódující membránové transportéry. Zde zformování SRC nastává po polymeraci aminokyselin MSTSKNAD, resp. MVKAV.

Stejný mechanismus účinku jako fenikoly mají oxazolidinonová antibiotika, což potvrzuje i fakt, že linezolid a tedizolid jsou schopné indukovat vznik SRC na uORF genů *catA86* a *cmlA*

(Choi et al., 2020; Marks et al., 2016). Dosud však nebyl popsán oxazolidinonový rezistenční gen regulovaný ribozomem zprostředkovanou atenuací řízenou těmito syntetickými antibiotiky. Logickým důvodem je velmi nedávné zavedení oxazolidinonů do praxe. Lze ale předpokládat, že se v budoucnu tento typ regulace může u oxazolidinonových rezistenčních genů uplatnit.

3.3.1.3 Atenuace řízená tetracyklinem

Mechanismus indukce vzniku SRC v odpovědi na tetracyklin nebyl dosud blíže studován. Je však jisté, že bude založen na jiných principech, než tomu je v případě indukce antibiotiky vázajícími se do PTC a NPET (viz výše). Tetracyklin, jehož vazebné místo je na 30S podjednotce v oblasti dekódovacího centra (Brodersen et al., 2000; Jenner et al., 2013; Pioletti et al., 2001), se nedostává do blízkosti aminokyselin účastnících se syntézy vedoucího peptidu, proto je nepravděpodobné, že by specifické rozpoznávání antibiotika záviselo na charakteru určité aminokyseliny (na její velikosti, náboji či polaritě).

Regulace ribozomem zprostředkovanou atenuací byla prokázána u dvou genů kódujících proteiny pro ochranu ribozomu *tetM* a *tetQ*. Gen *tetM* je regulován na transkripční úrovni (sekvence vedoucího peptidu MLCMPMVMHKNPSPDKSIYHWDFYALLGF) (Su et al., 1992), gen *tetQ* na translační úrovni (sekvence vedoucího peptidu MRQ) (Wang et al., 2004, 2005). Velmi pravděpodobně se pak translační atenuace uplatňuje v regulaci genů *tetK* (sekvence putativního vedoucího peptidu MKCLFKNLGNLYEVKE) (Khan and Novick, 1983; Mojumdar and Khan, 1988) a *tet63* (sekvence putativního vedoucího peptidu MKCLYKNWGIYLR) (Zhu et al., 2020), které kódují effluxové proteiny.

Velmi neobvyklý typ regulace, který je variací translační atenuace, byl popsán u genu *tetL* z *Bacillus subtilis* (sekvence vedoucího peptidu MKCNECNRVQLKEGSVSLTL) (Bernhard et al., 1978; Lodato et al., 2006; Palva et al., 1990; Schwarz et al., 1992), který je homologem genů *tetK* a *tet63* (Zhu et al., 2020). V tomto případě efektivní plynulá translace uORF aktivně udržuje sekundární strukturu mRNA ve stavu, kdy je RBS rezistenčního genu maskováno a exprese neprobíhá. Pokud je translace uORF narušena (např. mutací v RBS', nebo zavedením stop kodonu na první či druhou pozici uORF), přednostně se formuje struktura umožňující expresi genu *tetL*, regulátor ztrácí senzitivitu k přítomnosti antibiotika a exprese je ve srovnání s WT výrazně navýšena. Zajímavým zjištěním bylo, že výrazná změna sekvence uORF v oblasti od třetího do jedenáctého kodonu fungování regulátoru nenarušila. V případě, že je na uORF vlivem přítomného tetracyklinu zformován SRC (pozice není známa), uspořádání sekundární struktury se změní a RBS rezistenčního genu je uvolněno. Dochází k tomu ale pouze u transkriptů, které jsou v momentu výskytu tetracyklinu (resp. v momentu jeho vazby do

ribozomu) právě vytvářeny. SRC neindukuje expresi z transkriptů, jejichž syntéza již byla dokončena (jejich strukturní uspořádání je příliš stabilní). Důvodem tohoto tlumení exprese může být skutečnost, že TetL je membránový protein, jehož příliš velké množství může potenciálně narušit strukturu membrány a mít tak negativní vliv např. na buněčný růst. Je možné, že se tento neobvyklý typ regulace uplatňuje i u příbuzných membránových transportérů (Lodato et al., 2006).

Geny *tetM* a *tetQ* jsou regulovány klasickým typem transkripční, resp. translační atenuace. Nápadnou vlastností uORF genu *tetM* je, že mezi prvními devíti kodony je šest kodonů vzácných, tj. jejich relativní zastoupení je v celkovém aminoacyl-tRNA poolu velmi nízké (kodony pro aminokyseliny M, C, H). Předpokládá se, že zpomalení translace, ke kterému v této oblasti dochází, může mít na formování SRC vliv (Su et al., 1992). U genu *tetQ* pak byla důležitost sekvence uORF ukázána přímo. Mutace třetího kodonu za stop kodon znamená trvalou represi exprese *tetQ*. Stejný fenotyp dává také zavedení dvojité mutace (synonymní mutace na druhém kodonu a nesynonymní mutace na třetím kodonu) vedoucí ke změně sekvence z MRQ na MRE. Exprese z atenuátoru genu *tetQ* je v nepřítomnosti rezistenčního proteinu TetQ indukována tetracyklinem, linkomycinem a erythromycinem. Zároveň byla pozorována negativní zpětnovazebná regulace rezistenčním proteinem v nízkých koncentracích antibiotika (exprese z atenuátoru je v nepřítomnosti rezistenčního proteinu násobně vyšší než v jeho přítomnosti). Podstatou je dynamická ochrana ribozomu tímto proteinem, která má za následek razantní snížení pravděpodobnosti vzniku SRC (Wang et al., 2004, 2005). Obdobná zpětnovazebná regulace se uplatňuje také u ARE ABCF, což bylo na příkladu genů *vgaA* demonstrováno naší laboratoří (viz dále) (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1).

3.3.1.4 Atenuace řízená linkomycinem a dalšími LS_{AP} antibiotiky

Mechanismus vzniku SRC indukovaného linkomycinem a dalšími LS_{AP} antibiotiky nebyl doposud podrobně zkoumán. Protože LS_{AP} blokují translaci hned v jejich úvodních fázích (Tenson et al., 2003), je pro indukci řízenou těmito antibiotiky dostačující i velmi krátký uORF.

Exprese ARE ABCF genu *vmlR* z *Bacillus subtilis* je indukována pristinamycinem IIA (S_A) a linkomycinem (v přítomnosti rezistenčního proteinu VmlR). Northern hybridizace a *in vitro* transkripční esej ukázala, že transkripce tohoto genu je v nepřítomnosti induktoru předčasně ukončována pomocí Rho-nezávislého terminátoru lokalizovaného 32 nukleotidů upstream od *vmlR* ORF. Uvnitř této oblasti mezi terminátorem a start kodonem je dle predikcí přítomna také vlásenka potenciálně maskující RBS rezistenčního genu. Její role v regulaci exprese však ověřována nebyla. Zajímavé je, že autoři studie vyloučili přítomnost regulačního uORF, a tak i

možnost regulace ribozomem zprostředkovanou atenuací (Ohki et al., 2005). Dar et al. (2016) nicméně později ukázal, že jako uORF v tomto případě velmi pravděpodobně slouží čtecí rámec kódující tripeptid o sekvenci MIN. Sekvenční analýza totiž ukázala, že pozice i sekvence tohoto putativního uORF je konzervovaná hned u několika vzdálených homologů genu *vmlR*. U jednoho z těchto homologů, genu *vgaL* (dříve *lmo0919*) z *Listeria monocytogenes*, byla role uORF o délce pouhých tří kodonů experimentálně ověřena. Pomocí nové metody term-seq, která umožňuje identifikaci 3' konců mRNA, bylo ukázáno, že ARE ABCF gen *vgaL* je regulován na transkripční úrovni a jeho exprese je spouštěna v odpovědi na linkomycin (v přítomnosti rezistenčního proteinu VgaL). Regulace ribozomem zprostředkovanou atenuací byla následně potvrzena mutagenézí klíčových prvků regulátoru, tj. terminátoru, antiterminátoru a uORF. Zatímco delece v oblasti terminátoru vedla ke konstitutivní expresi rezistenčního genu, delece v oblasti antiterminátoru či zavedení bodové mutace do start kodonu uORF kódujícího vedoucí peptid o sekvenci MKF znamenala trvalou represi genu. Trvalá represe nastala také v přítomnosti Erm methyltransferasy, která modifikací vazebného místa znemožňuje vazbu linkomycinu do ribozomu (Dar et al., 2016).

Pro další ARE ABCF gen *lmrC* ze *Streptomyces lincolnensis* byl potvrzen uORF o délce šestnácti aminokyselin (sekvence vedoucího peptidu MTVSGDAPLRCLTPLW), který odpovídá na linkosamidy, streptograminy A a pleuromutiliny (v přítomnosti rezistenčního proteinu LmrC). Fungování atenuátoru se v tomto případě liší od univerzálního modelu, neboť pro zformování terminátoru je vyžadována translace uORF. Jedná se tak o obdobnou variaci atenuace, jaká se uplatňuje u výše zmiňovaného genu *tetL* s tím rozdílem, že zde se regulace odehrává na transkripční, nikoli translační, úrovni. Pokud byl start kodon uORF genu *lmrC* mutován a uORF nebyl překládán, rezistenční gen byl exprimován konstitutivně. Protein LmrC přímo spouští transkripci regulátoru *lmbU*, čímž se podílí na regulaci genů pro biosyntézu linkomycinu u *S. lincolnensis*. (Koběřská et al., 2021). Přesný mechanismus není znám, jednou z našich hypotéz však je, že LmrC funguje jako induktor v predikované atenuaci genu *lmbU*.

U genu *bmrCD* kódujícího multirezistenční ABC transportér byl popsán neobvykle dlouhý uORF o délce padesáti tří aminokyselin (sekvence vedoucího peptidu MFIKGFHIGAAANLLF-CFRERFFRSDRAIKSAVRNISVKKGMELTIHAFFIVKI) (Reilman et al., 2014). Takto dlouhý uORF je predispozicí pro indukci mnoha typů antibiotik – ze čtyřiceti sedmi testovaných antibiotik bylo dvanáct látek indukujících, mj. makrolidy, chloramfenikol, linezolid, doxycyklin (tetracyklin) či linkomycin (Reilman et al., 2014; Torres et al., 2009). Makrolidová indukce je pravděpodobně dána motivem RER, fenikolová a oxazolidinonová přítomností alaninu. Pro indukci linkosamidy a tetracykliny nejsou známy konkrétní požadavky.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 BAKTERIÁLNÍ KMENY

Escherichia coli XL1-Blue kompetentní buňky (Stratagene)

Kmen XL1-Blue byl použit pro klonování a amplifikaci konstruktů.

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

Escherichia coli XL10-Gold ultrakompetentní buňky (Stratagene)

Kmen XL10-Gold byl použit pro klonování a amplifikaci konstruktů.

Genotyp: Tet^rΔ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]

Escherichia coli IM08B (Monk et al., 2015)

Derivát kmene K12 DH10B byl použit pro úpravu konstruktů určených k transformaci do kmenů *Staphylococcus aureus*. Kmen IM08B nese gen pro HsdMS methyltransferasu, která zajišťuje, že plasmidy získávají metylaci charakteristickou pro *Staphylococcus aureus* NCTC8325-4.

Genotyp: *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG Δdcm ΩPhelp-hsdMS* (CC8-2) ΩPN25-*hsdS* (CC8-1)

Staphylococcus aureus RN4220 (NARSA)

Laboratorní kmen RN4220, derivát NCTC 8325-4 s inaktivovaným restričním systémem, byl použit k expresi *vga_{ALC}*, značeného *vga_{ALC}-eqFP650* a pro expresi *eqFP650* z přirozené, případně mutované, upstream oblasti *vga_{ALC}*. Kmen byl použit v experimentech objasňujících mechanismus regulace exprese genu *vga_{ALC}* a pro mikroskopická pozorování.

Staphylococcus aureus JE2 (Fey et al., 2013)

Methicilin-rezistentní kmen (MRSA) byl použit v experimentu dokazujícím nezbytnost vazby antibiotika do ribozomu pro spuštění exprese *vga_{ALC}*. Jedná se o derivát komunitního izolátu USA300 LAC použitého pro tvorbu Nebraské knihovny transpozonových mutantů.

Staphylococcus aureus NE823 *vraS::ermB* (Fey et al., 2013)

Derivát kmene JE2 byl použit pro dokázání nezbytnosti vazby antibiotika do ribozomu pro spuštění exprese genu *vga_{ALC}*. Kmen nese transpozon s genem pro ErmB methyltransferasu, která modifikuje 23S rRNA a brání tak vazbě antibiotik skupiny MLS_B do ribozomu.

Staphylococcus aureus NE1858 *stpC::ermB* (Fey et al., 2013)

Derivát kmene JE2 byl použit pro dokázání nezbytnosti vazby antibiotika do ribozomu pro spuštění exprese genu *vga_{ALC}*. Kmen nese transpozon s genem pro ErmB methyltransferasu, která modifikuje 23S rRNA a brání tak vazbě tzv. MLS_B antibiotik do ribozomu.

4.1.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA

Kultivační média byla sterilizována autoklávováním při 121 °C po dobu 15 min.

BHI médium

Brain-heart infusion 37 g·dm⁻³
Destilovaná voda
pH = 7,5

LB médium

Trypton 10 g·dm⁻³
Kvasniční extrakt 5 g·dm⁻³
NaCl 5 g·dm⁻³
Destilovaná voda
pH = 7,5

BHI agar

Agar 15 g
BHI médium 1000 ml
pH = 7,5

LB agar

Agar 15 g
LB médium 1000 ml
pH = 7,5

SOC médium

Trypton 20 g·dm⁻³
Kvasniční extrakt 5 g·dm⁻³
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM

Destilovaná voda

pH = 7,5

Po sterilizaci:

MgCl₂ 10 mM (sterilizace filtrací)

MgSO₄ 10 mM (sterilizace filtrací)

Glukosa 20 mM (sterilizace filtrací)

MH médium

Mueller-Hinton Broth 21 g·dm⁻³
Destilovaná voda
pH = 7,5

Médium pro dlouhodobé uchování buněk

LB médium 42,5 ml
Glycerol 7,5 ml

4.1.3 ANTIBIOTIKA

Zásobní roztoky antibiotik byly připraveny dle Tab. 1, sterilizovány filtrací a uchovávány v teplotě -20 °C. Antibiotika byla použita pro selekci požadovaných bakteriálních kmenů, pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), případně pro indukci exprese proteinu Vga_{ALC}.

Tab. 1: Seznam použitých antibiotik včetně jejich bližších charakteristik.

Antibiotikum	Zásobní koncentrace	Pracovní koncentrace pro selekci	Rozpustnost	Výrobce
Ampicilin	100 mg/ml	100 µg/ml	dH ₂ O	Duchefa Biochemie
Erythromycin	10 mg/ml	-	Ethanol	Duchefa Biochemie
Chloramfenikol	25 mg/ml	25 µg/ml	Ethanol	Sigma Aldrich
Karbenicilin	100 mg/ml	100 µg/ml	dH ₂ O	Duchefa Biochemie
Klindamycin	10 mg/ml	-	dH ₂ O	Sigma Aldrich
Linkomycin	10 mg/ml	-	dH ₂ O	Sigma Aldrich
Pristinamycin IIA	10 mg/ml	-	Methanol	Aventhis Pharma
Spiramycin	10 mg/ml	-	Ethanol	Sigma Aldrich
Tetracyklin	10 mg/ml	-	Ethanol	Sigma Aldrich
Tiamulin	10 mg/ml	-	dH ₂ O	Sigma Aldrich

4.1.4 VEKTORY

pRMC2 (6555 bp)

Kyvadlový vektor pRMC2 je odvozen od vektoru pALC2073 a je určen pro použití u *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Vektor obsahuje tetracyklinem indukovaný promotor P_{xyl/tetO}, který ale v rámci této práce využit nebyl, neboť se pracovalo s přirozeným promotorem genu *vga_{ALC}*. Selekčním markerem vektoru je u *Staphylococcus aureus* rezistence k chloramfenikolu, u *Escherichia coli* rezistence ke karbenicilinu/ampicilinu. Podrobnější specifikace vektoru: <https://www.addgene.org/68940/>.

4.1.5 OLIGONUKLEOTIDY

Primery používané v experimentální části této práce byly syntetizovány firmou Sigma Aldrich, Promega, případně Eurofins. Primery byly naředěny sterilní destilovanou vodou do finální koncentrace 100 µM (100 pmol/µl). Seznam všech použitých primerů včetně jejich použití je uveden v Tab. 2. Primery označené * byly navrženy mnou, primery pro amplifikaci *rpoD* byly převzaty z publikace (Theis et al., 2007) a ostatní primery byly navrženy MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D., nebo Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou, Ph.D.

Tab. 2.: Seznam použitých primerů včetně jejich použití.

Název	Sekvence (5'→3')	Použití
LCreg_375 (pMN001)		
*F.P_Michaela_MUT3_54C	TGCGAAAAAATAAGTGTCTAATTGCTAG	Příprava konstruktů
*R.P_Michaela_Prom_Del_56C	AAGCAGCATAACCTTTTTCCGTGATG	Příprava konstruktů
VgaAlc_REG_F_47C	TGAAGTTACCATCACGGAAAAAGGTTATGCTGCTTCTACGAAAGATATTAC	Koloniová PCR
R.P_VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Koloniová PCR, sekvenace
LCreg_247 (pMN002)		
*F.P_Michaela_MUT4_55C	TTAATACGATAAAGGAAAGGGTGAACC	Příprava konstruktů
*R.P_Michaela_Prom_Del_56C	AAGCAGCATAACCTTTTTCCGTGATG	Příprava konstruktů
VgaAlc_REG_F_47C	TGAAGTTACCATCACGGAAAAAGGTTATGCTGCTTCTACGAAAGATATTAC	Koloniová PCR
R.P_VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Koloniová PCR, sekvenace
uORF_mut (pMN003-4)		
F.P_VVA_MUT1_49C	AGATTAACCTAATCTATTTTCAAAAAG	Příprava konstruktů
R.P_VVA_MUT1_50C	TGTAGTTGGTTCACCCCTTC	Příprava konstruktů
R.P_VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Sekvenace
LCreg-VgaALC (pMN006)		
F.P_VgaAlc_Own_P_Plasmid (57C)	TAAGAGCTCGAATTCAGTGGCCGT	Příprava vektorů pro SLiCE
R.P_VgaAlc_Own_P_Plasmid (54)	CAATAAACGATCTTGAACATAATGTTTTATATG	Příprava vektorů pro SLiCE
F.P_VgaAlc_Own_P (55C)	CTTCATATAAAACATTATGTTCAAGATCGTTTATTGTTGAACATAAATCGCCTAAAGATTATCAG	Příprava insertů pro SLiCE
R.P_VgaAlc_Own_P (56C)	GTTGTAACGACGCGCCAGTGAATTCGAGCTCTTATTTATCTAAATTTCTTTTTTCATTTATTAAGTTTTGAAACTC	Příprava insertů pro SLiCE
pRMC_reverse (56C)	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	Sekvenace
*F.P_Michaela_MUT3_54C	TGCGAAAAAATAAGTGTCTAATTGCTAG	Sekvenace
VgaV_Control_Rev(60C)	AGGAAGTTCGTTTCTTTTCGACCCTTC	Sekvenace
*RP_atten_VgaAlc	TGAAGTCCCTCTAACAGTATTTTCA	RT, PCR (RT-PCR)
*F.P_Michaela_MUT4_55C	TTAATACGATAAAGGAAAGGGTGAACC	PCR (RT-PCR)
RP_rpoD	GATACGTAGGTCGTGGTATG	RT, PCR (RT-PCR)
FP_rpoD	CACGAGTGATTGCTTGTC	PCR (RT-PCR)
LCreg-VgaALC-eqFP650 (pMN007)		
F.P_VgaAlc_eqFP_Own_P_Plasmid	CCAGGTGGTGGTTCATGGGTGAAGATAGTGAATTAATTAGTGAATAAT	Příprava vektorů pro SLiCE
R.P_VgaAlc_Own_P_Plasmid (54)	CAATAAACGATCTTGAACATAATGTTTTATATG	Příprava vektorů pro SLiCE
F.P_VgaAlc_Own_P (55C)	CTTCATATAAAACATTATGTTCAAGATCGTTTATTGTTGAACATAAATCGCCTAAAGATTATCAG	Příprava insertů pro SLiCE
R.P_VgaAlc_eqFP_Own_P (56C)	CACTAATTAATTCATATCTTCCACCCATTGAACCACCACCTGGTTATCTAAATTTCTTTTTTCATTTATTAAGTTTTGAAACTC	Příprava insertů pro SLiCE
pRMC_reverse (56C)	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	Sekvenace
*F.P_Michaela_MUT3_54C	TGCGAAAAAATAAGTGTCTAATTGCTAG	Sekvenace
VgaV_Control_Rev(60C)	AGGAAGTTCGTTTCTTTTCGACCCTTC	Sekvenace
LCreg-VgaALC_EQ1+2 (pMN008)		
F.P_VgaAlc_Own_P_Plasmid (57C)	TAAGAGCTCGAATTCAGTGGCCGT	Příprava vektorů pro SLiCE
R.P_VgaAlc_Own_P_Plasmid (54)	CAATAAACGATCTTGAACATAATGTTTTATATG	Příprava vektorů pro SLiCE
F.P_VgaAlc_Own_P (55C)	CTTCATATAAAACATTATGTTCAAGATCGTTTATTGTTGAACATAAATCGCCTAAAGATTATCAG	Příprava insertů pro SLiCE, sekvenace
R.P_VgaAlc_Own_P (56C)	GTTGTAACGACGCGCCAGTGAATTCGAGCTCTTATTTATCTAAATTTCTTTTTTCATTTATTAAGTTTTGAAACTC	Příprava insertů pro SLiCE, koloniová PCR
*F.P_Michaela_MUT3_54C	TGCGAAAAAATAAGTGTCTAATTGCTAG	Koloniová PCR
pRMC_reverse (56C)	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	Sekvenace

Název	Sekvence (5'→3')	Použití
LCreg-VgaA_{LC}_EQ1+2-eqFP650 (pMN010)		
F.P. VgaA _{LC} _eqFP_Own_P_Plasmid	CCAGGTGGTGGTTCATGGGTGAAGATAGTGAATTAATTAGTAAAAAT	Příprava vektoru pro SLiCE
R.P. VgaA _{LC} _Own_P_Plasmid (54)	CAATAAACGATCTTGAACATAATGTTTATATG	Příprava vektoru pro SLiCE
F.P. VgaA _{LC} _Own_P (55C)	CTTCATATAAAACATTATGTTCAAGATCGTTTATTGTTGAACATAAAATCGCTAAAGATTATCAG	Příprava insertu pro SLiCE, sekvenace
R.P. VgaA _{LC} _eqFP_Own_P (56C)	CACTAATTAATTCATCTTCCACCCATTGAACCACCACCTGGTTTATCTAAATTTCTTTTTTCATTTATTAAGTTTTGAAACTC	Příprava insertu pro SLiCE, koloniová PCR
*F.P. Michaela_MUT3_54C	TGCGAAAAATAAGTGTCTAATTGCTAG	Koloniová PCR, sekvenace
pRMC_reverse (56C)	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	Sekvenace
LCreg-VgaA_{LC}_LTGAG (pMN014) a LCreg-VgaA_{LC}_LTGAG-eqFP650 (pMN015)		
VgaV_Control_Rev(60C)	AGGAAGTTCGTTTCTCTTTTCGACCCTTTC	Sekvenace
LCreg-VgaA_{LC}_SGAG (pMN016) a LCreg-VgaA_{LC}_SGAG-eqFP650 (pMN017)		
VgaV_Control_Rev(60C)	AGGAAGTTCGTTTCTCTTTTCGACCCTTTC	Sekvenace
LCreg-VgaA_{LC}_SGTG (pMN018) a LCreg-VgaA_{LC}_SGTG-eqFP650 (pMN019)		
VgaV_Control_Rev(60C)	AGGAAGTTCGTTTCTCTTTTCGACCCTTTC	Sekvenace
uORF_9AA (pMN020)		
F.P. uORF_9AA	GGAAAGGGTGAACCAACTACATGATTAACGAACCATATTTTCAAAGTAAACAATTGAAAGTGT	Příprava konstruktů
R.P. uORF_9AA	ACACTTCAATTGTTACTTTTGAAAATATGGTTCGTTAATCATGTAGTTGGTTCACCCTTTCC	Příprava konstruktů
R.P. VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Sekvenace
uORF_MGG (pMN021)		
F.P. uORF_MGG	GAATTAATACGATAAAGGAAAGGGTGAACCAACTACATGGGTGTTAATCCTATTTTCAAAGTAAACAATTGAAAGTGTTTAT	Příprava konstruktů
R.P. uORF_MGG	ATAAAACACTTTC AATTGTTACTTTTGAAAATAGGATTAACCACCATGTAGTTGGTTCACCCTTTCTTTATCGTATTAATTC	Příprava konstruktů
R.P. VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Sekvenace
uORF_MKF (pMN022)		
F.P. uORF_MKF	GAATTAATACGATAAAGGAAAGGGTGAACCAACTACATGAAATTTAATCCTATTTTCAAAGTAAACAATTGAAAGTGTTTAT	Příprava konstruktů
R.P. uORF_MKF	AATAAAACACTTTC AATTGTTACTTTTGAAAATAGGATTAATTCATGTAGTTGGTTCACCCTTTCTTTATCGTATTAATTC	Příprava konstruktů
R.P. VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Sekvenace
uORF_MRQ (pMN024)		
F.P. uORF_MRQ	AATACGATAAAGGAAAGGGTGAACCAACTACATGCGTCAATAATCCTATTTTCAAAGTAAACAATTGAAAGTGT	Příprava konstruktů
R.P. uORF_MRQ	CACCTTCAATTGTTACTTTTGAAAATAGGATTAATGACGCATGTAGTTGGTTCACCCTTTCTTTATCGTATT	Příprava konstruktů
R.P. VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Sekvenace
uORF_MRL (pMN023)		
F.P. uORF_MRL	GAATTAATACGATAAAGGAAAGGGTGAACCAACTACATGCGTTTATAATCCTATTTTCAAAGTAAACAATTGAAAGTGTTTAT	Příprava konstruktů
R.P. uORF_MRL	ATAAAACACTTTC AATTGTTACTTTTGAAAATAGGATTAATACGCATGTAGTTGGTTCACCCTTTCTTTATCGTATTAATTC	Příprava konstruktů
R.P. VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Sekvenace
uORF_MRLR (pMN025)		
F.P. uORF_MRLR	GATAAAGGAAAGGGTGAACCAACTACATGCGTTTAAAGATAATATTTTCAAAGTAAACAATTGAAAGTGTTTATTT	Příprava konstruktů
R.P. uORF_MRLR	AAATAAAACACTTTC AATTGTTACTTTTGAAAATATTATCTTAAACGCATGTAGTTGGTTCACCCTTTCTTTATC	Příprava konstruktů
R.P. VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C	GTATTTTCATATTTTCTCATCTCTTATAAG	Sekvenace

4.1.6 ROZTOKY A PUFRY

Roztoky a pufrы připravované v laboratoři:

DNA vzorkový pufr (10x)

EDTA	100 mM
Glycerol	20 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)
Bromfenolová modř	0,25 % (v/v)
Destilovaná voda	
pH = 8	

Fyziologický roztok

NaCl	0,9 % (w/v)
Destilovaná voda	
Sterilizace autoklávováním při 121 °C po dobu 15 min	

Glycerol (10 %)

Glycerol	0 % (v/v)
Destilovaná voda	
Sterilizace filtrací	

PBS (10x)

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
Destilovaná voda	
pH = 7,4	

Přenosový pufr (WB)

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Methanol	15 % (v/v)
Destilovaná voda	

SDS (5 %)

SDS	5 % (w/v)
Destilovaná voda	
Sterilizace filtrací	

SDS-PAGE pufr (1x)

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Destilovaná voda	

SDS-PAGE vzorkový pufr (2x)

Tris-HCl	125 mM
SDS	2 % (w/v)
Merkaptoethanol	5 % (v/v)
Glycerol	20 % (v/v)
Bromfenolová modř	0,002 % (v/v)
Destilovaná voda	
pH = 6,8	

TAE pufr (1x)

Tris-acetát	40 mM
EDTA	1 mM
Destilovaná voda	
pH = 7,5	

TE⁻¹ pufr

Tris-HCl	10 mM
EDTA	0,1 mM
Destilovaná voda	
pH = 8	

Komerčně dostupné pufrы:

Endonukleasový pufr

10x pufr pro DNasu I (New England BioLabs)

Kinasový pufr

10x pufr pro T4 polynukleotid kinasu (PNK Buffer) (New England BioLabs)

Ligační pufr

10x pufr pro T4 DNA ligasu s 10 mM ATP (New England BioLabs)

Polymerasové pufry

5x reakční pufr pro Phusion[®] High-Fidelity polymerasu (New England BioLabs)

5x reakční pufr pro Q5[®] High-Fidelity polymerasu (New England BioLabs)

10x kompletní reakční pufr pro Taq polymerasu (Top-Bio)

1x reakční pufr pro M-MuLV reverzní transkriptasu (New England BioLabs)

Pufr pro SLiCE reakci

10x pufr pro T4 DNA ligasu s 10 mM ATP (New England BioLabs)

Restrikční pufry

10x pufr pro restriktsu dle doporučení výrobce: NEBuffer 4 (New England BioLabs)

10x pufr CutSmart[®] (New England BioLabs)

4.1.7 ENZYMY

Kinasa

T4 polynukleotid kinasa (PNK) 10 U/μl (New England BioLabs)

Ligasa

T4 DNA ligasa 400 U/μl (New England BioLabs)

Polymerasy

Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerasa 2 U/μl (New England BioLabs)

Q5[®] High-Fidelity DNA polymerasa 2 U/μl (New England BioLabs)

Taq-Purple DNA polymerasa 1 U/μl (Top-Bio)

M-MuLV reverzní transkriptasa (New England BioLabs)

Nespecifická endonukleasa

DNasa I x U/ μl (New England BioLabs)

Restrikční endonukleasy (New England BioLabs)

DpnI 20 U/μl 5'-GmA[▼]TC-3'

DraIII 20 U/μl 5'-CACNNN[▼]GTG-3'

XbaI 20 U/μl 5'-T[▼]CTAGA-3'

4.1.8 PROTILÁTKY A SUBSTRÁT PRO WB ANALÝZU

Primární protilátky

Specifická králičí protilátka proti VgA

Sekundární protilátky

Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (H+L) (Invitrogen) – koží polyklonální protilátka proti králičím protilátkám konjugovaná s křenovou peroxidasou

Substrát pro křenovou peroxidasu sekundární protilátky

Immobilon™ Western chemiluminescent HRP Substrate (Merck)

4.1.9 FLUORESCENČNÍ BARVIČKY

DAPI (Thermo Fisher Scientific) – modrá fluorescenční barvička pro vizualizaci DNA

4.1.10 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Tab. 3: Seznam použitých chemikálií.

Chemikálie	Zkratka	Výrobce
40% akrylamid + 1,7% bis-akrylamid	AA/bis-AA	Merck
Aceton		Lach-Ner
Adenosin trifosfát	ATP	Fermentas
Agar		Oxoid
Agarosa		BIO-RAD
Albumin hovězího séra	BSA	New England BioLabs
Blotting-Grade Blocker		Oxoid
Brain-heart infusion	BHI	Oxoid
Bromfenolová modř	BFB	BIO-RAD
Deoxyadenosin trifosfát	dATP	New England BioLabs
Deoxycytidin trifosfát	dCTP	New England BioLabs
Deoxyguanosin trifosfát	dGTP	New England BioLabs
Deoxythymidin trifosfát	dTTP	New England BioLabs
Dimethylsulfoxid	DMSO	New England BioLabs
Dodecylsírán sodný	SDS	Sigma Aldrich
Ethanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	Fagron
Ethidium bromid	EtBr	Sigma Aldrich
Etylendiamintetraacetát	EDTA	Sigma Aldrich
FluoroBrite DMEM		Gibco
Glukosa	GLC	Lach-Ner
Glycerol		Lach-Ner
Hovězí extrakt		BD
Hydrogenfosforečnan draselný	K ₂ HPO ₄	AppliChem
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner
Chlorid draselný	KCl	Lachema
Chlorid hořečnatý	MgCl ₂	Lachema
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Chlorid vápenatý	CaCl ₂	Lach-Ner

Chemikálie	Zkratka	Výrobce
Isopropanol		Lachema
Kaseinový hydrolyzát		Fluka
Kvasničný extrakt		Oxoid
Kyselina chlorovodíková	HCl	Lachema
Kyselina sírová	H ₂ SO ₄	Lachema
Methanol	MetOH	Lach-Ner
Mueller-Hinton Broth	MH	Oxoid
N,N,N',N'- tetrametylendiamin	TEMED	AppliChem
Pepton		BD
Peroxodisíran amonný	APS	Sigma Aldrich
Phosphate buffered saline	PBS	Oxoid
Polyetylglykol (M _r = 8000)	PEG	Sigma Aldrich
Síran horečnatý	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Lachema
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Serva
Trypton-sójový bujón	TSB	Oxoid

4.1.11 SPECIÁLNÍ DEZINFEKČNÍ A ČISTÍCÍ PROSTŘEDKY

Ajatin (1 %) – dezinfekční prostředek

PCR Clean™ DNA & RNA Decontamination Spray (Minerva Biolabs) – přípravek pro ošetření povrchů proti RNasam

RNaseZAP™ Cleaning agent for removing RNase (Sigma Aldrich) – přípravek pro ošetření povrchů proti RNasam

4.1.12 KOMERČNÍ SOUPRAVY A STANDARDY

Izolace DNA z agarosového gelu

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

Izolace plasmidové DNA

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Purifikace PCR produktu

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

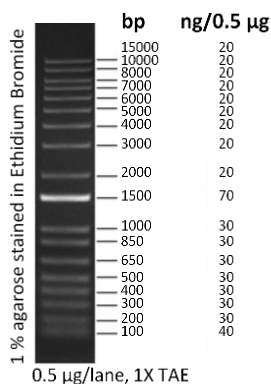
Sekvenace DNA

Mix2Seq Kit ON (Eurofins Genomics)

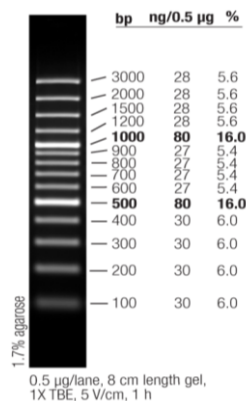
Standard molekulové hmotnosti pro DNA agarosovou elektroforézu

1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) (Obr. 17)

GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) (Obr. 18)



Obr. 17: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). (Převzato a upraveno z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10787018#/10787018>)

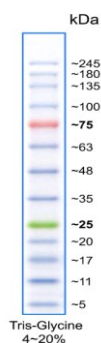


Obr. 18: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). (Převzato z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0323#/SM0323>)

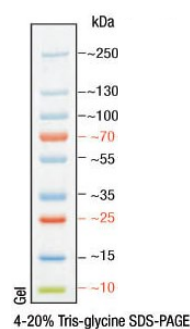
Standard molekulové hmotnosti pro proteinovou SDS-PAGE elektroforézu

BlueElf Prestained Protein Marker (Jena Bioscience) (Obr. 19)

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) (Obr. 20)



Obr. 19: BlueElf Prestained Protein Marker (Jena Bioscience). (Převzato z: <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/protein-mw-marker/prestained-protein-mw-marker/ps-105-blueelf-prestained-protein-marker>)



Obr. 20: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). (Převzato z: <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/pageruler-prestained-10-170kda-protein-ladder/11822124>)

4.1.13 SOFTWARE A INTERNETOVÉ APLIKACE

BLAST – Nástroj pro srovnávání sekvencí s anotovanými sekvencemi z databáze GenBank

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BPROM – Nástroj pro predikci sigma70 promotorů

<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>

CLC Main Workbench 6.8.1. – Program pro analýzu sekvencí

Codon Usage Database – Databáze kodonových preferencí organismů

<https://www.kazusa.or.jp/codon/>

De Novo DNA – Nástroj pro designování genetických systémů

<https://www.denovodna.com/>

EMBOSS Needle – Nástroj pro srovnávání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí

https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

GENESys v1.5.5.0 – Program pro pořízení a úpravu fotografií elektroforetického gelu

ImageJ – Program pro zpracovávání a analýzu mikroskopických snímků

PASIFIC – Nástroj pro predikci alternativních struktur mRNA pro identifikaci *cis*-regulace

<http://www.weizmann.ac.il/molgen/Sorek/PASIFIC/>

QuikChange Primer Design Program – Nástroj pro navrhování mutagenních primerů dle protokolu QuikChange®

<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>

RNAfold v2.4.17 – Nástroj pro predikci sekundární struktury RNA

<http://rna.tbi.univie.ac.at/>

Tm Calculator v1.12.0 – Nástroj pro výpočet teploty tání a teploty nasedání primerů

<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>

Unipro UGENE v34.0 – Program pro analýzu sekvencí

4.2 METODY

4.2.1 KULTIVACE A UCHOVÁVÁNÍ BAKTERIÍ

4.2.1.1 Kultivace a uchovávání *Escherichia coli*

Kmeny: XL1-Blue, XL10-Gold, IM08B

Na LB agaru byly buňky *E. coli* kultivovány v termostatu při 37 °C po dobu 16 až 18 hodin. V tekutém LB médiu byly buňky kultivovány na třepačce při 37 °C a otáčkách

200 RPM po dobu 16 až 18 hodin. Pro selekci buněk nesoucích konstrukt se do agaru/média přidalo příslušně antibiotikum. Pro krátkodobé uchovávání byly plotny s buňkami potaženy parafilmem a umístěny do 4 °C. Pro dlouhodobé uchovávání byly buňky z pevného média rozptýleny v LB médiu s přidaným glycerolem (15 %) a umístěny do -80 °C.

4.2.1.2 Kultivace a uchovávání *Staphylococcus aureus*

Kmeny: RN4220, JE2, NE823, NE1858

Na BHI agaru byly buňky *S. aureus* kultivovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. V tekutém BHI médiu byly buňky kultivovány na třepačce při 37 °C a otáčkách 200 RPM po dobu 16 až 18 hod. Pro selekci buněk nesoucích konstrukt se do agaru/média přidalo příslušně antibiotikum. Pro krátkodobé uchovávání byly plotny s buňkami potaženy parafilmem a umístěny do 4 °C. Pro dlouhodobé uchovávání byly buňky z pevného média rozptýleny v LB médiu s přidaným glycerolem (15 %) a umístěny do -80 °C.

4.2.2 PŘÍPRAVA A TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK

Cílem transformace je vnesení cizorodé DNA z prostředí do buňky. Pro úspěšnou transformaci je potřeba mít buňky ve stavu kompetence. Ten může nastat přirozeně nebo může být navozen uměle. Transformace se provádí nejčastěji teplotním šokem nebo elektroporací.

4.2.2.1 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro transformaci teplotním šokem

1. Hluboce zamrazené buňky byly vysety na plotnu s LB agarem a inkubovány přes noc (16-18 hod) při 37 °C.
2. Jedna kolonie byla zaočkována do 3 ml LB média a suspenze byla inkubována na třepačce přes noc (16-18 hod) při 37 °C a otáčkách 200 RPM.
3. 2 ml bakteriální suspenze narostlé přes noc byly zaočkovány do 50 ml LB média a inkubovány na třepačce při 37 °C a otáčkách 200 RPM až do $OD_{600nm} = 0,4 - 0,6$.
4. Po dosažení požadované OD byly buňky chlazeny po dobu 10 min na ledě a následně stočeny na centrifuze (10 min, 3 500 RPM, 4 °C). Byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 20 ml vychlazeného 0,1 M roztoku $CaCl_2$.
5. Buňky byly 10 min chlazeny na ledě, stočeny na centrifuze (10 min, 3 500 RPM, 4 °C) a byl odstraněn supernatant. Buňky byly resuspendovány v 10 ml vychlazeného 0,1 M $CaCl_2$.

6. Buňky byly 45 min chlazeny na ledě, stočeny na centrifuze (10 min, 3 500 RPM, 4 °C) a byl odstraněn supernatant. Buňky byly resuspendovány v 1 ml 0,1M CaCl₂ s 15% glycerolem.
7. Buňky byly 30 min chlazeny na ledě.
8. Buněčná suspenze byla rozdělena po 100 µl do 1,5ml mikrozkuvek, zmrazena pomocí tekutého dusíku a umístěna do -80 °C, případně byla ihned použita.

4.2.2.2 Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* teplotním šokem

1. Hluboce zamrazené kompetentní buňky *Escherichia coli* byly rozpuštěny na ledě a rozděleny do 1,5ml mikrozkuvek po 50 µl (příp. byly použity čerstvě připravené buňky).
2. K buňkám byl přidán plasmid o objemu 1 µl.
3. Buňky byly následně inkubovány 30 minut na ledě a poté vystaveny teplotnímu šoku (42 °C, 45 sekund) a nechány 1 minutu na ledu.
4. K buněčné suspenzi byl přidán 1 ml LB média.
5. Po hodinové inkubaci při 37 °C v termostatu byly buňky zcentrifugovány (1 min, 5 000 RPM), byl odstraněn 1 ml supernatantu a ve zbytku byly buňky resuspendovány.
6. Bakterie byly vysety na LB agar s přidáním selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc (16-18 hod) v 37 °C.

4.2.2.3 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro transformaci elektroporací

1. Hluboce zamrazené buňky byly vysety na plotnu s LB agarem a inkubovány přes noc (16-18 hod) při 37 °C.
2. Jedna kolonie byla zaočkována do 2 ml LB média a suspenze byla inkubována na třepačce přes noc (16-18 hod) při 37 °C a otáčkách 200 RPM.
3. 1 ml bakteriální suspenze narostlé přes noc byl zaočkován do 50 ml SOC média a inkubován na třepačce při 37 °C a otáčkách 200 RPM až do OD_{600nm} = 0,4 – 0,6.
4. Po dosažení požadované OD byly buňky chlazeny po dobu 10 min na ledě.
5. Poté byly buňky stočeny na centrifuze (10 min, 3 000 RPM, 4 °C), byl odstraněn supernatant a pelet byl promyt v 50 ml ddH₂O (deionizovaná voda).
6. Kultura byla stočena na centrifuze (10 min, 3 000 RPM, 4 °C), byl odstraněn supernatant a buňky byly promyty ve 20 ml 10% glycerolu ve vodě.
7. Kultura byla opět stočena na centrifuze (10 min, 3 000 RPM, 4 °C), byl odstraněn supernatant a buňky byly promyty v 5 ml 10% glycerolu ve vodě.
8. Kultura byla inkubována 15 min na ledě a stočena na centrifuze (15 min, 3 000 RPM, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 800 µl 10% glycerolu ve vodě.

9. Suspenze byla rozdělena po 100 μl do 1,5ml mikrozkušavek, zmrazena pomocí tekutého dusíku a umístěna do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, případně byla ihned bez mražení použita.

4.2.2.4 Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* elektroporací

1. Hluboce zmrazené kompetentní buňky *Escherichia coli* byly rozpuštěny na ledě a rozděleny do 1,5ml mikrozkušavek po 50 μl (příp. byly použity čerstvě připravené buňky).
2. K buňkám byl přidán plasmid o objemu 1 až 5 μl .
3. Buňky byly následně inkubovány 30 minut na ledě.
4. 50 μl bakteriální suspenze bylo přeneseno do vychlazené elektroporační kyvety (0,1 cm, resp. 0,2 cm) a vystaveno elektrickému pulzu (1,8 kV, resp. 2,5 kV) po dobu 5 ms.
5. Ihned po elektroporaci bylo k buňkám přidáno 750 μl SOC média s glukosou a suspenze byla přenesena do čisté 1,5ml mikrozkušavky.
6. Suspenze byla inkubována na třepačce 2 hod při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a otáčkách 200 RPM Poté byly buňky zcentrifugovány (1 min, 5 000 RPM), byl odstraněn 1 ml supernatantu a ve zbytku supernatantu byly buňky resuspendovány.
7. Bakterie byly vysety na LB agar s přidáním selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc (16-18 hod) v $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2.5 Příprava kompetentních buněk *Staphylococcus aureus* pro transformaci elektroporací

1. Hluboce zamrazené buňky byly vysety na plotnu s BHI agarem a inkubovány přes noc (16-18 hod) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Jedna kolonie byla zaočkována do 2 ml BHI média a suspenze byla inkubována na třepačce přes noc (16-18 hod) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a otáčkách 200 RPM.
3. 1 ml bakteriální suspenze narostlé přes noc byl zaočkován do 50 ml BHI média a inkubován na třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a otáčkách 200 RPM až do $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5 - 0,8$.
4. Po dosažení požadované OD byly buňky chlazeny po dobu 10 min na ledě.
5. Poté byly buňky stočeny na centrifuze (10 min, 3 000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), byl odstraněn supernatant a pelet byl promyt v 50 ml ddH₂O (deionizovaná voda).
6. Kultura byla stočena na centrifuze (10 min, 3 000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), byl odstraněn supernatant a buňky byly promyty ve 20 ml 10% glycerolu ve vodě.
7. Kultura byla opět stočena na centrifuze (10 min, 3 000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), byl odstraněn supernatant a buňky byly promyty v 5 ml 10% glycerolu ve vodě.

8. Kultura byla inkubována 15 min na ledě a stočena na centrifuze (15 min, 3 000 RPM, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 800 µl 10% glycerolu ve vodě.
9. Suspenze byla rozdělena po 100 µl do 1,5ml mikrozkušavek, zmrazena pomocí tekutého dusíku a umístěna do -80 °C, případně byla ihned použita na transformaci.

4.2.2.6 Transformace kompetentních buněk *Staphylococcus aureus* elektroporací

1. Hluboce zmrazené kompetentní buňky *Staphylococcus aureus* byly rozpuštěny na ledě a rozděleny do 1,5ml mikrozkušavek po 50 µl (příp. byly použity čerstvě připravené buňky).
2. K buňkám byl přidán plasmid o objemu 1 až 5 µl.
3. Buňky byly následně inkubovány 30 minut na ledě.
4. 50 µl bakteriální suspenze bylo přeneseno do vychlazené elektroporační kyvety (0,2 cm) a vystaveno elektrickému pulzu (1,8 kV) po dobu 2,5 ms.
5. Ihned po elektroporaci bylo k buňkám přidáno 750 µl BHI média s glukosou.
6. Suspenze byla přenesena do čisté 1,5ml mikrozkušavky a po dobu 2 hod inkubována na třepače při 37 °C a otáčkách 200 RPM.

4.2.3 METODY PRÁCE S DNA

4.2.3.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce slouží k amplifikaci vybraného úseku DNA v *in vitro* podmínkách pomocí termostabilní polymerasy izolované z termofilního mikroorganismu. Zde byla PCR reakce využita při klonování a pro ověření přítomnosti určitého konstruktu v transformantech (tzv. koloniová PCR využívající malou část bakteriální kolonie jako templát pro amplifikaci). Dále byla použita technika RT-PCR. Princip této metody a její aplikace jsou uvedeny v odd. 4.2.4.4.

4.2.3.1.1 Amplifikace kratších variant konstruktů LCreg_538 (LCreg_375, LCreg_247)

Templátem pro přípravu obou konstruktů byl konstrukt LCreg_538. Pro přípravu konstruktů LCreg_375 byly použity primery F.P_Michaela_MUT3_54C a R.P_Michaela_Prom_Del_56C, pro přípravu konstruktů LCreg_247 byly použity primery F.P_Michaela_MUT4_55C a R.P_Michaela_Prom_Del_56C. Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (50 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
5x Phusion® HF r. pufr	10 µl	Úvodní denaturace	98 °C	1 min	1
50 mM MgCl ₂	1 µl	Denaturace	98 °C	30 sec	30
10 mM dNTP	1 µl	Nasednutí primerů	57 °C	30 sec	
F.P.	1 µl	Elongace	72 °C	3 min	
R.P.	1 µl	Dokončení elongace	72 °C	5 min	1
Phusion® HF pol	0,5 µl	Zchlazení	15 °C	1 min	1
Templát	0,5 µl				
DMSO	1 µl				
ddH ₂ O	34 µl				

4.2.3.1.2 Koloniová PCR pro ověření přítomnosti konstruktů LCre_g_375 a LCre_g_247

Templátem pro reakci byla nepatrná část kolonie připravených transformantů *E. coli* XL1. Pro amplifikaci byly v obou případech použity primery VgaA_{lc}_REG_F_47C a R.P_VgaA_TRANSKR_ATTEN_56C. Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (20 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
10x Taq k. r. pufr	2 µl	Úvodní denaturace	96 °C	3 min	1
10 mM dNTP	0,2 µl	Denaturace	96 °C	15 sec	23
F.P.	0,2 µl	Nasednutí primerů	50 °C	15 sec	
R.P.	0,2 µl	Elongace	72 °C	45 sec	
Taq-Purple pol	0,2 µl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
Transformant	-				
ddH ₂ O	17,2 µl				

4.2.3.1.3 Amplifikace LCre_g-eqFP650 s mutací ve start kodonu uORF (uORF_mut)

Templátem pro přípravu konstruktů byl konstrukt LCre_g_538 připravený MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D. Tento konstrukt nese fluorescenční reportér eqFP650 napojený k 538 nukleotidů dlouhé upstream oblasti genu *vgaA_{lc}* přes 57 nukleotidů dlouhou část ORF genu *vgaA_{lc}*. Použitými primery byly F.P_VVA_MUT1_49C a R.P_VVA_MUT1_50C. Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (50 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
5x Phusion® HF r. pufr	10 µl	Úvodní denaturace	98 °C	1 min	1
10 mM dNTP	0,5 µl	Denaturace	98 °C	10 sec	25
F.P.	0,5 µl	Nasednutí primerů	45 °C	15 sec	
R.P.	0,5 µl	Elongace	72 °C	3 min 30 sec	
Phusion® HF pol	0,5 µl	Dokončení elongace	72 °C	3 min	1
Templát	0,5 µl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
ddH ₂ O	37 µl				

4.2.3.1.4 Amplifikace Vga_{ALC} – insert pro SLiCE (LCreg-Vga_{ALC})

Amplifikace tohoto insertu byla provedena MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D. za použití primerů F.P._VgaAlc_Own_P (55C) a R.P._VgaAlc_Own_P (56C). Templátem pro reakci byla genomová DNA ze *Staphylococcus haemolyticus* 7067_4_76.

4.2.3.1.5 Amplifikace Vga_{ALC}_EQ1+2 – insert pro SLiCE (LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2)

Templátem pro přípravu insertu byl konstrukt pRB374_ALCE105,410Q připravený Mgr. Jakubem Lenartem. Použitými primery byly F.P._VgaAlc_Own_P (55C) a R.P._VgaAlc_Own_P (56C). Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (50 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
5x Phusion® HF r. pufr	10 µl	Úvodní denaturace	95 °C	3 min	1
10 mM dNTP	1 µl	Denaturace	95 °C	15 sec	30
F.P.	1 µl	Nasednutí primerů	50-65 °C	30 sec	
R.P.	1 µl	Elongace	72 °C	1 min	
Phusion® HF pol	0,5 µl	Dokončení elongace	72 °C	3 min	1
Templát	0,5 µl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
DMSO	1 µl				
ddH ₂ O	35 µl				

4.2.3.1.6 Amplifikace konstruktů pRMC2 s LCreg oblastí – vektor pro SLiCE (LCreg-Vga_{ALC} a LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2)

Templátem pro přípravu vektoru pro SLiCE byl konstrukt LCreg_538, použitými primery byly F.P._VgaAlc_Own_P_Plasmid (57C) a R.P._VgaAlc_Own_P_Plasmid (54). Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (50 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
5x Q5® r. pufr	10 µl	Úvodní denaturace	95 °C	3 min	1
10 mM dNTP	0,5 µl	Denaturace	95 °C	15 sec	30
F.P.	0,5 µl	Nasednutí primerů	50-65 °C	30 sec	
R.P.	0,5 µl	Elongace	72 °C	3 min 30 sec	
Templát	0,5 µl	Dokončení elongace	72 °C	3 min	1
Q5® HF pol	0,5 µl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
ddH ₂ O	37,5 µl				

4.2.3.1.7 Amplifikace Vga_{ALC} s částí eqFP650 – insert pro SLiCE (LCreg-Vga_{ALC}-eqFP650)

Amplifikace tohoto insertu byla provedena MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D. za použití primerů F.P._VgaAlc_Own_P (55C) a R.P._VgaAlc_eqFP_Own_P (56C). Templátem pro reakci byla využita genomová DNA ze *Staphylococcus haemolyticus* 7067_4_76.

4.2.3.1.8 Amplifikace Vga_{ALC}_EQ1+2 s částí eqFP650 – insert pro SLiCE reakci (LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2-eqFP650)

Templátem pro přípravu insertu pro SLiCE byl konstrukt Vga_{ALC}EQ1+2eqFP650 (050) připravený Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou, Ph.D. Použitými primery byly F.P._VgaAlc_Own_P (55C) a R.P._VgaAlc_Own_P (56C). Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (50 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
5x Phusion® HF r. pufr	10 µl	Úvodní denaturace	95 °C	3 min	1
10 mM dNTP	1 µl	Denaturace	95 °C	15 sec	30
F.P.	1 µl	Nasednutí primerů	50-65 °C	30 sec	
R.P.	1 µl	Elongace	72 °C	1 min	
Templát	0,5 µl	Dokončení elongace	72 °C	3 min	1
Phusion® HF pol	0,5 µl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
ddH ₂ O	36 µl				

4.2.3.1.9 Amplifikace konstruktů pRMC2 s LCreg oblastí a s eqFP650 – vektor pro SLiCE reakci (LCreg-Vga_{ALC}-eqFP650 a LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2-eqFP650)

Templátem pro přípravu vektoru pro SLiCE byl konstrukt LCreg_538, použitými primery byly F.P._VgaAlc_eqFP_Own_P_Plasmid a R.P._VgaAlc_Own_P_Plasmid (54). Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (50 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
5x Q5® r. pufr	10 µl	Úvodní denaturace	95 °C	3 min	1
10 mM dNTP	0,5 µl	Denaturace	95 °C	15 sec	30
F.P.	0,5 µl	Nasednutí primerů	50-65 °C	30 sec	
R.P.	0,5 µl	Elongace	72 °C	3 min 30 sec	
Templát	0,5 µl	Dokončení elongace	72 °C	3 min	1
Q5® HF pol	0,5 µl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
ddH ₂ O	37,5 µl				

4.2.3.1.10 Amplifikace LCreg-eqFP650 s mutacemi v sekvenci uORF (uORF_9AA, uORF_MGG, uORF_MKF, uORF_MRL, uORF_MRLR a uORF_MRQ)

Templátem pro přípravu konstruktů uORF_MRLR byl konstrukt uORF_MRL, templátem pro přípravu ostatních konstruktů byl LCreg_538, použitými primery byly F.P._uORF_9AA a R.P._uORF_9AA, F.P._uORF_MGG a F.P._uORF_MGG, F.P._uORF_MKF a R.P._uORF_MKF, F.P._uORF_MRL a R.P._uORF_MRL, F.P._uORF_MRLR a R.P._uORF_MRLR, F.P._uORF_MRQ a R.P._uORF_MRQ. Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (50 µl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
5x Phusion® HF r. pufr	10 µl	Úvodní denaturace	95 °C	30 sec	1
10 mM dNTP	1 µl	Denaturace	95 °C	30 sec	16
F.P.	125 ng	Nasednutí primerů	55 °C	1 min	
R.P.	125 ng	Elongace	72 °C	3 min 30 sec	1
Phusion® HF pol	1 µl	Dokončení elongace	72 °C	3 min	
Templát	5-50 ng	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
ddH ₂ O	do 50 µl				

4.2.3.2 Elektroforéza v agarosovém gelu

Elektroforéza v agarosovém gelu se používá pro separaci molekul DNA a RNA. Technika je založená na odlišné mobilitě různě velkých záporně nabitých molekul nukleových kyselin v elektrickém poli. Rychlost a přesnost separace je dána molekulovou hmotností a konformací fragmentů DNA a RNA, koncentrací agarosu v gelu, použitým pufrům a napětím. Rozdělené molekuly nukleových kyselin jsou vizualizovány pomocí interkalačních barviček, zde pomocí fluorescenční látky ethidium bromid (EtBr). V rámci diplomové práce byl univerzálně použit 1% agarosový gel pro separaci molekul DNA a 2% agarosový gel pro separaci molekul RNA.

1. Ve 100 ml 1x TAE pufru byl zahřátím rozpuštěn 1, resp. 2 g agarosu (pro přípravu 1%, resp. 2% agarosového gelu).
2. Po vychladnutí směsi na cca 50 °C byl přidán 1 µl EtBr (konečná koncentrace 0,001 %).
3. Směs byla nalita do vaničky s usazeným hřebenem.
4. Gel se nechal 20 min tuhnout.
5. Poté byla vanička s gelem umístěna do elektroforetické vany a zalita 1x TAE pufrům.
6. Z gelu byl vytažen hřeben a do jamiček byly naneseny 3 µl markeru molekulových hmotností (1 kb Plus DNA ladder či GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) a po 5 µl analyzovaných vzorků smíchaných s 10x vzorkovým pufrům (výsledná koncentrace 1x).

7. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 3-5 V/cm.
8. Výsledek separace byl vyhodnocen pomocí programu GENESys V 1.5.5.0.

4.2.3.3 Purifikace PCR produktu a izolace DNA z gelu

PCR produkt byl přečištěn pomocí komerčně dostupného kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

1. Na kolonku byl nanesen PCR produkt smíchaný s 200 μ l Membrane Binding Solution.
2. Vzorek byl zcentrifugován (30 sec, 8 000 RPM) a kapalina prošlá skrz byla odstraněna.
3. Do kolonky bylo přidáno 700 μ l Wash Solution, směs byla zcentrifugována (30 sec, 8 000 RPM) a kapalina prošlá skrz byla odstraněna.
4. Do kolonky bylo přidáno 300 μ l Wash Solution a vzorek byl zcentrifugován (2 min, 8 000 RPM).
5. Kolonka s navázanou DNA byla přesunuta do sterilní 1,5ml mikroskopické kumavky.
6. Na membránu kolonky bylo napipetováno 30 μ l sterilní vody (zbavené nukleas), vzorek byl ponechán 1 minutu při pokojové teplotě a poté zcentrifugován (1 min, 8 000 RPM).
7. Kolonka byla odstraněna a přečištěná DNA byla uchovávána v -20 °C.

DNA byla z agarosového gelu izolována pomocí komerčně dostupného kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

1. Po ukončení elektroforézy byla skalpelem vyříznuta část gelu s požadovaným DNA bandem. Gelový výřez byl zvážen a umístěn do 1,5ml mikroskopické kumavky.
2. Na 10 mg gelového výřezu bylo přidáno 10 μ l Membrane Binding Solution.
3. Směs byla zvortexována a inkubována v 65 °C do úplného rozpuštění gelu. Poté byla tekutina přesunutá na kolonku.
4. Vzorek byl zcentrifugován (30 sec, 8 000 RPM) a kapalina prošlá skrz byla odstraněna.
5. Do kolonky bylo přidáno 700 μ l Wash Solution, vzorek byl zcentrifugován (30 sec, 8 000 RPM) a kapalina prošlá skrz byla odstraněna.
6. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l Wash Solution a vzorek byl zcentrifugován (5 min, 8 000 RPM).
7. Kolonka s navázanou DNA byla přesunuta do sterilní 1,5ml mikroskopické kumavky.
8. Na membránu kolonky bylo napipetováno 30 μ l sterilní vody (zbavené nukleas), vzorek byl ponechán 1 minutu při pokojové teplotě a poté zcentrifugován (1 min, 8 000 RPM).
9. Kolonka byla odstraněna a vyizolovaná a přečištěná DNA byla uchovávána v -20 °C.

4.2.3.4 Ošetření PCR produktu pomocí DpnI

V případě, že byla prováděna cílená mutagenese konstruktů pomocí PCR, bylo po dokončení reakce nutné odstranit templátovou DNA, která nenesou mutaci. Templátová DNA je (na rozdíl od PCR produktu) methylovaná, proto ji lze specificky štěpit pomocí restriktivní endonukleasy DpnI, která rozpoznává a štěpí výhradně methylovanou DNA (5'-GmA[▼]TC-3').

Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 12. Pokud byla DpnI restriktasa aplikována na purifikovaný PCR produkt, následovala tepelná inaktivace enzymu (20 min, 80 °C), pokud byla aplikována na nepřečištěný PCR produkt, inaktivace provedena nebyla a následovala ihned purifikace PCR produktu (viz odd. 4.2.3.3).

Tab. 12: Složení reakční směsi pro ošetření PCR produktu DpnI enzymem a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace	Inaktivace
10x pufr NEBuffer 4	3 µl	16 hod, 37 °C	20 min, 80 °C (případně purifikace PCR produktu)
PCR produkt	20 µl		
DpnI	1 µl		
dH ₂ O	6 µl		

4.2.3.5 Fosforylace PCR produktu pomocí kinasy

Primery použité pro PCR amplifikaci nejsou na svých 5' koncích fosforylované. V případě, že bylo potřeba produkt připravený PCR reakcí zaligovat (cirkularizovat) *in vitro*, musel být tento produkt nejprve na svých 5' koncích fosforylován pomocí kinasy. Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 13. Fosforylace následovala po purifikaci (viz odd. 4.2.3.3) a ošetření PCR produktu pomocí DpnI enzymu (viz odd. 4.2.3.4).

Tab. 13: Složení reakční směsi pro fosforylaci PCR produktu T4 polynukleotid kinasou a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace	Inaktivace
10x pufr pro T4 polynukleotid kinasu	3 µl	2 hod, 37 °C	20 min, 65 °C
PCR produkt	25 µl		
10 mM ATP	1 µl		
T4 polynukleotid kinasu	1 µl		

4.2.3.6 SLiCE reakce

Klonovací technika SLiCE (Seamless Ligation Cloning Extract) (Zhang et al., 2012) se používá pro spojení dvou (či více) vhodně upravených DNA fragmentů do jedné cirkulární molekuly. Metoda využívá bakteriální buněčný extrakt, který funguje jako katalyzátor *in vitro* homologní rekombinace mezi jednotlivými fragmenty.

Na základě doporučení autorů protokolu byl pro reakci zvolen molární poměr mezi vektorem a insertem 1:3. Buněčný extrakt je možné připravit svépomocí z komerčně dostupných kmenů *Escherichia coli* (např. JM109, DH10B). Složení reakční směsi a podmínky SLiCE reakce jsou uvedeny v Tab. 14. Reakční směs byla poté bez dalších úprav transformována elektroporací do buněk *Escherichia coli* (viz odd. 4.2.2.4).

Tab. 14: Složení reakční směsi pro SLiCE a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace
10x pufr pro T4 DNA ligasu s 10 mM ATP	1 µl	1 hod, 37 °C
Insert	2 µl	
Vektor	6 µl	
SLiCE extrakt	1 µl	

4.2.3.7 Štěpení DNA restrikčními enzymy

Restrikční endonukleasy specificky štěpí dvouvláknovou DNA za vzniku fragmentů s přesně definovanými konci. Tyto fragmenty mohou být dále využity pro klonování genů.

Restrikční štěpení bylo prováděno dle doporučení výrobce (New England BioLabs). Vektor i insert byly připravovány souběžným štěpením oběma enzymy v jedné reakci, proto byl zvolen takový pufr, ve kterém je aktivita obou enzymů co nejvyšší. Složení reakčních směsí a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 15, resp. Tab. 16. Po doběhnutí reakce byla úplnost štěpení vždy ověřena DNA elektroforézou (viz odd. 4.2.3.2). Pokud štěpení neproběhlo kompletně, byla reakční doba prodloužena. Po úplném naštěpení následovalo rozdělení fragmentů pomocí DNA elektroforézy a izolace fragmentů z gelu pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (viz odd. 4.2.3.3).

Tab. 15: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení recipientního konstruktů (příprava vektoru) a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace	Inaktivace
10x pufr CutSmart®	20 µl	4 hod, 37 °C	20 min, 65 °C
DNA	10 µg		
DraIII	0,5 µl		
XbaI	1,5 µl		
dH ₂ O	do 200 µl		

Tab. 16: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení donorového konstruktů (příprava insertu) a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace	Inaktivace
10x pufr CutSmart®	20 µl	4 hod, 37 °C	20 min, 65 °C
DNA	10 µg		
DraIII	1,5 µl		
XbaI	1,5 µl		
dH ₂ O	do 200 µl		

4.2.3.8 Ligace DNA

DNA ligasa je enzym schopný tvořit fosfodiesterovou vazbu mezi dvěma konci DNA. V této diplomové práci byla DNA ligasa využita pro cirkularizaci lineárního PCR produktu, případně pro spojení dvou fragmentů DNA (vektor, insert) vzniklých štěpením restričními enzymy. Složení reakčních směsí a podmínky reakcí jsou uvedeny v Tab. 17, resp. Tab. 18. Pro ligaci dvou fragmentů byl dodržen molární poměr mezi vektorem a insertem 1:3. V případě, že byla DNA ligasa použita pro cirkularizaci PCR produktu, byl PCR produkt nejprve ošetřen DpnI enzymem (viz odd. 4.2.3.4) a fosforylován kinasou (viz odd. 4.2.3.5). V případě ligace fragmentů získaných restričním štěpením se fosforylace neprovádí. Po ukončení reakce byla ligační směs transformována do *Escherichia coli* XL1-Blue, nebo XL10-Gold.

Tab. 17: Složení reakční směsi pro ligaci (cirkularizaci) lineárního PCR produktu a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace	Inaktivace
10x pufr pro T4 DNA ligasu s 10 mM ATP	1 μ l	16 hod, 4 °C	10 min, 65 °C
PCR produkt	8 μ l		
T4 DNA ligasa	1 μ l		

Tab. 18: Složení reakční směsi pro ligaci restričních fragmentů a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace	Inaktivace
10x pufr pro T4 DNA ligasu s 10 mM ATP	2 μ l	1 hod, RT °C	10 min, 65 °C
Insert (DraIII + XbaI)	1 x		
Vektor (DraIII + XbaI)	3 x		
T4 DNA ligasa	1 μ l		
dH ₂ O	do 20 μ l		

4.2.3.9 Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována pomocí komerčně dostupného kitu Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega).

1. Do 3 ml LB média s příslušným antibiotikem byla zaočkována 1 kolonie transformovaných buněk *Escherichia coli* narostlých na LB agaru s příslušným antibiotikem. Kultura byla inkubována na třepačce přes noc (16-18 hod) při 37 °C a otáčkách 200 RPM.
2. Následující den byla bakteriální kultura zcentrifugována (1 min, 4 000 RPM, 4 °C).
3. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 250 μ l Cell Resuspension Solution.
4. K suspenzi bylo přidáno 250 μ l Cell Lysis Solution. Směs byla jemně promíchána.
5. Dále bylo přidáno 10 μ l Alkaline Protease Solution a opět bylo vše opatrně promícháno.

6. Suspenze byla inkubována 5 min při pokojové teplotě.
7. Poté bylo k suspenzi přidáno 350 μ l Neutralization Solution a směs byla promíchána.
8. Vzorek byl zcentrifugován (10 min, maximální rychlost) a supernatant byl přepipetován do kolonky vložené do sběrné zkumavky (součástí kitu).
9. Vzorek byl zcentrifugován (1 min, maximální rychlost), kapalina prošlá skrz byla odstraněna a kolonka byla znovu vložena do sběrné zkumavky.
10. Do kolonky s navázanou DNA bylo přidáno 750 μ l Wash Solution (obsahuje etanol).
11. Následovala centrifugace (1 min, maximální rychlost) a odstranění stočené kapaliny.
12. Do kolonky bylo přidáno 250 μ l Wash Solution a vzorek byl zcentrifugován (3 min, maximální rychlost).
13. Kolonka s navázanou a promytou DNA byla opatrně přesunuta do sterilní 1,5ml mikrozkušavky tak, aby nedošlo zároveň k přenosu tekutiny ze sběrné zkumavky.
14. Na membránu kolonky bylo napipetováno 100 μ l sterilní vody (zbavené nukleas).
15. Následovala centrifugace (1 min, maximální rychlost).
16. Kolonka byla odstraněna a izolovaná DNA byla uchovávána v -20 °C.

4.2.3.10 Sekvence DNA

Sekvenování DNA bylo prováděno firmou Eurofins Genomics (komerčně dostupný kit Mix2Seq Kit ON). Vzorky pro sekvenování byly připraveny dle doporučení výrobce: 15 μ l purifikované plasmidové DNA o koncentraci 50-100 ng/ μ l, 2 μ l primeru o koncentraci 10 μ M. Výsledky sekvenování byly vyhodnoceny pomocí programu CLC Main Workbench 6.8.1. Sekvence DNA byla využita pro ověření správnosti nově připravených konstruktů.

4.2.4 METODY PRÁCE S RNA

Při práci s RNA bylo potřeba dodržovat několik zásad vedoucích k minimalizaci možnosti kontaminace vzorku RNasami, které izolovanou RNA rychle degradují. Před zahájením činnosti bylo nutné pracovní stůl a pomůcky (např. elektroforetikou vanu) důkladně umýt jarem a vodou a vše ošetřit přípravkem pro inaktivaci RNas. Zde byly použity přípravky PCR CleanTM DNA & RNA Decontamination Spray a RNaseZAPTM Cleaning agent for removing RNase. Při práci s RNA bylo potřeba pracovat velmi čistě, používat speciální špičky s filtrem a striktně používat ochranné rukavice a plášť. Pro přípravu vzorku bylo nezbytné používat vodu bez obsahu RNas (komerčně dostupná). Vhodné bylo i používání pomůcek vyhrazených pouze pro práci s RNA (v našem případě sada pipet a elektroforetická aparatura).

4.2.4.1 Izolace celkové RNA

1. Hluboce zamrazené buňky byly vysety na plotnu s BHI agarem a s přidaným selekčním antibiotikem a byly inkubovány přes noc (16-18 hod) při 37 °C.
2. Buňky byly resuspendovány ve 3 ml fyziologického roztoku na denzitu McF = 1.
3. Z této suspenze bylo zaočkováno 600 µl do 12 ml BHI média s přidaným selekčním a testovaným antibiotikem a kultura se nechala narůst do OD = 1.
4. Po dosažení požadované OD bylo 10 ml suspenze stočeno na centrifuze (10 min, 3 000 RPM), supernatant byl odstraněn pomocí vakuové pumpy a pelet byl resuspendován v 250 µl TE⁻¹ pufru. Další 1 ml suspenze byl stočen a uchován v -80 °C pro pozdější WB analýzu (viz odd. 4.2.5.2 a 4.2.5.3).
5. Směs byla přesunuta do zkumavky Lysing Matrix B obsahující skleněné kuličky pro destrukci buněk (průměr 0,1 mm).
6. Buňky byly lyzovány pomocí FastPrep (60 sec, 6 pohybů za sekundu).
7. K lyzátu bylo přidáno 750 µl TRIzol, vzorek byl zvortexován a nechán stát 5 min při pokojové teplotě.
8. Ke směsi bylo přidáno 200 µl chloroformu, vzorek byl zvortexován a nechán stát 2 až 3 min při pokojové teplotě.
9. Vzorek byl zcentrifugován (15 min, 12 000 RPM, 4 °C) a svrchní vodná fáze byla přesunuta do čisté mikrozukavky.
10. Ke směsi bylo přidáno 500 µl isopropanolu a vzorek byl zvortexován.
11. Poté byl vzorek zcentrifugován (10 min, 12 000 RPM, 4 °C), supernatant byl odstraněn pomocí vakuové pumpy a pelet byl resuspendován v 1 ml 75% EtOH.
12. Vzorek byl opět zcentrifugován (5 min, 12 000 RPM, 4 °C), supernatant odstraněn a pelet byl resuspendován v 50, případně 100 ul destilované vody zbavené RNAs.
13. RNA byla uchovávána v -20 °C.

4.2.4.2 Ošetření izolované RNA pomocí DNase I

Při práci s RNA je nežádoucí přítomnost DNA, proto byly vzorky s izolovanou RNA ošetřeny DNasou (endonukleasa). Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 19. Po ukončení reakce byla úspěšnost izolace a ošetření RNA ověřena elektroforézou (měly by být patrné alespoň dva výrazné bandy – 23S rRNA a 16S rRNA). Postup RNA elektroforézy je obdobný jako postup DNA elektroforézy (viz odd. 4.2.3.2.). Pro separaci RNA byl použit 2% agar a byla použita elektroforetická aparatura určená výhradně pro práci s RNA.

Tab. 19: Složení reakční směsi pro ošetření izolované RNA DNase I enzymem a podmínky reakce

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci	Inkubace	Inaktivace
10x pufr pro DNasu I	5 μ l	30 min, 37 °C	10 min, 75 °C
RNA	43 μ l		
DNasa I	2 μ l		

4.2.4.3 TRIzolová extrakce

TRIzol™ Reagent je činidlo skládající se z fenolu a guanidin isothiokyanátu. TRIzolová extrakce je obdobou fenol-chloroformové extrakce, která je založená na odlišné rozpustnosti DNA, RNA a proteinů v různých rozpouštědlech. TRIzol se ke směsi přidává v prvním kroku a udržuje integritu RNA. Přidání chloroformu vede k oddělení vodné (svrchní) a organické (spodní) fáze. RNA je obsažena ve vodné fázi, proteiny v organické fázi a DNA je na rozhraní obou fází. Protokol dále využívá isopropanol, který sráží RNA a umožňuje tak její přečištění.

1. K 45 μ l izolované RNA ošetřené DNasou I bylo přidáno 150 μ l TRIzolu, vzorek byl zvortexován a poté se nechal stát 5 min při pokojové teplotě.
2. Ke směsi bylo přidáno 40 μ l chloroformu, vzorek byl zvortexován a poté se opět nechal stát 2 min při pokojové teplotě.
3. Vzorek byl zcentrifugován (15 min, 13 000 RPM) a svrchní vodná fáze (obsahující RNA) byla přesunuta do čisté mikroskopické zkumavky.
4. Ke směsi bylo přidáno 100 μ l isopropanolu (precipituje RNA) a vzorek se nechal stát 10 min při pokojové teplotě.
5. Poté byl vzorek zcentrifugován (10 min, 13 000 RPM), supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 1 ml 75% ethanolu.
6. Vzorek byl opět zcentrifugován (10 min, 13 000 RPM), supernatant byl odstraněn a pelet se nechal krátce oschnout na vzduchu.
7. Následně byl pelet resuspendován v 20 μ l destilované vody zbavené RNas.
8. RNA byla uchovávána v -20 °C.

4.2.4.4 Reverzní transkripce RNA a následná PCR (RT-PCR)

Reverzní transkripce je proces, během kterého dochází za pomoci enzymu reverzní transkriptasa (RNA-dependentní DNA polymerasa) k syntéze DNA řetězce podle RNA předlohy. Takto syntetizovaná DNA se označuje jako komplementární DNA (cDNA) a slouží jako templát pro následnou PCR reakci, která ověřuje přítomnost sekvence zájmu v izolované RNA. Pro reverzní transkripci *vgaALC* byl využit primer RP_atten_VgaAlc, pro následnou PCR

reakci byla využita dvojice primerů F.P_Michaela_MUT4_55C a RP_atten_VgaAlc. Pro reverzní transkripci *rpoD* byl využit primer RP_rpoD, pro následnou PCR reakci byla využita dvojice primerů FP_rpoD a RP_rpoD (Theis et al., 2007).

1. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 12 μl ddH₂O (zbavené RNas), 1 μl 20 μM primeru, 1 μl 10 mM dNTP a 1 μl izolované a přečištěné celkové RNA. RNA ve všech vzorcích dosahovala stejné koncentrace. Do vzorku sloužícího jako pozitivní kontrola byl napipetován 1 μl plasmidové DNA namísto RNA. Do vzorku sloužícího jako negativní kontrola byl napipetován 1 μl ddH₂O namísto RNA. Všechny vzorky byly vytvořeny v duplikátech (paralely s a bez reverzní transkriptasy).
2. Směs byla inkubována 5 min při 65 °C a poté byla 1 min chlazená na ledu.
3. Ke směsi byly přidány 4 μl 5x RT pufru, 0,5 μl RNaseOUT (inhibitor RNas) a 0,5 μl reverzní transkriptázy MaximaH-. Od každého vzorku byla vytvořena zároveň paralela, která neobsahovala reverzní transkriptasu (negativní kontrola).
4. Směs byla inkubována 5 min při 25 °C, poté 1 hod při 50 °C a nakonec byla směs inkubována 5 min při 85 °C (inaktivace enzymu).
5. Nasyntetizovaná cDNA sloužila jako templát pro následnou PCR reakci. Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tab. 20 a 21.

Tab. 20: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro *vgaALC* cDNA.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (20 μl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
10x Taq k. r. pufr	2 μl	Úvodní denaturace	96 °C	1 min	1
10 mM dNTP	0,2 μl	Denaturace	96 °C	10 sec	24
F.P.	0,2 μl	Nasednutí primerů	55 °C	15 sec	
R.P.	0,2 μl	Elongace	72 °C	30 sec	
Taq-Purple pol	0,4 μl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
Templát (cDNA)	1 μl				
ddH ₂ O	16 μl				

Tab. 21: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro *rpoD* cDNA.

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci (20 μl)	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
10x Taq k. r. pufr	2 μl	Úvodní denaturace	95 °C	10 min	1
10 mM dNTP	0,2 μl	Denaturace	95 °C	20 sec	25
F.P.	0,2 μl	Nasednutí primerů	50 °C	20 sec	
R.P.	0,2 μl	Elongace	72 °C	20 sec	
Taq-Purple pol	0,4 μl	Zchlazení	15 °C	15 sec	1
Templát (cDNA)	1 μl				
ddH ₂ O	16 μl				

4.2.5 METODY PRÁCE S PROTEINY

4.2.5.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

1. Do 3 ml BHI média s přidaným selekčním antibiotikem byly zaočkovány buňky narostlé na BHI agaru s přidaným selekčním antibiotikem (kultivace 16-18 hod, 37 °C). Suspenze byla inkubována na třepačce přes noc (16-18 hod) při 37 °C a otáčkách 200 RPM.
2. Buňky byly přeočkovány do 3 ml BHI média s přidaným selekčním antibiotikem (počáteční $OD_{600nm} = \pm 0,1$) a suspenze byla kultivována na třepačce (37 °C, 200 RPM) do $OD_{600nm} = 1$.
3. Po dosažení požadované OD byl 1 ml suspenze stočen na centrifuze (1 min, 13 000 RPM, 4 °C), byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 50 μ l 1x PBS.
4. Ke vzorku byly přidány 2 μ l lysostaphinu, následovala inkubace 15 až 60 min při 37 °C.
5. Po ukončení inkubace bylo ke vzorku přidáno 50 μ l SDS-PAGE vzorkového pufru (2x) a vzorek byl inkubován 15 min při 95 °C.
6. Po ukončení inkubace byl lyzát stočen na centrifuze (15 sec, 13 000 RPM), tak aby zbytky buněk klesly na dno a nebyly následně nanášeny na gel.

4.2.5.2 Denaturující elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za využití dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) je technika využívaná pro separaci proteinů. Dodecylsírany sodný obklopí proteiny a dodá jim záporný náboj, jehož velikost je přímo úměrná velikosti proteinu. Rychlost a přesnost separace je dána koncentrací akrylamidu a bis-akrylamidu v gelu, délkou a molekulovou hmotností polypeptidového řetězce, stupněm denaturace, posttranslačními modifikacemi a použitým napětím. Oddělené proteiny lze vizualizovat např. pomocí barvičky Coomassie Brilliant Blue nebo může být provedena Western blot analýza. V rámci této diplomové práce byl univerzálně použit 10% separační gel a 4% zaostřovací gel.

1. Skla (1 mm) byla důkladně omyta saponátem a destilovanou vodou, očištěna ethanolem a osušena. Následně byla sestavena aparatura pro nalévání gelů.
2. Ve zkumavce byl připraven 10% separační gel dle Tab. 22. Jako poslední byl do směsi přidán APS a TEMED. Směs byla ihned napipetována mezi skla cca do 4/5 jejich výšky.
3. Nanesený gel byl opatrně převrstven 1 ml destilované vody (pro zajištění anaerobních podmínek) a nechán 30 min polymerovat. Poté byla voda slita.
4. Ve zkumavce byl připraven 4% zaostřovací gel dle Tab. 22. Jako poslední byl přidán APS a TEMED. Směs byla ihned napipetována mezi skla nad separační gel a byl zapuštěn hřeben.

- Gel se nechal 30 min polymerovat.
- Poté byla sestavena elektroforetická vana, která byla naplněna 1x SDS-PAGE pufrem.
- Z gelu byl opatrně vytažen hřeben a do vzniklých jamiček byl nanesen marker molekulových hmotností (BlueElf Prestained Protein Marker) v množství 4 μ l a analyzované vzorky připravené dle protokolu v odd. 4.2.5.1 v množství 5 či 10 μ l.
- Elektroforéza probíhala v zaostřovacím gelu při 80 V, v separačním gelu při 130 V.
- Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut ze skel a výsledek separace byl vyhodnocen pomocí Western blot analýzy.

Tab. 22: Složení separačního (10%) a zaostřovacího (4%) gelu pro SDS-PAGE

Složení gelu	Separační gel 10% (2x)	Zaostřovací gel 4% (2x)
40% AA + 1,7% bis-AA	2,5 ml	666 μ l
1,5 M Tris-Cl, pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	-	1250 μ l
dH ₂ O	4,7 ml	2984 μ l
5% SDS	200 μ l	100 μ l
30% APS	100 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l

4.2.5.3 Western blot

Western blot je technika využívaná pro detekci specifického proteinu ve směsi proteinů. Proteiny jsou rozděleny dle velikosti pomocí SDS-PAGE elektroforézy a za pomoci elektrického proudu jsou přeneseny z gelu na povrch speciální membrány, na které probíhá detekce pomocí specifických protilátek. Na protein zájmu byla navázána primární protilátka (zde králičí) a následně sekundární protilátka (zde kozí) konjugovaná s reportérovým enzymem (zde křenová peroxidasa). Detekce signálu byla prováděna chemiluminiscenčním způsobem, kdy reportérový enzym přeměňoval přidaný substrát na nestabilní produkt, který se stabilizoval vyzářením signálu. Tento signál byl detekován. Protože množství vyzářeného signálu je úměrné množství sekundární protilátky a její množství je úměrné množství detekovaného proteinu, je možné odhadnout na základě síly signálu množství tohoto proteinu ve vzorku.

- Polyakrylamidový gel s rozdělenými proteiny byl namočen do přenosového pufru.
- PVDF membrána o velikosti zhruba 5 x 8 cm byla za pomoci pinzety namočena na 10 sec do methanolu, čímž došlo k její aktivaci. Po aktivaci nesmí membrána vyschnout.
- Poté byl methanol slit a do krabičky s membránou byl ihned nalit přenosový pufr.
- Dvě savé membrány byly namočeny do přenosového pufru.

5. Na spodní desku blotovacího přístroje (anoda) byly umístěny jednotlivé vrstvy v tomto pořadí: savá membrána, PVDF membrána (opatrně za pomoci pinzety), PAGE, savá membrána. Při vrstvení bylo nutné odstranit všechny vzniklé bubliny. Poté bylo přiloženo víko blotovacího přístroje (katoda).
6. Blotování probíhalo 15 min při napětí 15 V.
7. Po ukončení přenosu byla membrána pinzetou přenesena do 5% mléka v 1x PBS a inkubována 1 hod při pokojové teplotě (případně přes noc ve 4 °C). V tomto kroku se kasein z mléka navázal na neobsazená vazebná místa membrány a zablokoval je.
8. Poté byla membrána pinzetou přenesena do 2 ml 1% mléka v 1x PBS s přidanou primární protilátkou (ředění 1:1000) a byla inkubována 1 hod při pokojové teplotě za mírného třepání.
9. Nespecificky navázaná protilátka byla odstraněna promytím v 1x PBS. Promytí bylo provedeno alespoň třikrát po 15 min.
10. Poté byla membrána pinzetou přenesena do 2 ml 1% mléka v 1x PBS s přidanou sekundární protilátkou (ředění 1:2000) a byla inkubována 1 hod při pokojové teplotě za mírného třepání.
11. Nespecificky navázaná protilátka byla odstraněna promytím v 1x PBS. Promytí bylo provedeno nejméně třikrát po 15 min.
12. Na membránu označenou oběma protilátkami byly napipetovány 2 ml substrátu (Immobilon™ Western chemiluminescent HRP Substrate) a signál byl detekován pomocí přístroje ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

4.2.6 STANOVENÍ CITLIVOSTI NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Citlivost k antimikrobiálním látkám je možné testovat kvalitativně nebo kvantitativně. Kvalitativní testování umožňuje určit, zda je daný kmen bakterie citlivý nebo rezistentní k určitému antibiotiku. Citlivosti jednotlivých kmenů lze srovnat na základě velikosti inhibiční zóny na kultivační misce. Kvantitativní metody pak slouží pro stanovení přesné koncentrace antibiotika, při které bakterie viditelně přestává růst (tzv. minimální inhibiční koncentrace, MIC). V rámci experimentální části této diplomové práce byla pro zjišťování citlivostí na antibiotika použita kvantitativní mikrodiluční metoda v mikrotitračních destičkách.

4.2.6.1 Mikrodiluční metoda

Mikrodiluční metoda využívá ředící řadu antibiotika vytvořenou v jamkách mikrotitrační destičky (zde 96 jamkové). V rámci diplomové práce se pracovalo s dvojkovou ředící řadou. Měření standardně probíhalo v MH médiu (výjimečně v BHI médiu) s přidávkem selekčního

antibiotika (pro udržení konstruktů). Testována byla antibiotika dle potřeby (linkomycin, klindamycin, pristinamycin IIA, tiamulin, tetracyklin, erythromycin, spiramycin). Nárůst buněk byl stanovován po 24 hodinové kultivaci v termostatu při 37 °C. Výsledné hodnoty MIC byly určeny na základě dvou měření s duplikáty.

1. Do jamek A1 až H11 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μ l MH média s přidaným selekčním antibiotikem.
2. Do jamek posledního sloupce (A12 až H12) bylo napipetováno 200 μ l MH média s přidaným selekčním antibiotikem a s přidaným testovaným antibiotikem o koncentraci 128 μ g/ml.
3. Z jednotlivých jamek posledního sloupce 12 bylo odebráno 100 μ l média, které bylo přidáno do jamek sloupce 11. Obsah jamek byl promíchán. Takto se postupovalo až k jamkám sloupce 2. 100 μ l média z jamek sloupce 2 bylo odstraněno. Tímto způsobem byla připravena ředící řada, kdy se koncentrace testovaného antibiotika snižovala vždy o polovinu (koncentrace 0,125 až 128 μ g/ml). Jamky sloupce 1 zůstaly bez testovaného antibiotika (koncentrace 0 μ g/ml) a sloužily jako kontrola.
4. Inokulum bakterií bylo připraveno resuspendováním jedné kolonie (narostlé na BHI agaru s přidaným selekčním antibiotikem; kultivace 16-18 hod, 37 °C) ve 3 ml fyziologického roztoku (0,9% NaCl) na denzitu McF = 0,5 – 1.
5. Do všech jamek destičky bylo přidáno 5 μ l inokula příslušného kmene bakterií a směs byla promíchána. Výsledný objem v každé jamce tak byl 105 μ l.
6. Připravená destička byla dokola potažena parafilmem (prevence vysychání a odpařování média do přístroje a minimalizace možnosti kontaminace) a na rozích přelepena páskou (prevence protržení parafilmu).
7. Destička byla inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 24 hod. Pomocí spektrofotometru Tecan Infinite 200Pro změřena hodnota A_{600nm} a určena minimální inhibiční koncentrace.

4.2.7 MĚŘENÍ FLUORESCENCE REPORTÉRU EXPRESE eqFP650

4.2.7.1 Kmeny s konstrukty, které nekódují kompletní rezistenční protein, pouze fluorescenční reportér pod kontrolou přirozeného regulátoru *vga_{4LC}*

V případě kmenů nesoucích konstrukty bez kompletního funkčního rezistenčního proteinu byla intenzita fluorescence měřena v přítomnosti testovaného antibiotika o velmi nízké koncentraci. Buňky byly kultivovány mimo mikrotitrační destičku ve větším objemu média (takto kultivované buňky poskytují lepší signál než buňky kultivované přímo na destičce).

1. Inokulum bakterií bylo připraveno resuspendováním jedné kolonie (narostlé na BHI agaru s přidaným selekčním antibiotikem; kultivace 16-18 hod, 37 °C) ve 3 ml fyziologického roztoku (0,9% NaCl) na denzitu McF = 0,5 – 1.
2. Do 2 ml BHI média s přidaným selekčním antibiotikem a s nebo bez testovaného antibiotika o subinhibiční koncentraci bylo přidáno 100 µl inokula. Kultura byla inkubována na třepačce přes noc (16-18 hod) při 37 °C a otáčkách 200 RPM.
3. Po ukončení kultivace bylo provedeno kontrolní měření OD_{600nm}. V případě potřeby byla kultura naředěna tak, aby porovnávané vzorky byly přibližně stejně denzní. V případě práce s větším počtem vzorků (experiment z oddělení 5.4.2) byl tento krok vynechán a naměřený fluorescenční signál byl normalizován vzhledem k absorbanci A_{600nm} buněčné suspenze.
4. 1 ml suspenze byl stočen na centrifuze (1 min, maximální rychlost), pomocí vakuové pumpy byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 100 µl 1x PBS.
5. 50 µl buněčné suspenze bylo nanášeno na černou 96 jamkovou mikrotitrační destičku. V případě práce s větším počtem vzorků (experiment z oddělení 5.4.2) byla použita transparentní destička.
6. Pomocí spektrofotometru Tecan Infinite 200Pro byla změřena intenzita fluorescence (Ex_{590nm}/Em_{650nm}), případně absorbance A_{600nm}.

4.2.7.2 Kmeny s konstrukty, které kódují kompletní rezistenční protein v *in cis* uspořádání s přirozeným regulátorem *vga4_{LC}*

V případě kmenů nesoucích konstrukty s kompletním funkčním rezistenčním proteinem byla intenzita fluorescence měřena v přítomnosti testovaného antibiotika o dvanácti koncentracích (0; 0,125 až 128 µg/ml). Buňky byly kultivovány přímo na mikrotitrační destičce, neboť tento typ konstruktů poskytuje dostatečně silný signál.

1. Do jamek A1 až H11 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno multikanálovou pipetou 100 µl BHI média s přidaným selekčním antibiotikem.
2. Do jamek posledního sloupce (A12 až H12) bylo napipetováno 200 µl BHI média s přidaným selekčním antibiotikem a testovaným antibiotikem o koncentraci 128 µg/ml.
3. Pomocí multikanálové pipety bylo z jamek posledního sloupce odebráno 100 µl média a bylo přesunuto do jamek sloupce 11. Obsah jamek byl promíchán. Takto se postupovalo až k jamkám sloupce 2. 100 µl média z jamek sloupce 2 bylo odstraněno. Tímto způsobem byla připravena ředící řada, kdy se koncentrace testovaného antibiotika snižovala vždy o polovinu

(koncentrace 0,125 až 128 µg/ml). Jamky sloupce 1 zůstaly bez testovaného antibiotika (koncentrace 0 µg/ml) a sloužily jako kontrola.

4. Inokulum bakterií bylo připraveno resuspendováním jedné kolonie (narostlé na BHI agaru s přidaným selekčním antibiotikem; kultivace 16-18 hod, 37 °C) ve 3 ml fyziologického roztoku (0,9% NaCl) na denzitu McF = 0,5 – 1.
5. Do všech jamek destičky bylo přidáno 5 µl inokula příslušného kmene bakterií a směs byla promíchána. Výsledný objem v každé jamce tak byl 105 µl.
6. Připravená destička byla dokola potažena parafilmem (prevence vysychání a minimalizace možnosti kontaminace).
7. Destička byla inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 24 hod. Pomocí spektrofotometru Tecan Infinite 200Pro změřena intenzita fluorescence (Ex_{590nm}/Em_{650nm}) a hodnota A_{600nm}.

4.2.8 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

4.2.8.1 Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii

1. Inokulum bakterií bylo připraveno resuspendováním jedné kolonie (narostlé na BHI agaru s přidaným selekčním antibiotikem; kultivace 16-18 hod, 37 °C) ve 3 ml fyziologického roztoku (0,9% NaCl) na denzitu McF = 0,5.
- 2a. 150 µl inokula bylo zaočkováno do 3 ml BHI média s přidaným selekčním antibiotikem a testovaným antibiotikem (linkomycin o koncentracích 0; 0,125; 0,25; 1; 4; 16 µg/ml).
- 3a. Kultura byla kultivována na třepačce ve 37 °C a otáčkách 200 RPM do McF = 0,4; 1; 2; 4.
- 4a. Po dosažení požadované McF byly buňky stočeny na centrifuze (1 min, 8 000 RPM), byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 100 µl 1x PBS.
- 2b. 150 µl inokula bylo zaočkováno do 3 ml BHI média s přidaným selekčním antibiotikem.
- 3b. Kultura byla kultivována na třepačce při 37 °C a otáčkách 200 RPM až do McF = 0,1; 0,4; 1; 3,5; 9 (kultivace přes noc). Poté bylo ke kultuře přidáno testované antibiotikum (linkomycin o koncentracích 0; 0,25; 1; 4; 16; 32; 64 µg/ml).
- 4b. Po kultivaci 1 hod za stejných podmínek (37 °C, 200 RPM) byly buňky stočeny na centrifuze (1 min, 8 000 RPM), byl odstraněn supernatant a pelet byl resuspendován v 100 µl 1x PBS.
5. K suspenzi byly přidány 2 µl modré fluorescenční barvičky DAPI a vzorek se nechal 1 min stát při pokojové teplotě.
6. Následně byly buňky stočeny na centrifuze (1 min, 8 000 RPM), byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 100 µl 1x PBS.

7. Mikroskopovací podložní sklíčko bylo omyté 96% ethanolem a usušeno na vzduchu. Poté na něj bylo napipetováno 800 μ l horké 1% agarosy ve vodě (agarosa prodlužuje životnost buněk nanesených na sklíčko a fixuje je).
8. Po ztuhnutí agarosy bylo na agarosu naneseo a opatrně rozprostřeno 5 μ l buněčné suspenze.
9. Po zaschnutí bylo přiloženo krycí sklíčko.

4.2.8.2 Fluorescenční mikroskopie

Snímky byly pořízeny ve wide-field režimu pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX41 a kamery Olympus DP73. Pro pozorování byl využit imerzní objektiv se stonásobným zvětšením. Celkové zvětšení bylo 1000x. Signál DAPI byl detekován při vlnové délce 455 nm (po excitaci paprskem o 345 nm). Signál eqFP650 byl detekován při vlnové délce 694 nm (po excitaci paprskem o 575 nm).

5 VÝSLEDKY

5.1 EXPRESE REZISTENČNÍHO GENU *vga_{ALC}* JE REGULOVÁNA RIBOZOMEM ZPROSTŘEDKOVANOU ATENUACÍ

Regulace ribozomem zprostředkovanou atenuací byla potvrzena mj. pro linkomycinový rezistenční gen *vgaL* z *Listeria monocytogenes* (Dar et al., 2016). V této studii byla vyslovena hypotéza, že stejný typ regulace se vyskytuje i u pěti dalších genů, které jsou vzdálenými homology *vgaL* – *vgaA*, *vmlR* a třech genů pro putativní ABC transportéry. Podkladem pro toto tvrzení byla srovnávací analýza jejich upstream sekvencí, která ukázala, že všechny tyto geny nesou potenciální uORF o délce tří smysluplných kodonů, jehož sekvence i pozice je značně konzervovaná, přestože zbytek sekvence se výrazně liší (Dar et al., 2016). Experimentální důkaz potvrzující tuto hypotézu nicméně chybí. Jedním z cílů této diplomové práce tak bylo provést sadu experimentů ověřujících, že se u genů *vgaA* navržený mechanismus regulace uplatňuje. To obnášelo stanovení přibližné pozice promotoru, identifikaci uORF a otestování nutnosti vazby antibiotika do ribozomu pro spuštění exprese. Experimenty byly provedeny s variantou *vga_{ALC}*, která byla popsána naší výzkumnou skupinou (Novotná and Janata, 2006).

Pro sledování míry genové exprese byla zvolena strategie měření relativní fluorescence proteinového markeru. Pro tento účel byl vybrán protein eqFP650, se kterým se v naší laboratoři pracovalo již dříve. Jedná se o fluorescenční protein emitující v oblasti červeného světla (maximum při vlnové délce 650 nm), který rychle maturuje a má dobrou svítivost i fotostabilitu (Shcherbo et al., 2010). Důvodem pro výběr fluorescenčního proteinu jako reportéru exprese bylo jeho další použití v navazujících experimentech, kde sloužil pro vizualizaci rezistenčního proteinu uvnitř buňky. Další výhodou této strategie je její jednoduchost, neboť nakultivované buňky mohou být ihned podrobeny měření bez nutnosti dalších mezikroků.

V této sadě experimentů se pracovalo výhradně se zjednodušeným systémem neudílejícím rezistenci, kdy byl reportér exprese připojen k promotorové oblasti genu *vga_{ALC}* přes malou část ORF vlastního rezistenčního genu *vga_{ALC}* (translační fúze s ORF *vga_{ALC}* o 19 kodonech). Důvodem pro zachování této části genu byla minimalizace možnosti narušení sekundární struktury regulační upstream oblasti, neboť začátek ORF *vga_{ALC}* může být její součástí.

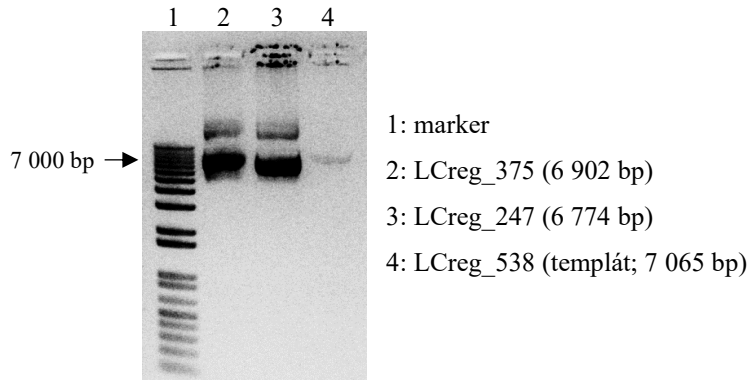
Odpověď regulátoru byla sledována po indukci linkomycinem o subinhibiční koncentraci. Linkomycin byl induktorem zvolen na základě Western blot analýzy, která ukázala, že linkomycin má schopnost indukovat expresi rezistenčních genů *vgaA* v klinických a komezálních izolátech *Staphylococcus haemolyticus* (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1).

5.1.1 PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ NESOUCÍCH FLUORESCENČNÍ REPORTÉR POD KONTROLOU MUTOVANÝCH REGULAČNÍCH OBLASTÍ *vga_{ALC}*

5.1.1.1 Příprava konstruktů LCreg_375 a LCreg_247 s různou délkou upstream oblasti genu *vga_{ALC}*

Konstrukty LCreg_375 a LCreg_247 jsou odvozeny od vektoru pRMC2 a nesou fluorescenční reportér eqFP650 napojený přes malou část ORF genu *vga_{ALC}* k regulační oblasti o délce 375, resp. 247 nukleotidů. Oba konstrukty byly připraveny klonovací technikou, která využívá PCR reakci pro tvorbu konstruktů s rozsáhlou delecí. V obou případech byl jako templát použit konstrukt LCreg_538 (připravený MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D.), který nese regulační oblast o délce 538 nukleotidů. Generované delece byly dlouhé 163, resp. 291 nukleotidů.

Prvním krokem v přípravě obou konstruktů byla PCR amplifikace celého konstruktů vyjma deletované oblasti vymezené 5' konci primerů. Složení a podmínky PCR reakce jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.1. Amplifikace byla poté ověřena pomocí DNA elektroforézy v agarosovém gelu (viz odd. 4.2.3.2) (Obr. 21).



Obr. 21: Výsledek PCR amplifikace konstruktů LCreg_375 a LCreg_247. PCR produkty byly rozděleny DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

PCR produkty byly ošetřeny pomocí enzymu DpnI (viz odd. 4.2.3.4), který specificky štěpí pouze metylovanou DNA, čímž dojde k degradaci templátové DNA. PCR produkty byly poté purifikovány pomocí kitu Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (viz odd. 4.2.3.3).

Protože PCR reakce generuje lineární DNA bez fosforylovaných 5' konců, bylo nutné produkty v dalším kroku fosforylovat pomocí T4 polynukleotid kinasy (viz odd. 4.2.3.5) a cirkularizovat pomocí T4 DNA ligasy (viz odd. 4.2.3.8). Konstrukty byly poté transformovány do buněk *Escherichia coli* XL1-Blue (viz odd. 4.2.2.2).

Následně byla provedena koloniová PCR ověřující přítomnost požadovaného konstruktů v narostlých transformantech. Složení a podmínky PCR reakce jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.2. Pro oba konstrukty, LCreg_375 i LCreg_247, byla použita stejná sada primerů, kdy forward primer nasedal svým 3' koncem do deletované oblasti. K amplifikaci tak docházelo pouze u transformant obsahujících nemutovaný templátový konstrukt, u transformant obsahujících požadovaný konstrukt k amplifikaci nedocházelo. Výsledek PCR reakce byl ověřen pomocí DNA elektroforézy v agarosovém gelu (viz odd. 4.2.3.2).

Z transformant obsahujících žádaný konstrukt byla vyizolována plasmidová DNA pomocí kitu Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (viz odd. 4.2.3.9). Správnost připravených konstruktů byla definitivně potvrzena sekvenací (viz odd. 4.2.3.10) z primeru R.P_VgaA_TRANSCR_ATTEN_56C (pro oba konstrukty).

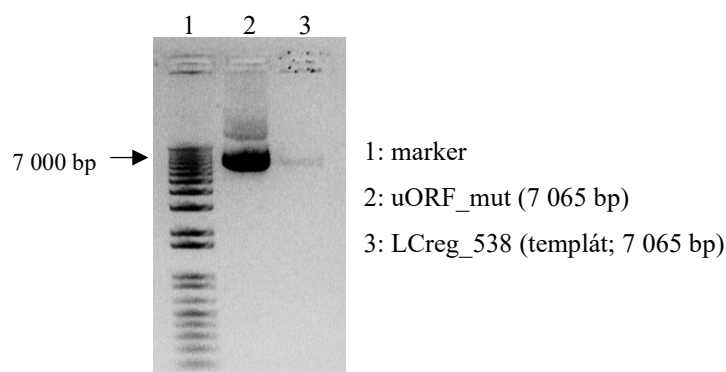
V případě LCreg_247 bylo na základě výsledků sekvenace zjištěno, že konstrukt obsahuje rozsáhlejší delecii, než pro jakou byly primery původně navrženy. Konstrukt měl nést delecii o délce 277 nukleotidů (regulační oblast měla mít délku 261 nukleotidů), nicméně konstrukt nese delecii o délce 291 nukleotidů (regulační oblast je dlouhá 247 nukleotidů). To mohlo být způsobeno poškozením PCR produktu ještě před jeho fosforylací a cirkularizací. Povaha experimentu, ve kterém měl být konstrukt využit, nicméně umožňovala použití i tohoto „chybného“ konstruktů, proto s ním bylo dále pracováno.

Konstrukty byly transformovány do *Staphylococcus aureus* RN4220 (viz odd. 4.2.2.6).

5.1.1.2 Příprava konstruktů uORF_mut se substitucí ve start kodonu uORF

Konstrukt uORF_mut je odvozen od vektoru pRMC2 a nese fluorescenční reportér eqFP650 napojený přes malou část ORF genu *vgaA_{LC}* k regulační oblasti o délce 538 nukleotidů obsahující mutaci T312A (mutace ve start kodonu předpokládaného uORF; číslo nukleotidu dáno vzdáleností od 5' konce regulační oblasti naklonované do vektoru). Konstrukt byl připraven místně specifickou mutagenezí, kdy byl jako templát využit konstrukt LCreg_538.

Prvním krokem v přípravě konstruktů byla PCR reakce s primery nasedajícími těsně vedle sebe, přičemž forward primer nesl (na svém 5' konci) požadovanou substituční mutaci. Složení a podmínky PCR reakce jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.3. Amplifikace byla poté ověřena pomocí DNA elektroforézy v agarosovém gelu (viz odd. 4.2.3.2) (Obr. 22).



Obr. 22: Výsledek PCR amplifikace konstruktů uORF_mut. PCR produkt byl rozdělen DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizován pomocí ethidium bromidu.

Další postup práce s PCR produkty se shoduje s postupem uvedeným v odd. 5.1.1.1. s výjimkou koloniové PCR, která v tomto případě nebyla provedena.

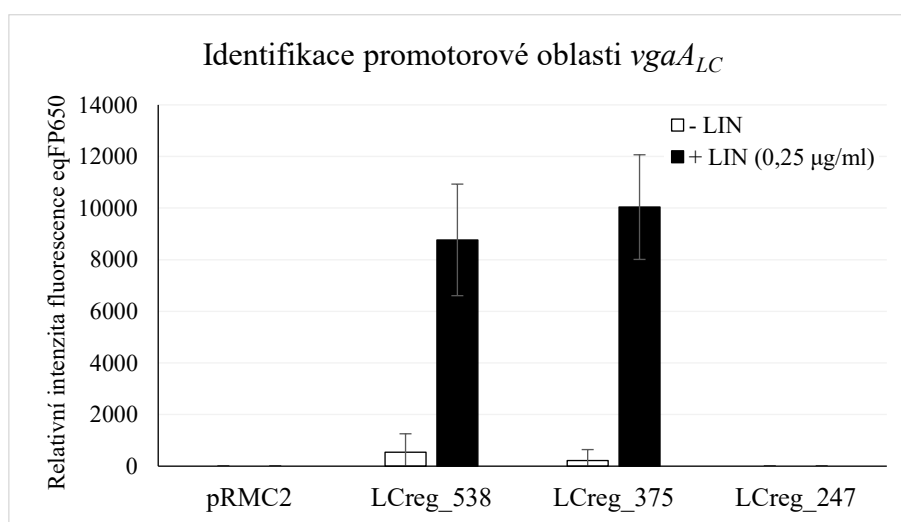
5.1.2 STANOVENÍ PŘÍBLIŽNÉ POZICE PROMOTORU

Prvním krokem v ověřování navrženého mechanismu regulace exprese rezistenčního genu *vga_{ALC}* bylo nalezení promotoru. Na základě znalosti pozice promotoru pak bylo možné odhadnout, zda je 5'UTR oblast mRNA dostatečně dlouhá pro potenciální regulační fungování. V rámci experimentu byla nejprve vytipována oblast výskytu promotoru a následně byla pomocí počítačového programu provedena *in silico* predikce jeho přesné lokalizace.

Pro účel identifikace promotoru byly připraveny konstrukty LCreG_538, LCreG_375 a LCreG_247 nesoucí 5'UTR oblast o délce 538, 375, resp. 247 nukleotidů, která kontroluje expresi fluorescenčního reportéru *eqFP650*. Konstrukt LCreG_538 byl připraven MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D., příprava zbylých dvou konstruktů byla součástí diplomové práce (viz odd. 5.1.1.1). Kontrolním konstruktem v experimentu byl prázdný vektor pRMC2. Úroveň genové exprese byla stanovena v laboratorním kmenu *Staphylococcus aureus* RN4220.

Postup přípravy vzorků pro fluorescenční měření je uveden v odd. 4.2.7.1. Genová exprese byla sledována v nepřítomnosti antibiotika a po indukci linkomycinem o subinhibiční koncentraci 0,25 µg/ml. Měření fluorescence bylo provedeno nezávisle dvakrát vždy v duplikátech. Výsledný graf ukazuje průměrné hodnoty z jednoho měření, druhé měření provedené na jiném přístroji výsledek potvrdilo (není ukázáno). Intenzita fluorescence naměřená pro kmen s prázdným vektorem byla považována za autofluorescenci buněk a kultivačního média a byla odečtena od intenzity fluorescence kmenu s konstruktem kódujícím *eqFP650*.

Vliv zkracování regulační oblasti na expresi genu *vga_{ALC}* je ukázán na Grafu 1. Získaná data potvrdila správné fungování reportérového systému s eqFP650, neboť signifikantní signál byl u kontrolního konstruktů LCreg_538 naměřen pouze v přítomnosti linkomycinu, což reflektuje inducibilní charakter *vga_{ALC}* exprese. Z naměřených hodnot je patrné, že exprese probíhá pouze v případě, kdy je přirozená regulační oblast genu dlouhá nejméně 375 nukleotidů a je přítomen linkomycin. Naopak délka 247 nukleotidů není pro spuštění exprese dostačující. Z uvedeného vyplývá, že promotor se s největší pravděpodobností nachází mezi 248. a 375. nukleotidem upstream od ORF *vga_{ALC}*. Informace zjištěné z tohoto experimentu byly dále využity při *in silico* predikci přesné pozice promotoru.



Graf 1: Identifikace promotorové oblasti *vga_{ALC}*. K expresi *vga_{ALC}* dochází pouze v přítomnosti linkomycinu u konstruktů s regulační oblastí o délce 538 a 375 nukleotidů. Oblast o délce 247 nukleotidů zřejmě neobsahuje promotor. V nepřítomnosti antibiotika k expresi genu nedochází. Tato pozorování jsou v souladu s předpokladem, že *vga_{ALC}* je regulován ribozomem zprostředkovanou atenuací. Pozitivní kontrola: konstrukt s regulační oblastí genu dlouhou 538 nukleotidů. Negativní kontrola: prázdný vektor. Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média se selekčním antibiotikem a s nebo bez linkomycinu, intenzita fluorescence byla měřena v 1x PBS.

Konkrétní pozice promotoru byla nalezena pomocí volně dostupného online nástroje pro predikci bakteriálních sigma 70 promotorů BPR0M. V oblasti mezi 248. a 375. nukleotidem upstream od ORF *vga_{ALC}* (délka 128 nukleotidů) byly nalezeny dva potenciální promotory (Tab. 23). Přesná pozice promotorů je ukázána na Obr. P-1 v Příloze 2. mRNA transkribovaná z těchto potenciálních promotorů nese 5' koncovou nepřekládanou oblast o délce 314, resp. 259 nukleotidů a je tak dostatečně dlouhá pro případné regulační fungování. Toto zjištění podporuje navržený mechanismus regulace genové exprese, ribozomem zprostředkovanou atenuací.

Tab. 23: *In silico* predikce promotoru v oblasti 248 až 375 nukleotidů upstream od otevřeného čtecího rámce *vgaALC*. Predikce pomocí online dostupného programu BPROM (<http://www.softberry.com>).

	-35 box (skóre)	-10 box (skóre)	LDF threshold	Vzdálenost startu transkripce od ORF <i>vgaALC</i>
P1	TTGCTA (53)	AAGTAATAT (54)	7,87	314
P2	TTGACA (66)	GTTTAAATT (56)	7,99	259

5.1.3 IDENTIFIKACE uORF

Cílem druhého experimentu bylo identifikovat regulační uORF a ukázat, že jeho přítomnost je nezbytným předpokladem pro správné fungování riboregulátoru. Tento experiment byl klíčový pro potvrzení regulace ribozomem zprostředkovanou atenuací.

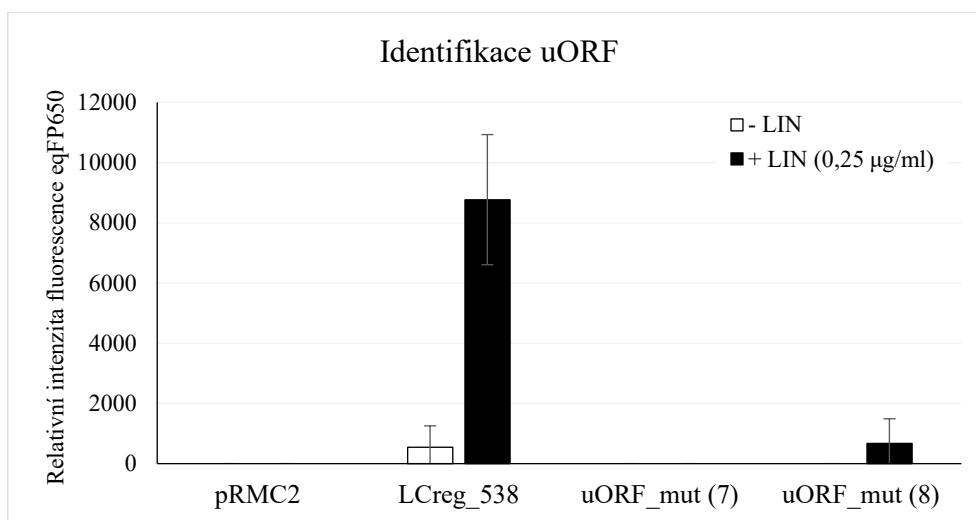
V prvním kroku byly vytipovány potenciální uORF. Při hledání vhodného ORF byla zohledňována zejména přítomnost dostatečně silného RBS, která byla ověřována pomocí nástroje De Novo DNA – RBS Calculator. Jako potenciální uORF byl zvolen otevřený čtecí rámec o sekvenci MIN, což je v souladu s výsledky sekvenční srovnávací analýzy provedené v rámci dříve zmiňované práce zabývající se mechanismem regulace *vgaL* (Dar et al., 2016).

Pro účel identifikace uORF (ověření, že čtecí rámec MIN funguje jako uORF) byl připraven konstrukt uORF_mut nesoucí bodovou substituční mutací T312A ve start kodonu. Kontrolou v experimentu byl prázdný vektor pRMC2 a nemutovaný konstrukt LCreg_538. Testovány byly dva kmeny nesoucí konstrukty uORF_mut vyizolované ze dvou různých *E. coli* transformant označených čísly 7 a 8. Úroveň genové exprese byla stanovena v laboratorním kmenu *Staphylococcus aureus* RN4220.

Postup přípravy vzorků pro fluorescenční měření je uveden v odd. 4.2.7.1. Genová exprese byla sledována v nepřítomnosti antibiotika a po indukci linkomycinem o koncentraci 0,25 µg/ml. Měření fluorescence bylo provedeno nezávisle dvakrát vždy v duplikátech. Výsledný graf ukazuje průměrné hodnoty z jednoho měření, přičemž druhé měření provedené na jiném přístroji výsledek potvrdilo (není ukázáno). Intenzita fluorescence naměřená pro kmen s prázdným vektorem byla považována za autofluorescenci buněk a kultivačního média a byla odečtena od intenzity fluorescence kmenu s konstruktem kódujícím eqFP650.

Vliv mutace vedoucí ke zrušení uORF kódující tripeptid MIN je ukázán na Grafu 2. Výsledky ukazují, že k expresi dochází výhradně v přítomnosti linkomycinu z konstruktu LCreg_538 nesoucího nemutovanou regulační oblast *vgaALC*. Ze získaných dat tak jednoznačně vyplývá, že absence čtecího rámce MIN vede k umlčení exprese genu *vgaALC*, tedy že přítomnost tohoto krátkého otevřeného čtecího rámce je pro expresi *vgaALC* nezbytná. Toto

pozorování tak podporuje hypotézu, že rezistenční gen *vgaALC* je regulován ribozomem zprostředkovanou atenuací.



Graf 2: Identifikace uORF. K expresi *vgaALC* dochází pouze v přítomnosti linkomycinu z konstruktů s intaktním uORF. Z konstruktů bez uORF k expresi genu nedochází nezávisle na přítomnosti antibiotika. Tato pozorování jsou v souladu s předpokladem, že *vgaALC* je regulován ribozomem zprostředkovanou atenuací. Pozitivní kontrola: konstrukt s přirozenou regulační oblastí. Negativní kontrola: prázdný vektor. Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média se selekčním antibiotikem a s nebo bez linkomycinu, intenzita fluorescence byla měřena v 1x PBS.

5.1.4 VAZBA ANTIBIOTIKA DO RIBOZOMU JAKO PREREKVIZITA SPUŠTĚNÍ GENOVÉ EXPRESE

Z modelu popisujícího princip ribozomem zprostředkované atenuace (viz odd. 3.3.1) je zřejmé, že pro spuštění genové exprese není dostačující samotná přítomnost antibiotika v prostředí, ale je nezbytné, aby se toto antibiotikum vážalo do ribozomu. Pouze v takovém případě se na uORF formuje SRC a exprese rezistenčního genu je spuštěna.

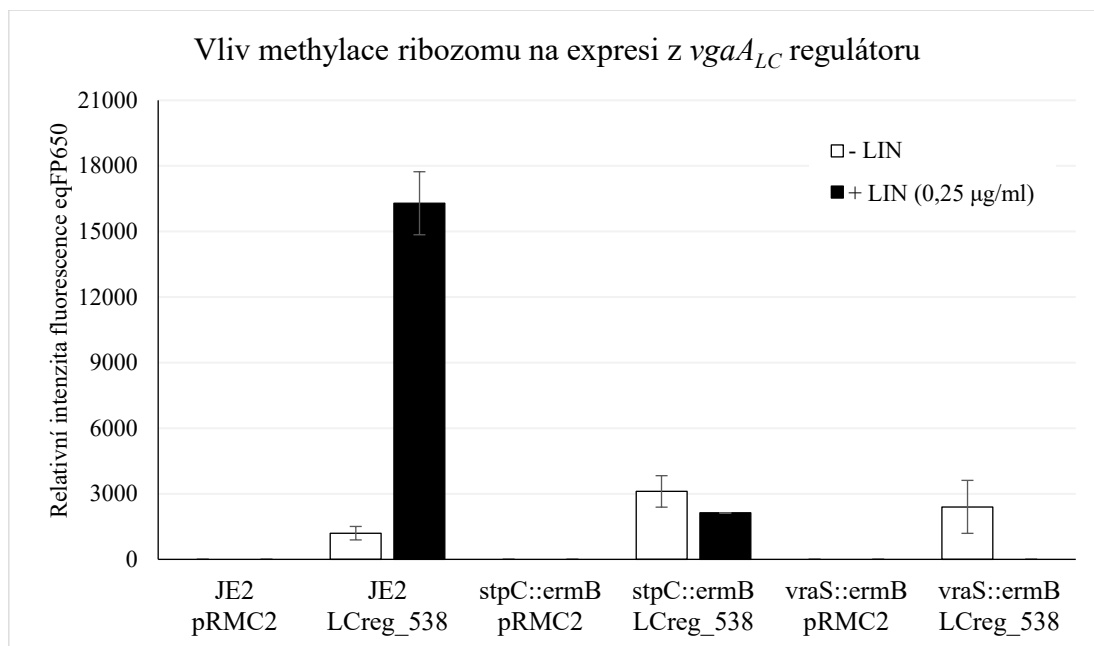
Přítomnost tohoto atributu v regulaci genu *vgaALC* je možné otestovat stanovením exprese v systému, kde se antibiotikum nemůže do ribozomu vázat. V takovém případě lze očekávat, že k expresi dojde nezávisle na přítomnosti antibiotika. Pro tento účel byly použity stafylokokové kmeny nesoucí konstitutivní variantu rezistenčního genu *ermB*, který kóduje *N*-methyltransferasu. Ta modifikuje A2058 domény V 23S rRNA (*Escherichia coli* číslování), čímž brání vazbě makrolidů, linkosamidů a streptograminů B do ribozomu (Weisblum, 1995b).

V experimentu testujícím vliv methylace ribozomu na expresi genu *vgaALC* byl použit konstrukt LCreg_538 a dále kontrolní prázdný vektor pRMC2. Oba tyto konstrukty byly nejprve transformovány do buněk *Escherichia coli* IM08B (viz odd. 4.2.2.2), z kterých byly vyizolovány (viz odd. 4.2.3.9). V tomto kroku plasmidy získaly metylaci typickou pro *Staphylococcus aureus* NCTC8325-4, čímž se zvýšila účinnost následné transformace

elektroporací do buněk klinických izolátů *Staphylococcus aureus* JE2 (viz odd. 4.2.2.6), které mají plně funkční restriční systém. V experimentu byly použity tři kmeny *Staphylococcus aureus* získané z Nebraské knihovny transpozonových mutant – JE2, NE823 (*vraS::ermB*) a NE1858 (*stpC::ermB*) (Fey et al., 2013). Kmen JE2 je rodičovský kmen, od kterého byly transpozonové mutanty NE823 a NE1858 odvozeny, a sloužil jako kontrolní kmen bez *ErmB* *N*-methyltransferasy. Kmen NE823 nese transpozón s konstitutivním *ermB*, který je vložen do genu *vraS* (senzorový protein dvoukomponentového systému PprA/PprB) a kmen NE1858 nese tentýž transpozón vložený do genu *stpC* (putativní ABC transportér). Z uvedeného je zřejmé, že mutantní kmeny nesou ve svém genomu gen *ermB* na úkor jiného genu, proto musela být provedena kontrola, že regulátor exprese *vga_{ALC}* není delecí daného genu ovlivněn. Z tohoto důvodu byly pro měření míry genové exprese použity mutanty s dvěma různými inzercemi genu *ermB*.

Postup přípravy vzorků pro fluorescenční měření je uveden v odd. 4.2.7.1. Genová exprese byla sledována v nepřítomnosti antibiotika a po indukci linkomycinem o koncentraci 0,25 µg/ml. Měření fluorescence bylo provedeno nezávisle dvakrát vždy v duplikátech. Výsledný graf ukazuje průměrné hodnoty z jednoho měření, přičemž druhé měření provedené na jiném přístroji výsledek potvrdilo. Intenzita fluorescence naměřená pro kmen s prázdným vektorem byla považována za autofluorescenci buněk a kultivačního média a byla odečtena od intenzity fluorescence příslušného kmenu s konstruktem kódujícím eqFP650.

Efekt methylace ribozomů na inducibilitu exprese *vga_{ALC}* je ukázán na Grafu 3. Naměřené hodnoty ukazují, že k efektivní expresi genu dochází pouze u kontrolního kmenu JE2 s citlivými (nemetylovanými) ribozomy, který byl kultivován v přítomnosti linkomycinu. Výrazně nižší je pak exprese u kmenů kultivovaných bez antibiotika a u kmenů, které mají ribozomy k linkomycinu rezistentní (metylované). Z výsledků tak vyplývá, že pro spuštění exprese rezistenčního genu *vga_{ALC}* je nutné, aby se buňka nacházela v prostředí s indukujícím antibiotikem, a zároveň, aby se toto antibiotikum vážalo do ribozomu. Toto zjištění je v souladu s navrženým mechanismem regulace, ribozomem zprostředkovanou atenuací.



Graf 3: Vliv methylace ribozomu na expresi *vga*_{LC}. K expresi *vga*_{LC} dochází pouze v přítomnosti linkomycinu v kmenu s nemethylovanými ribozomy. V kmenech s methylovanými ribozomy k expresi nedochází, přestože je indukující antibiotikum přítomno. Tato pozorování jsou v souladu s předpokladem, že *vga*_{LC} je regulován ribozomem zprostředkovanou atenuací. Pozitivní kontrola: kmen JE2 s nemethylovanými ribozomy. Negativní kontrola: prázdný vektor. Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média se selekčním antibiotikem a s nebo bez linkomycinu, intenzita fluorescence byla měřena v 1x PBS.

5.2 GEN *vga*_{LC} JE REGULOVÁN NA TRANSKRIPČNÍ ÚROVNI

Ribozomem zprostředkovaná atenuace genové exprese se může odehrávat na transkripční či translační úrovni. V případě transkripční atenuace je v neindukujících podmínkách tvořen nekompletní transkript, který nenese rezistenční gen. Naopak v případě translační atenuace jsou tvořeny transkripty o konstantní délce, které se liší pouze svým sekundárním uspořádáním.

Pro predikci sekundární struktury části mRNA, případně přímo pro predikci přítomnosti transkripčního atenuátoru, je k dispozici řada bioinformatických nástrojů. Pomocí nástroje PASIFIC – Prediction of alternative structures for identification of *Cis*-regulation (Millman et al., 2016) bylo predikováno, že *vga*_{LC} mRNA obsahuje transkripční atenuátor (platí pro oba transkripty syntetizované z putativních promotorů P1 a P2 – viz Tab. 23 v odd. 5.1.2). Nicméně predikce pomocí nástroje RNAfold ukázala, že se na dané mRNA formuje kromě terminátoru také vlásenka blokující ribozom-vazebné místo čtecího rámce *vga*_{LC} (opět platí pro oba transkripty syntetizované z putativních promotorů P1 a P2 – viz Tab. 23 v odd. 5.1.2). Sekundární struktury transkriptů predikované nástroji RNAfold a PASIFIC jsou ukázány v Příloze 2 této diplomové práce (Obr. P-1B,C). Cílem zde prezentovaného experimentu bylo ukázat, na jaké úrovni je gen *vga*_{LC} regulován.

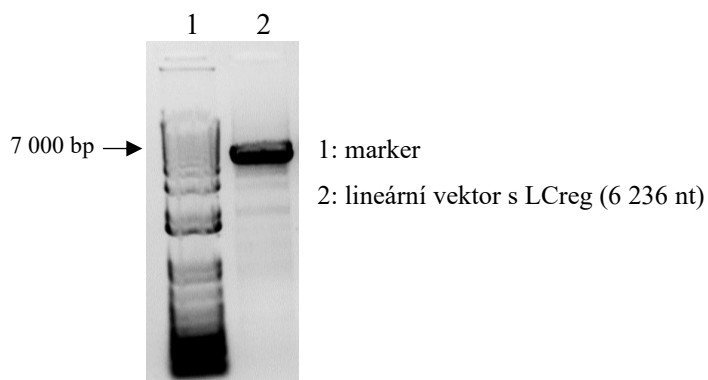
5.2.1 PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ S GENEM *vga_{ALC}* POD KONTROLOU PŘIROZENÉHO REGULÁTORU

5.2.1.1 Příprava konstruktu LCreg-Vga_{ALC}

Konstrukt LCreg-Vga_{ALC} je odvozen od vektoru pRMC2 a nese přirozený promotor a atenuátor genu *vga_{ALC}* a vlastní rezistenční gen *vga_{ALC}*. Konstrukt byl připraven bezešvým klonováním metodou SLiCE.

V prvním kroku byl pomocí PCR naamplifikován vektor, který se tímto linearizoval a insert, ke kterému byly prostřednictvím PCR primerů s 5' nepárujícími konci zavedeny přesahy homologní s konci lineárního vektoru (homologní oblast by měla být dlouhá 30 až 50 bp).

Templátem pro přípravu linearizovaného vektoru nesoucího regulační oblast rezistenčního genu byl konstrukt LCreg_538. Použity byly primery nasedající těsně před a těsně za reportérový gen, tak aby tento nebyl součástí lineárního vektoru. Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro přípravu vektoru jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.6. Výsledek amplifikace je ukázán na obrázku níže (Obr. 23). Insert nesoucí část upstream oblasti rezistenčního genu, vlastní rezistenční gen *vga_{ALC}* a část sekvence linearizovaného plasmidu byl připraven MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D. Templátem pro přípravu insertu byla genomová DNA z klinického izolátu *Staphylococcus haemolyticus* 7067_4_76.



Obr. 23: Výsledek PCR amplifikace (linearizace) vektoru LCreg-pRMC2. PCR produkt byl rozdělen DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizován pomocí ethidium bromidu.

Po amplifikaci byl vektor a insert přečištěn pomocí kitu Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (viz odd. 4.2.3.3). Linearizovaný vektor a insert byly spojeny pomocí homologní rekombinace v přítomnosti buněčného lyzátu připraveného dle protokolu pro SLiCE klonování (Zhang et al., 2012) (viz odd. 4.2.3.6), ve které došlo k rekombinaci mezi homologními úseky. V následujícím kroku byla reakční směs transformována do kompetentních buněk *Escherichia*

coli XL10-Gold (viz odd. 4.2.2.4). Poté byla z transformant vyizolována plasmidová DNA pomocí kitu Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (viz odd. 4.2.3.9). Správnost připraveného konstruktu byla potvrzena sekvenací (viz odd. 4.2.3.10) z primeru R.P_VgaA_TRANSCR_ATTEN_56C. Konstrukt byl elektroporován do *Staphylococcus aureus* RN4220 (viz odd. 4.2.2.6). Stanovení MIC (Tab. 24 v odd. 5.3.1.1.1) a posouzení růstu kmenů nesoucích konstrukt (Graf G v odd. 5.5.1) potvrdilo, že je konstrukt v pořádku.

5.2.2 TESTOVÁNÍ VLIVU ZVYŠUJÍCÍ SE KONCENTRACE LINKOMYCINU NA MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU *vgaALC*

Podobu transkriptů (jejich délku) v neindukujících a indukujících podmínkách lze stanovit mapováním pomocí RT-PCR. RNA je nejprve reverzní transkripcí přepsána do podoby cDNA a následně je provedena amplifikace žádaného úseku pomocí PCR. V experimentu byl využit kmen *Staphylococcus aureus* RN4220 nesoucí konstrukt LCreg-VgaALC, který kóduje rezistenční gen pod kontrolou své přirozené regulační oblasti. Buňky byly kultivovány v médiu bez indukujícího antibiotika a v přítomnosti linkomycinu o koncentraci 0,25; 2 a 4 µg/ml. Úroveň exprese *vgaALC* byla paralelně stanovována dvěma technikami – RT-PCR a Western blot analýzou.

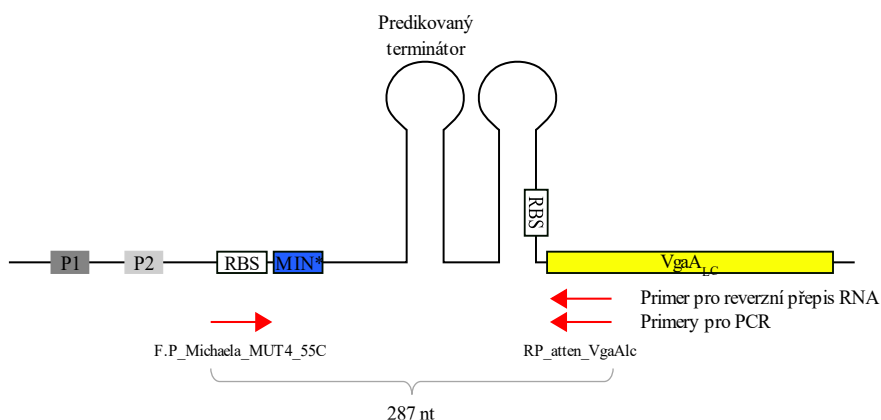
Z buněk byla vyizolována celková RNA (Obr. 24), která byla ošetřena DNasou I (odstranění kontaminující DNA) a přečištěna pomocí extrakce TRIzol (viz odd. 4.2.4.1-3). Poté byla změřena koncentrace a čistota RNA a v případě potřeby byla část vzorků naředěna tak, aby bylo množství RNA ve všech vzorcích stejné.



Obr. 24: Vyizolovaná celková RNA. RNA byla rozdělena RNA elektroforézou v 2% agarosovém gelu a vizualizována pomocí ethidium bromidu.

vgaALC mRNA obsažená v 500 ng vyizolované celkové RNA byla přepsána do podoby cDNA pomocí reverzní transkriptasy M-MuLV pocházející z viru myší leukémie (Moloney Murine Leukemia Virus). Poté byla provedena amplifikace úseku, jehož přítomnost značí

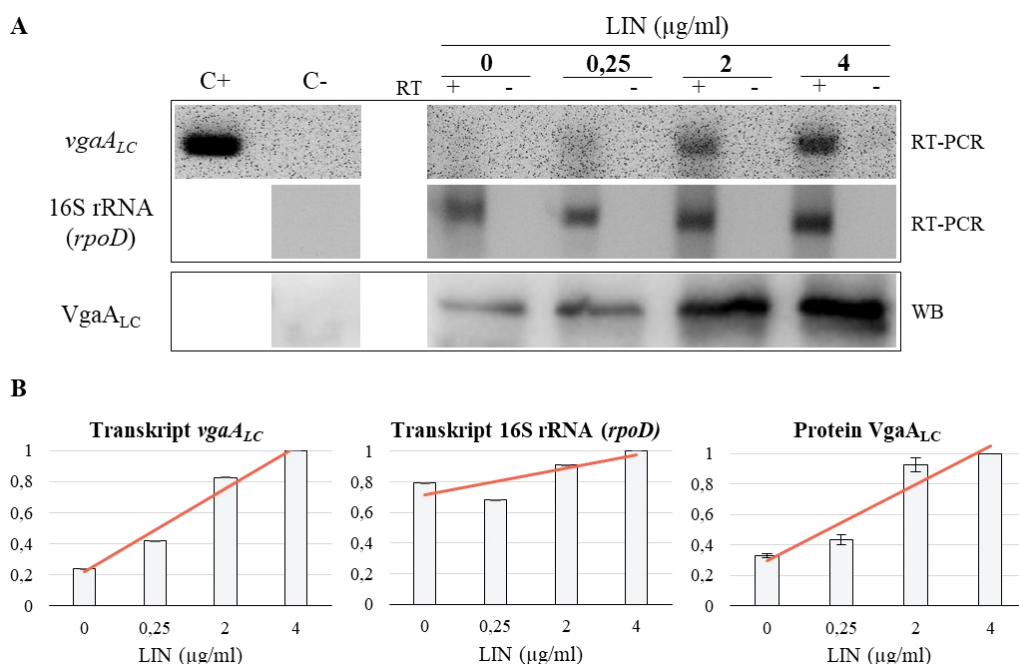
translační atenuaci a nepřítomnost transkripční atenuaci (schéma experimentu na Obr. 25). Postup RT-PCR je uveden v odd. 4.2.4.4. Kontrolou byly vzorky s destilovanou vodou a s plasmidovou DNA (konstrukt L_{Creg}-Vga_{ALC}) a dále paralela všech vzorků bez reverzní transkriptasy. Jako vnitřní kontrola byl použit housekeeping gen *rpoD*. Buňky ze stejné kultivace byly použity pro paralelní Western blot analýzu množství proteinu Vga_{ALC} (kultivace buněk viz první čtyři body protokolu v odd. 4.2.4.1, SDS-PAGE a Western blot viz odd. 4.2.5.2 a 4.2.5.3).



Obr. 25: Schéma RT-PCR experimentu. V experimentu byl použit konstrukt L_{Creg}-Vga_{ALC} nesoucí přirozenou upstream oblast genu *vgaALC* o délce 538 nukleotidů a kompletní strukturální ORF kódující Vga_{ALC}. Upstream oblast genu obsahuje dva predikované promotory P1 a P2, uORF kódující tripeptid MIN, predikovaný terminátor a predikovanou vlásenku maskující RBS genu *vgaALC*. Reverzní přepis RNA byl proveden z primeru RP_atten_VgaAlc, jehož 3' konec nasedal na druhý nukleotid ORF *vgaALC*. cDNA sloužila jako templát pro PCR amplifikaci úseku o délce 287 nukleotidů. Využity byly primery RP_atten_VgaAlc a F.P_Michaela_MUT4_55C (svým 3' koncem nasedá na sedmý nukleotid upstream od uORF).

Výsledky RT-PCR a Western blot analýz je ukázán na Obr. 26. Data ukazují, že množství transkriptu *vgaALC* nesoucího ORF rezistenčního proteinu výrazně narůstá s narůstající koncentrací indukujícího antibiotika přítomného v kultivačním médiu. Stejně tak stoupá i hladina proteinu. Naopak množství kontrolního transkriptu je ve všech podmínkách přibližně konstantní. Zde je však třeba poznamenat, že primery pro detekci množství transkriptu nesoucího housekeeping gen *rpoD* nasedly nespecificky a namísto reverzní transkripce a následné amplifikace genu *rpoD* došlo k reverzní transkripci a následné amplifikaci úseku 16S rRNA. Primery pro amplifikaci genu *rpoD* byly převzaty z publikace (Theis et al., 2007). Velikost amplifikovaného fragmentu s použitím těchto primerů však byla přibližně o 250 nukleotidů delší než očekávaný produkt specifické amplifikace části *rpoD*. Z tohoto důvodu byl produkt sekvenován a identifikován jako 16S rRNA. Nicméně transkript pro 16S rRNA může být rovněž použit jako vnitřní kontrola RT-PCR experimentu, neboť jeho množství není na subinhibiční koncentraci antibiotika závislé (použito např. ve studii (Yang et al., 2017)). Avšak z důvodu nespecifického nasedání primerů nelze spolehlivě určit relativní množství

kontrolního transkriptu v testovaných podmínkách, výsledky je tedy nutné brát pouze jako orientační. Experiment tak bude nezbytné zopakovat s využitím nového páru primerů pro gen *rpoD*, případně zvážit využití jiného housekeeping genu jako vnitřní kontroly. RT-PCR experiment a Western blot analýza byla provedena nezávisle dvakrát (z toho jednou s vnitřní kontrolou v RT-PCR experimentu) vždy se stejným výsledkem.



Obr. 26: Úroveň regulace genu *vga_{ALC}*. (A) RT-PCR analýza množství transkriptu *vga_{ALC}* a 16S rRNA (*rpoD*) v nepřítomnosti indukujícího antibiotika a v přítomnosti linkomycinu o koncentraci 0,25; 2 a 4 µg/ml a paralelně provedená Western blot analýza množství proteinu Vga_{ALC}. Pozitivní kontrola RT-PCR: plasmidová DNA (LCreg-Vga_{ALC}). Negativní kontrola RT-PCR: nepřidání templátu do reakce. Negativní kontrola WB: kmen *S. aureus* nesoucí prázdný vektor pRMC2 bez genu pro Vga_{ALC}. Pro všechny vzorky byla provedena paralela s reverzní transkriptasou (RT+) a bez reverzní transkriptasy (RT-) (B) Relativní množství transkriptu *vga_{ALC}* a 16S rRNA (*rpoD*) v testovaných podmínkách a relativní množství proteinu Vga_{ALC} v testovaných podmínkách.

5.3 ANTIBIOTICKÁ SPECIFICITA INDUKCE *vga_{ALC}* JE DÁNA ANTIBIOTICKOU SPECIFICITOU REZISTENČNÍHO PROTEINU

V rámci studie naší laboratoře (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) byla provedena Western blot analýza mapující produkci pěti VgaA variant (Vga_{ALC}, Vga_{AV}, Vga_{NEW}, Vga_{LIKE1} a Vga_{LIKE2}) u *Staphylococcus haemolyticus* v odpovědi na subinhibiční koncentrace linkomycinu, klindamycinu, pristinamycinu IIA a tiamulinu a dále erythromycinu a karbenicilinu (β-laktam). Výsledkem bylo zjištění, že ve většině případů jsou jednotlivé *vgaA* varianty exprimovány pouze v přítomnosti LS_{AP} antibiotik, ke kterým sami udílejí rezistenci. Nejvýraznější rozdíl byl v indukci klindamycinem – v přítomnosti tohoto antibiotika byl

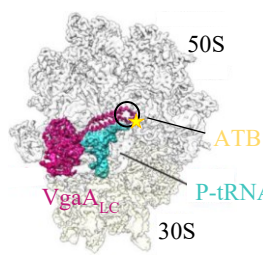
produkován pouze protein VgaA_{LC}, který je zároveň jedinou analyzovanou variantou udílející ke klindamycinu rezistenci. To naznačuje, že každá z testovaných *vgaA* variant má regulátor, jehož specifita odpovídá rezistenční specifitě VgaA varianty. Navazující experimenty pak ukázaly, že antibiotická specifita indukce genové exprese *vgaA* nezávisí na vlastnostech atenuátoru, ale je určována rezistenční aktivitou VgaA proteinu. Tento závěr byl učiněn na základě výsledků experimentu, ve kterém byla měřena indukce genové exprese zvyšujícími se koncentracemi LS_{AP} antibiotik linkomycinu, klindamycinu, pristinamycinu IIA a tiamulinu v kmenech *Staphylococcus aureus* RN4220. Tyto kmeny nesly současně dva vektory – konstrukt LCreg_538 kódující fluorescenční reportér pod kontrolou regulační oblasti *vgaA_{LC}*, a jednu z variant konstrukt kódujícího konstitutivně exprimovaný gen *vgaA* s mutacemi v oblasti ARD domény, které mění rezistenční fenotyp. Toto tzv. *in trans* uspořádání genových komponent nicméně nemusí zcela odpovídat přirozené situaci, kdy je exprese *vgaA* kontrolována atenuátorem v odpovědi na přítomnost antibiotika, tj. produkce rezistenčního proteinu je úměrná množství antibiotika v prostředí (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1).

Cílem třetí části diplomové práce bylo provedení analogického experimentu testujícího vliv rezistenční aktivity VgaA variant na indukci genové exprese v tzv. *in cis* uspořádání, kdy jsou geny pro jednotlivé VgaA varianty translačně fúzovány s fluorescenčním reportérem *eqFP650* a zároveň pod kontrolou atenuátoru.

Rezistenční specifita VgaA proteinů je dána několika aminokyselinami lokalizovanými zejména v doméně ARD. Bylo ukázáno, že klíčové jsou mj. aminokyseliny v pozicích 212, 218, 219, 220 a 226 (Crowe-McAuliffe et al., 2020; Lenart et al., 2015). Pro testování vlivu rezistenční aktivity VgaA proteinů byly vybrány VgaA varianty, které se od sebe významně liší úrovní udělované rezistence k LS_{AP} antibiotikům. Použita byla varianta LTGAG udílející oproti VgaA_{LC} zvýšenou úroveň rezistence ke všem testovaným antibiotikům, varianta SGAG udílející významnou úroveň rezistence pouze k pristinamycinu IIA a varianta SGTG udílející oproti VgaA_{LC} sníženou úroveň rezistence ke klindamycinu a pristinamycinu IIA a zvýšenou úroveň rezistence k tiamulinu. VgaA_{LC} obsahuje kombinaci SKVTS. Přehled pozic uvedených aminokyselin je ukázán na Obr. 27.

Mimo tyto varianty byla testována také tzv. dvojitá EQ mutanta (E105,410Q) proteinu VgaA_{LC} (VgaA_{LC} EQ1+2), která je deficientní v ATPasové aktivitě obou nukleotid-vazebných domén. VgaA EQ1+2 mutanta asociuje s ribozomem, váže ATP, ale není schopná provést jeho hydrolýzu. Protože energie generovaná rozkladem ATP je nezbytná pro správné fungování, ztrácí protein svou rezistenční aktivitu a zároveň blokuje peptidyltransferasové centrum

ribozomu (Murina et al., 2018). Přehled zavedených aminokyselinových záměn je ukázán na Obr. 27.



	NBD ₁		ARD doména				NBD ₂		MIC (µg/ml)			
	105	212	218	219	220	226	410	LIN	CLI	PIIA	TIA	
VgaA _{LC}	E	S	K	V	T	S	E	8-16	4	16	4-8	
VgaA _{LC} _EQ1+2	Q	S	K	V	T	S	Q	0,5	0,25	1	0,5	
VgaA _{LC} _LTGAG	E	L	T	G	A	G	E	64	8	64	32-64	
VgaA _{LC} _SGAG	E	S	K	G	A	G	E	2	0,25-0,5	16	1-2	
VgaA _{LC} _SGTG	E	S	K	G	T	G	E	8-16	1	8	16	

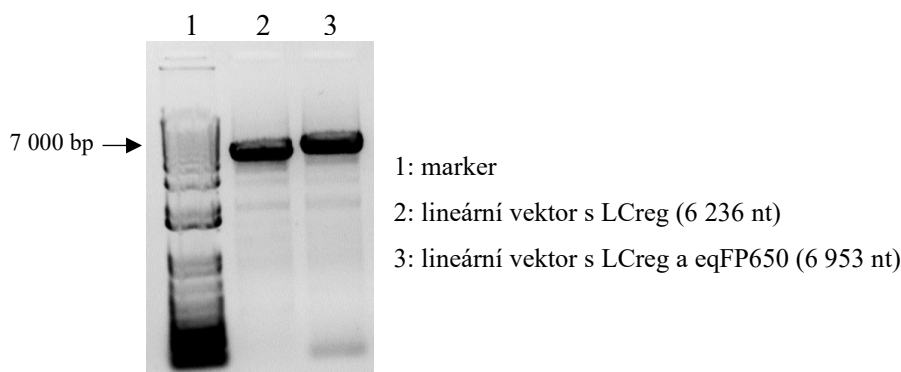
Obr. 27: Přehled aminokyselinových mutací vnesených do proteinu Vga_{ALC} a rezistenční fenotyp těchto VgaA variant. Model vlevo ukazuje cryo-EM strukturu ribozomu v komplexu s Vga_{ALC} proteinem v E-místě (Crowe-McAuliffe et al., 2020). Vazebné místo LSAP antibiotik je znázorněno hvězdičkou. Levá část tabulky (šedé pozadí) ukazuje aminokyselinové pozice, ve kterých se jednotlivé VgaA varianty liší. Mutace (červeně) jsou zodpovědné za posunutou antibiotickou specificitu, případně za nefunkčnost proteinu. Tmavé pozadí značí aminokyseliny NBD domén (na modelu vlevo zakroužkovaná oblast), které udávají antibiotickou specificitu rezistenčního proteinu. Světlé pozadí značí aminokyseliny NBD domén, které jsou zodpovědné za funkčnost proteinu. Pravá část tabulky ukazuje rezistenční fenotyp jednotlivých VgaA variant. Uvedené hodnoty MIC byly zjištěny pro rezistenční geny exprimované konstitutivně z arteficiálního promotoru (Lenart et al., 2015; Vimberg et al., 2020 - Příloha 1).

5.3.1 PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ S GENEM *vgaALC* A JEHO VARIANTAMI S ODLIŠNÝM REZISTENČNÍM FENOTYPEM POD KONTROLOU PŘIROZENÉHO REGULÁTORU

5.3.1.1 Příprava konstruktu LCreg-Vga_{ALC}-eqFP650

Konstrukt LCreg-Vga_{ALC}-eqFP650 je odvozen od vektoru pRMC2 a nese přirozený promotor a atenuátor genu *vgaALC*, vlastní rezistenční gen *vgaALC* a fluorescenční reportér *eqFP650* připojený k rezistenčnímu genu pomocí flexibilního linkeru kódujícího pentapeptid o aminokyselinové sekvenci PGGGS. Funkcí linkeru je minimalizace negativního vlivu fluorescenčního proteinu na činnost VgaA. Konstrukt byl připraven bezešvým klonováním metodou SLiCE.

Postup přípravy konstruktu je stejný jako v odd. 5.2.1.1 s následujícími odchylkami. Linearizovaný vektor byl připraven z konstruktu LCreg_538 s využitím reverse primeru nasedajícím na start genu *eqFP650* tak, aby fluorescenční reportér byl součástí PCR produktu. Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro přípravu vektoru jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.9. Výsledek amplifikace je ukázán na obrázku níže (Obr. 28). Insert byl připraven MSc. Vladimírem Vimbergem, Ph.D. z genomové DNA *Staphylococcus haemolyticus* 7067_4_76 s využitím reverse primeru, jehož 5' nepárující konec nesl část genu *efFP650*.



Obr. 28: Výsledek PCR amplifikace (linearizace) vektorů LCreg-pRMC2 a LCreg-pRMC2-eqFP650. PCR produkty byly rozděleny DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

5.3.1.1.1 Testování citlivosti kmenu *Staphylococcus aureus* RN4220 nesoucího fúzní gen *vga_{ALC}-eqFP650* k vybraným antibiotikům

Stanovení citlivosti bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* RN4220 nesoucích vektor s rezistenčním genem *vga_{ALC}* fúzovaným s fluorescenční reportérem a bez něj, a dále kontrolní vektor s fluorescenčním reportérem řízeným přirozenou regulační oblastí genu *vga_{ALC}* a prázdný vektor pRMC2 k linkomycinu, klindamycinu, pristinamycinu IIA a tiamulinu bylo provedeno mikrodiluční metodou ve standardním MH médiu (viz odd. 4.2.6.1). Měření bylo provedeno nezávisle třikrát vždy v duplikátech. Výsledná Tab. 24 ukazuje hodnoty nejvíce se opakující v jednotlivých měřeních.

Dle předpokladů je rezistenční gen *vga_{ALC}* exprimovaný z přirozeného promotoru schopen udílet rezistenci k LS_{AP} antibiotikům a navíc ve srovnání s konstitutivně exprimovanou variantou (Lenart et al., 2015) poskytuje úroveň rezistence přibližně 4x až 8x vyšší. Fúzní varianta proteinu s fluorescenčním reportérem pak vykazuje přibližně 2x až 4x nižší úroveň rezistence než přirozená varianta bez reportéru, což je nicméně dostatečné pro použití v navazujících experimentech.

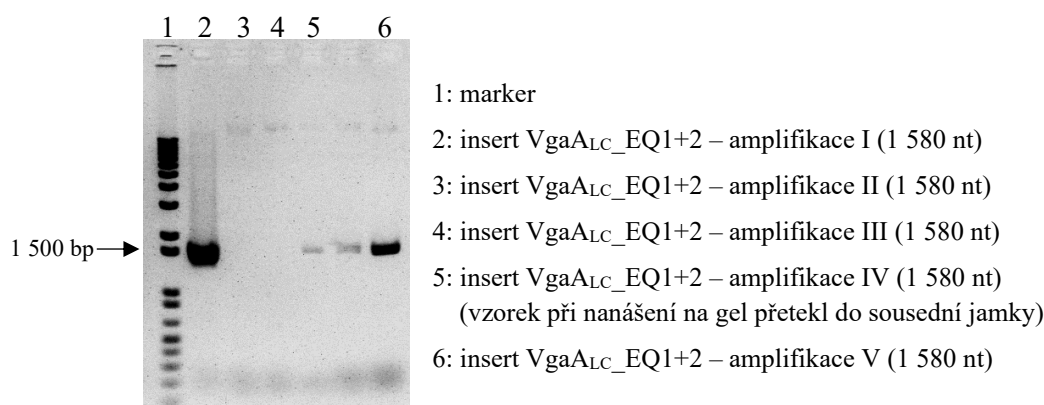
Tab. 24: Hodnoty MIC antibiotik blokujičích 50S ribozomální podjednotku pro testované kmeny. LIN – linkomycin (linkosamid), CLI – klindamycin (linkosamid), PIIA – pristinamycin IIA (streptogramin A), TIA – tiamulin (pleuromutilin), ERY – erythromycin (14-členný makrolid). * Testováno v rámci studie (Lenart et al., 2015).

<i>S. aureus</i> RN4220	MIC (µg/ml)				
	LIN (L)	CLI (L)	PIIA (S _A)	TIA (P)	ERY (M ₁₄)
pRMC2	1	≤0,125	2	1	0,25
LCreg_538	1	≤0,125	2	2	0,25
LCreg-Vga _{ALC}	64-128	16	64	64	0,25
LCreg-Vga _{ALC} -eqFP650	32	4-8	32	32	0,25
konstitutivní Vga _{ALC} *	8-16	4	16	4-8	0,25

5.3.1.2 Příprava konstruktů LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2 a LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2-eqFP650

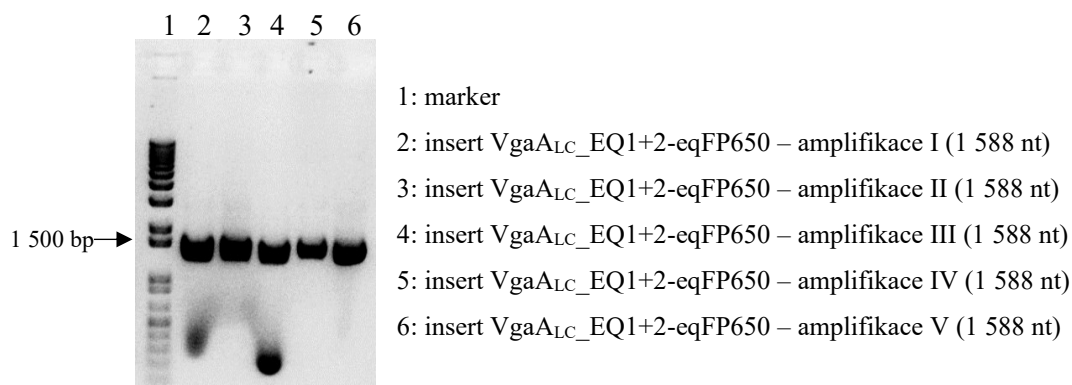
Konstrukty LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2 a LCreg-Vga_{ALC}_EQ1+2-eqFP650 jsou odvozeny od vektoru pRMC2 a nesou přirozený promotor a atenuátor genu *vga_{ALC}*, vlastní rezistenční gen *vga_{ALC}* obsahující dvojitou mutaci E105,410Q (zkráceně EQ1+2) a případně také fluorescenční reportér *eqFP650* připojený k rezistenčnímu genu pomocí flexibilního linkeru kódujícího pentapeptid o aminokyselinové sekvenci PGGGS. Oba konstrukty byly připraveny klonovací metodou SLiCE.

Postup přípravy konstruktů bez fluorescenčního reportéru je stejný jako v odd. 5.2.1.1 s následujícími odchytkami. Templátem pro přípravu insertu byl konstrukt pRB374__{ALC}E105,410Q (připravený Mgr. Jakubem Lenartem). Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro přípravu insertu jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.5. Výsledek amplifikace je ukázán na obrázku níže (Obr. 29).



Obr. 29: Výsledek PCR amplifikace insertu Vga_{ALC}_EQ1+2. PCR produkty byly rozděleny DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

Postup přípravy konstruktů s fluorescenčním reportérem je stejný jako v odd. 5.3.1.1 s následujícími odchytkami. Templátem pro přípravu insertu byl konstrukt Vga_{ALC}EQ1+2eqFP650 (050) (připravený Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou, Ph.D.). Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro přípravu vektoru jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.8. Výsledek amplifikace je ukázán na obrázku níže (Obr. 30).

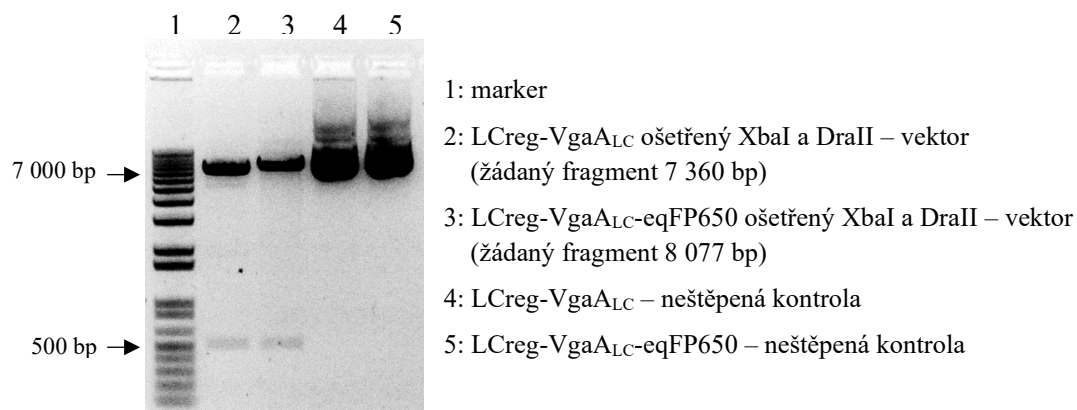


Obr. 30: Výsledek PCR amplifikace insertu *VgaA_{LC}_EQ1+2-eqFP650*. PCR produkty byly rozděleny DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

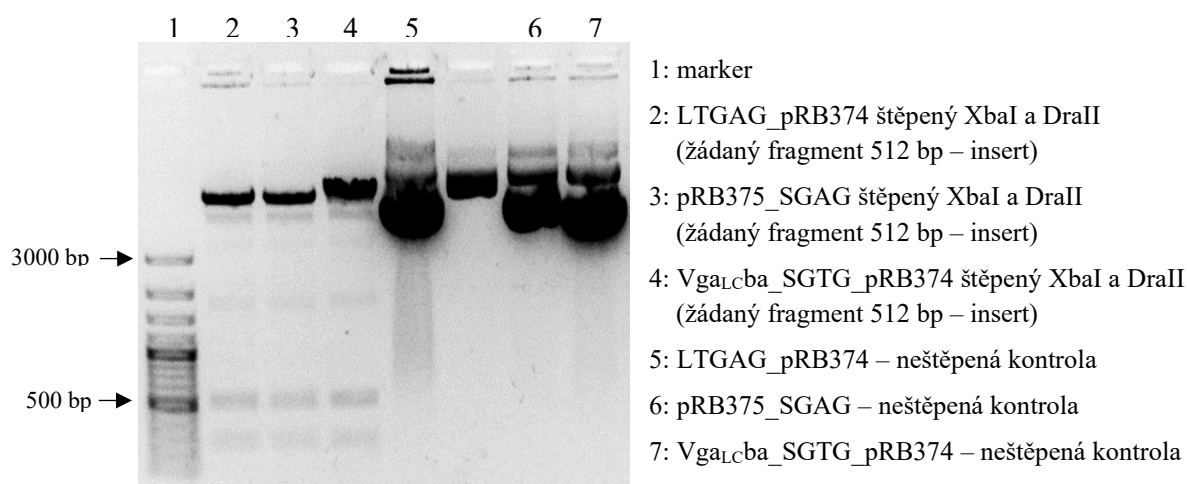
5.3.1.3 Příprava konstruktů *LCreg-VgaA_{LC}_LTGAG*, *LCreg-VgaA_{LC}_LTGAG-eqFP650*, *LCreg-VgaA_{LC}_SGAG*, *LCreg-VgaA_{LC}_SGAG-eqFP650*, *LCreg-VgaA_{LC}_SGTG* a *LCreg-VgaA_{LC}_SGTG-eqFP650*

Konstrukty *LCreg-VgaA_{LC}_LTGAG*, *LCreg-VgaA_{LC}_LTGAG-eqFP650*, *LCreg-VgaA_{LC}_SGAG*, *LCreg-VgaA_{LC}_SGAG-eqFP650*, *LCreg-VgaA_{LC}_SGTG* a *LCreg-VgaA_{LC}_SGTG-eqFP650* jsou odvozeny od vektoru pRMC2 a nesou přirozený promotor genu *vgaA_{LC}*, vlastní rezistenční gen *vgaA_{LC}* obsahující oproti přirozené variantě mutace Leu212-Thr218-Gly219-Ala220-Gly226, Ser212-Gly219-Ala220-Gly226, resp. Ser212-Gly219-Thr220-Gly226 (Obr. 27) a případně také fluorescenční reportér *eqFP650* připojený k rezistenčnímu genu pomocí flexibilního linkeru kódujícího pentapeptid o aminokyselinové sekvenci PGGGS. Všechny konstrukty byly připraveny restričním štěpením.

V prvním kroku byly konstrukty naštěpeny dvojicí restričních enzymů *Xba*I a *Dra*III. Donorovým konstruktem pro přípravu vektoru byl pro všechny mutantní varianty konstrukt *LCreg-VgaA_{LC}*, resp. *LCreg-VgaA_{LC}-eqFP650*. Donorovými konstrukty pro přípravu insertů byly plasmidy *LTGAG_pRB374*, *pRB374_SGAG* a *Vga_{LC}ba_SGTG_pRB374* (Lenart et al., 2015). Složení reakčních směsí a podmínky reakcí jsou uvedeny v odd. 4.2.3.7. Po ukončení reakce následovalo rozdělení fragmentů pomocí DNA elektroforézy (viz odd. 4.2.3.2) (Obr. 31 a 32) a izolace požadovaných fragmentů z gelu (viz odd. 4.2.3.3).



Obr. 31: Výsledek restrikčního štěpení konstruktů LCreG-Vga_{ALC} a LCreG-Vga_{ALC}-eqFP650. Fragменты byly rozdělěny DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.



Obr. 32: Výsledek restrikčního štěpení konstruktů LTGAG_pRB374, pRB375_SGAG a Vga_{ALCba}_SGTG_pRB374. Fragменты byly rozdělěny DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

V následujícím kroku byly příslušné fragmenty ligovány (viz odd. 4.2.3.8) a konstrukty byly transformovány do kompetentních buněk *Escherichia coli* XL1-Blue (viz odd. 4.2.2.2). Poté byla z transformant vyizolována plasmidová DNA pomocí kitu Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (viz odd. 4.2.3.9). Správnost připravených konstruktů byla potvrzena sekvenací (viz odd. 4.2.3.10) z primeru VgaV_Control_Rev(60C). Konstrukty byly elektroporovány do *Staphylococcus aureus* RN4220 (viz odd. 4.2.2.6).

5.3.2 STANOVENÍ PROFILU GENOVÉ EXPRESE VgaA VARIANT S ODLIŠNÝM REZISTENČNÍM FENOTYPEM V PŘÍTOMNOSTI VYBRANÝCH LSAP ANTIBIOTIK

Záměrem této části diplomové práce bylo provedení kontrolního experimentu, který ověří, že antibiotická specificita indukce genové exprese *vgaALC* je dána antibiotickou specificitou

samotného rezistenčního proteinu (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). V experimentu bylo testováno celkem pět variant proteinu VgaA (dvě varianty stejné jako v původním experimentu s *in trans* uspořádáním genových komponent a tři varianty zcela nové).

V rámci experimentu byl zjišťován profil exprese *vgaALC* pod kontrolou přirozeného regulátoru, jeho nefunkční EQ mutanty a tři variant označovaných LTGAG, SGAG a SGTG s posunutou antibiotickou specificitou. Využity byly varianty s a bez translačně fúzovaného fluorescenčního reportéru. Dále byl jako kontrola využit konstrukt LCreg_538 nesoucí pouze fluorescenční reportér exprimovaný z regulátoru *vgaALC* a kontrolní prázdný vektor pRMC2. Genová exprese byla sledována v laboratorním kmenu *Staphylococcus aureus* RN4220.

Postup přípravy vzorků pro fluorescenční měření je uveden v odd. 4.2.7.2. Genová exprese byla měřena v přítomnosti koncentrační řady antibiotik linkomycinu, klindamycinu, pristinamycinu IIA a tiamulinu v rozmezí 0; 0,125 – 128 µg/ml. Byly provedeny celkem dva nezávislé experimenty, přičemž měření fluorescenčního signálu probíhalo vždy v technických duplikátech. Výsledný graf ukazuje průměrné hodnoty z jednoho měření, při druhém měření bylo dosaženo obdobného výsledku. Získaná data byla zpracována následujícím způsobem: 1) od naměřených intenzit fluorescence jednotlivých vzorků byla odečtena hodnota odpovídající autofluorescenci kultivačního média bez buněk; 2) takto upravené hodnoty byly normalizovány k počtu buněk (A_{600nm}); 3) od takto upravených hodnot intenzity fluorescence vzorků kódujících fluorescenční proteiny byly odečteny hodnoty intenzity fluorescence vzorků bez fluorescenčního proteinu (v tomto kroku byly výsledné hodnoty poníženy o autofluorescenci buněk). Pro každé měření, tedy pro každou 96 jamkovou destičku obsahující celkem čtyři kmeny (pRMC2, LCreg_538, VgaA s a bez eqFP650) a jeden typ indukujícího antibiotika byl nastaven optimální gain (zisk) fotonového detektoru. Gain udává citlivost detektoru k dopadajícím fotonům. Pokud je nastavena stejná hodnota gainu pro všechna měření, je možné tato měření mezi sebou srovnat co do výše naměřeného signálu, nicméně je zde riziko, že zvolený gain nebude ideální pro všechna měření a bude docházet ke ztrátě informace (je-li gain nastaven na příliš nízkou hodnotu, není možné detekovat velmi slabý signál, naopak je-li gain nastaven na příliš vysokou hodnotu, není možné detekovat velmi silný signál). Pokud je nastaven optimální gain, přístroj automaticky zvolí nejlepší hodnotu gainu pro dané měření. Výhodou tohoto nastavení je, že nedochází ke ztrátě informace a přístroj je schopen detekovat velmi silné, resp. velmi slabé signály. Nevýhodou naopak je, že není možné srovnat absolutní hodnoty intenzity fluorescence z různých měření. Protože cílem tohoto experimentu bylo ukázat, že antibiotická specificita indukce je závislá na antibiotické specificitě rezistenčního proteinu, bylo vhodnější použít pro každé měření optimální gain. Hodnota softwarem

nastaveného gainu se pohybovala v rozmezí 225 až 255. Pokud by cílem experimentu bylo srovnat intenzitu signálu (tj. úroveň genové exprese) pro jednotlivé varianty proteinu a jednotlivá antibiotika, bylo by nutné použít stejnou hodnotu gainu pro všechna měření.

Profil exprese jednotlivých variant *vgaA* po indukci několika typy antibiotik, ke kterým nemutovaný protein Vga_{ALC} udílí rezistenci, je ukázán na Obr 33. MIC antibiotika pro danou variantu rezistenčního proteinu fúzovanou s fluorescenčním reportérem je uvedena v levém horním rohu každého grafu, v závorce je pak uvedena hodnota MIC pro stejnou variantu bez fluorescenčního reportéru – lze si povšimnout, že tato hodnota je ve většině případů výrazně vyšší než u stejného proteinu produkovaného z arteficiálního konstitutivního promotoru, jak je uvedeno výše v přehledové tabulce na Obr. 27. V případě proteinu Vga_{ALC} (pod kontrolou přirozeného regulátoru), pro který byly stanoveny hodnoty MIC také ve standardním MH médiu (viz odd. 5.3.1.1.1), se zde zjištěné hodnoty mírně liší. Důvodem je pravděpodobně kultivace v odlišném médiu. Zde bylo použito BHI, které je optimální pro kultivaci stafylokoků.

Genová exprese z přirozené regulační oblasti *vga_{ALC}* je výrazně silnější v přítomnosti funkčního rezistenčního proteinu než v jeho nepřítomnosti (konstrukt L_{Creg_538}, v obrázku označeno jako „bez VgaA“). Pozitivní zpětnovazebná regulace rezistenčním proteinem při vyšších koncentracích antibiotika je v souladu s dřívějším pozorováním (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). V tomto případě je možné srovnání absolutních hodnot fluorescence, neboť fluorescenční měření pro kmen s a bez rezistenčního proteinu bylo prováděno vždy zároveň v rámci jedné mikrotitrační destičky, a to u všech testovaných VgaA variant.

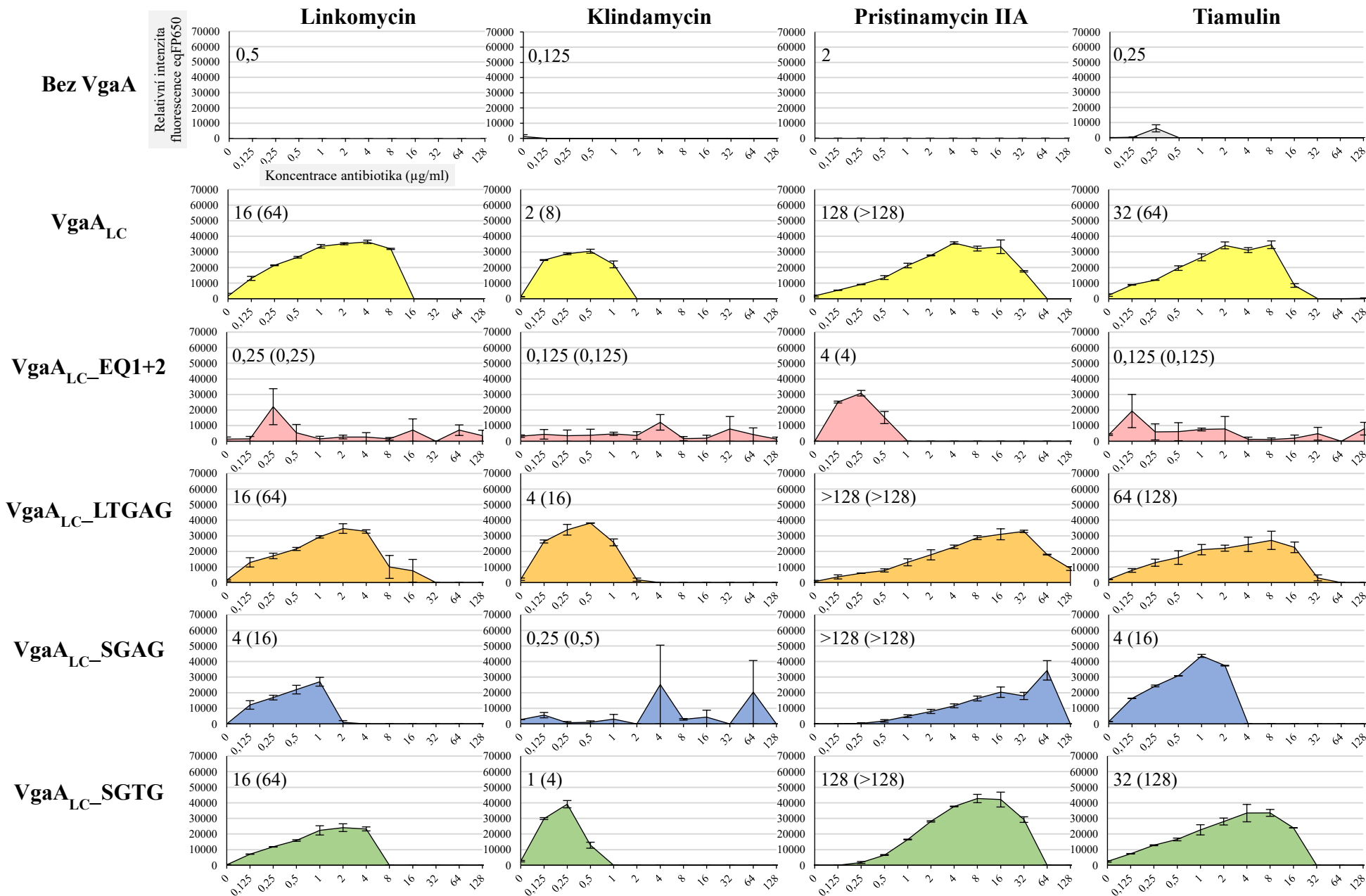
Buňky nesoucí konstrukt L_{Creg_538}, tedy bez genu *vga_{ALC}*, nevykazují v přítomnosti nízkých koncentrací antibiotik téměř žádný signál, což je v rozporu s výsledky prezentovanými v rámci podkapitoly 5.1. Při nízkých koncentracích antibiotika by se měla projevit negativní zpětnovazebná regulace rezistenčním proteinem a genová exprese by měla být vyšší v nepřítomnosti rezistenčního proteinu než v jeho přítomnosti. Tento trend však patrný není, a to ani u setů měření, ve kterých byla nastavena vysoká citlivost detektoru. Primárním důvodem jsou zřejmě odlišné podmínky kultivace buněk a odlišné prostředí, ve kterém bylo fluorescenční měření prováděno. Zatímco v experimentech prezentovaných v odd. 5.1 byly buňky kultivovány na třepačce ve 3 ml média a fluorescence buněk byla měřena v 1x PBS, zde byly buňky kultivovány v termostatu ve 100 µl média a fluorescence buněk byla měřena přímo v kultivačním médiu. První způsob přípravy vzorků poskytuje ve výsledku silnější signál fluorescence, nicméně je výrazně náročnější na provedení. V tomto případě bylo (časově i materiálně) efektivnější využít druhý způsob přípravy vzorků, neboť bylo analyzováno velké množství vzorků, které pro zamýšlené srovnání poskytují dostatečně silný signál.

Profil exprese *vgaA* variant v odpovědi na různá antibiotika koreluje s jejich antibiotickou specificitou. Toto zjištění je v souladu s publikovanými výsledky experimentu s *in trans* uspořádaným systémem (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). Při koncentracích antibiotika odpovídajících hodnotě MIC, případně poloviční (MIC_{50}) daného kmenu a vyšších exprese rezistenčního genu neprobíhá. Relativně nejvyšší úroveň genové exprese je dosaženo ve většině případů při MIC_{25} . Přibližně do této koncentrace antibiotika je zároveň povětšinou patrná přímá úměra mezi koncentrací antibiotika a výší genové exprese. Při vyšších koncentracích antibiotika úroveň genové exprese klesá, a nakonec se zastavuje zcela (bakterie přestává růst). V případě VgaA variant udílejících pouze nízkou úroveň rezistence by bylo nutné pro zjištění lineární závislosti testovat další nižší koncentrace antibiotika.

V případě linkomycinové, klindamycinové a tiamulinové indukce v přítomnosti Vga_{LC}_EQ1+2 a klindamycinové indukce v přítomnosti Vga_{LC}_SGAG k expresi nedochází, neboť tyto varianty neudílejí k uvedeným antibiotikům rezistenci. Naměřený slabý signál s velkými směrodatnými odchylkami lze považovat za artefakt vzniklý v průběhu měření. Pro uvedená čtyři měření přístroj automaticky nastavil gain 255 (nejvyšší gain, který byl v celém experimentu použit) tak, aby zachytil i velmi slabý signál. Tomu odpovídá i skutečnost, že fluorescenční signál (slabý a s velkými směrodatnými odchylkami) byl v těchto případech zaznamenán také u kontrolního kmenu nesoucího konstrukt LCre_g_538 bez rezistenčního proteinu. Lze tedy konstatovat, že pozorovaný signál neodpovídá signifikantní genové expresi.

Naopak velmi zajímavá je situace v případě genu *vga_{LC}_EQ1+2* exprimovaného v přítomnosti pristinamycinu IIA. Mutantní protein překvapivě udílí k tomuto antibiotiku nízkou rezistenci (MIC 4 μ g/ml), čemuž odpovídá i profil jeho genové exprese. Tento jev byl pozorován i při nezávislém druhém měření a zároveň také v rámci studie (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1), proto je nepravděpodobné, že by se jednalo o kontaminaci či chybu v měření. Podstata tohoto fenoménu není jasná. Ze všech testovaných antibiotik udílí WT varianta proteinu i všechny ostatní varianty VgaA nejvyšší úroveň rezistence právě k pristinamycinu IIA, což by mohlo naznačovat, že toto antibiotikum má ze všech testovaných antibiotik nejnižší vazebnou afinitu k ribozomu. Nabízí se tak vysvětlení, že si EQ mutant zachovala zlomek své původní aktivity a tato aktivita je pak pozorovatelná v přítomnosti antibiotika, vůči kterému byl původní nemutovaný protein nejúčinnější. Uvedenou hypotézu by bylo možné otestovat pomocí EQ mutanty nejúčinnější VgaA varianty LTGAG.

Data získaná v tomto experimentu jsou v souladu s modelem popisujícím regulaci genů skupiny *vgaA*, který byl navržen v publikaci (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). Data zároveň poskytla přesnější popis chování studovaného atenuátoru.



Obr 33: Profil exprese variant genu *vgaALC* po indukci linkomycinem, klindamycinem, pristinamycinem IIA a tiamulinem o dvanácti různých koncentracích. Osa x grafu znázorňuje koncentraci antibiotika použitého pro indukci genové exprese, osa y znázorňuje relativní intenzitu fluorescence eqFP650. Hodnoty v levém horním rohu každého grafu představují MIC kmenu kódujícího fúzní rezistenční protein, v závorce je uvedena hodnota MIC kmenu nesoucího tentýž rezistenční protein bez fluorescenčního reportéru. Pro každé měření (jeden graf představuje jedno měření mimo grafů „bez VgaA“ (u těch byl profil exprese zjišťován v rámci každého měření jako kontrola)) byl nastaven optimální gain, proto je možné srovnávat mezi jednotlivými vzorky pouze relativní intenzitu signálu, nikoli jeho absolutní. Úroveň genové exprese z přirozeného regulátoru *vgaALC* je výrazně vyšší, je-li přítomen funkční rezistenční protein. Profil genové exprese jednotlivých variant proteinu VgaALC odpovídá antibiotické specifitě daného proteinu. Kultivace probíhala ve 100 μ l BHI média s přidáním selekčním a testovaným antibiotikem, hodnota A_{600nm} a intenzita fluorescence byla měřena přímo v kultivačním médiu.

5.4 ANTIBIOTICKÁ SPECIFICITA ATENUÁTORU *vgaALC* JE V NEPŘÍTOMNOSTI REZISTENČNÍHO PROTEINU ZÁVISLÁ NA CHARAKTERU uORF

Antibiotická specifita řady atenuátorů řídících expresi genů udílejících rezistenci k antibiotikům je dána délkou a sekvencí uORF (viz přehled literatury, odd. 3.3.1) (Arenz et al., 2014b, 2014a; Lovett, 1990, 1996; Marks et al., 2016; Mayford and Weisblum, 1990; Sothiselvam et al., 2014; Stokes and Hall, 1991; Wang et al., 2004, 2005). V případě atenuátoru *vgaA* je však antibiotická specifita indukce dána spíše rezistenční aktivitou samotného proteinu (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) (a odd. 5.3 této diplomové práce). Nicméně i v tomto případě je pro indukci zásadní uORF, během jehož translace velmi pravděpodobně dochází v přítomnosti antibiotika ke vzniku SRC. Otázkou tak je, jak velkou měrou se na procesu regulace *vgaA* genů charakter vedoucího peptidu kódovaného uORF skutečně podílí, a zda je možné změnou jeho sekvence změnit antibiotickou specifitu indukce (např. z indukce LS_{AP} antibiotiky na makrolidovou či tetracyklinovou indukci). Mechanismus LS_{AP} indukce nebyl doposud podrobně zkoumán, proto je studium tohoto systému zajímavé i z tohoto hlediska.

uORF genů *vgaA* kóduje vedoucí peptid o sekvenci MIN (viz odd. 5.1.3) a odpovídá na přítomnost linkosamidů, streptograminů A a pleuromutilinů (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). Jak bylo uvedeno v přehledu literatury, i jiné rezistenční geny využívají takto krátké uORF. uORF genu *vgaL* kóduje vedoucí peptid o sekvenci MKF a odpovídá na přítomnost linkomycinu (v přítomnosti rezistenčního proteinu VgaL) (Dar et al., 2016). uORF genu *tetQ* kóduje vedoucí peptid o sekvenci MRQ a odpovídá na přítomnost tetracyklinu, linkomycinu a erythromycinu (v nepřítomnosti rezistenčního proteinu TetQ) (Wang et al., 2004, 2005). A zkrácená varianta uORF genu *ermD* kóduje vedoucí peptid o sekvenci MRLR a odpovídá na přítomnost erythromycinu a dalších makrolidů a ketolidů (Sothiselvam et al., 2014, 2016).

Pro posouzení vlivu charakteru uORF na antibiotickou specifitu atenuátoru *vgaALC* byl použit reportérový konstrukt L_Creg_538 (zde označený jako uORF_MIN) a dále pět variant

tohoto konstruktů s pozměněnou délkou a sekvencí uORF. Použita byla varianta uORF kódující nonapeptid o sekvenci MINEPYFQK, dvě varianty uORF kódující tripeptid o nevýznačné sekvenci MGG a MRL a dvě varianty uORF z jiných rezistenčních genů kódující tripeptid MKF a MRQ. Míra genové exprese byla stanovována na základě intenzity fluorescence reportéru eqFP650. Odpověď regulátoru byla sledována po indukci několika typy antibiotik.

5.4.1 PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ NESOUČÍCH FLUORESCENČNÍ REPORTÉR POD KONTROLOU REGULAČNÍCH OBLASTÍ GENU *vgaALC* S RŮZNÝMI VARIANTAMI uORF

5.4.1.1 Příprava konstruktů uORF_9AA, uORF_MGG, uORF_MKF, uORF_MRQ, uORF_MRL a uORF_MRLR

Konstrukty uORF_9AA, uORF_MGG, uORF_MKF, uORF_MRQ, uORF_MRL a uORF_MRLR jsou odvozeny od konstruktů L_Creg_538. Prodloužení původního WT uORF bylo dosaženo mutací ve stop kodonu (nahrazen za kodon pro glutamát). Zároveň byla zavedena mutace do kodonu následujícího za stop kodonem, který původně kódoval serin. Serin indukuje vznik SRC v přítomnosti chloramfenikolu (Choi et al., 2020; Marks et al., 2016). Toto antibiotikum je ale selekčním antibiotikem pro udržení použitého vektoru v buňce a jeho přítomnost by tak mohla vést k nespecifickému formování SRC na uORF a tedy k nespecifické indukci genové exprese. Kodon pro serin byl zaměněn za kodon pro prolin. Výsledný konstrukt nese uORF kódující vedoucí peptid o sekvenci MINEPYFQK (konstrukt uORF_9AA). Konstrukty byly připraveny místně specifickou mutagenezí dle protokolu QuikChange[®] Site Directed Mutagenesis Kit (zavedené mutace jsou uvedeny v Tab. 25). Intaktnost sekundární struktury atenuátorů s mutovanými uORF byla ověřena pomocí softwarů RNAfold a PASIFIC.

Tab. 25: Přehled bodových mutací zavedených do uORF *vgaALC*.

Konstrukt	Mutace (číslo nukleotidu dáno vzdáleností od 5' konce regulační oblasti naklonované do vektoru)	Aminokyselinová sekvence uORF
uORF_MIN (= L _C reg_538)	-	MIN*SYFQK*
uORF_mut	T312A	KIN*SYFQK*
uORF_9AA	T320G, T323C, C325A	MINEPYFQK*
uORF_MGG	A314G, T315G, A317G, A318G, C319T	MGG*SYFQK*
uORF_MKF	T315A, T316A, A317T, A318T, C319T	MKF*SYFQK*
uORF_MRQ	A314C, T315G, A317C, C319A	MRQ*SYFQK*
uORF_MRL	A314C, T315G, A317T, A318T, C319A	MRL*SYFQK*
uORF_MRLR	A314C, T315G, A317T, A318T, C319A, T320A, A321G, C324A, C325A	MRLR*YFQK*

Prvním krokem v přípravě všech konstruktů byla PCR reakce s primery navrženými programem QuikChange[®] pro designování primerů. Takto navržené primery se přesně překrývají a žádané mutace nesou přibližně ve svém středu. Substituce byly navrženy tak, aby odpovídaly kodonovým preferencím *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325 (parentální kmen kmenu RN4220). Pro tento účel byla využita Codon Usage Database spravovaná výzkumným institutem Kazusa (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>). Složení a podmínky PCR reakce jsou uvedeny v odd. 4.2.3.1.10.

PCR produkty byly ošetřeny pomocí enzymu DpnI (viz odd. 4.2.3.4), který odstranil nemutovanou templátovou DNA. Směs byla následně přímo transformována do kompetentních buněk *Escherichia coli* XL10-Gold (viz odd. 4.2.2.2). Poté byla z transformant vyizolována plasmidová DNA pomocí kitu Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (viz odd. 4.2.3.9). Správnost připravených konstruktů byla potvrzena sekvenací (viz odd. 4.2.3.10) z primeru R.P_VgaA_TRANSCR_ATTEN_56C. Konstrukty byly následně elektroporovány do *Staphylococcus aureus* RN4220 (viz odd. 4.2.2.6). Konstrukt uORF_MRLR se ani po opakovaných pokusech nepodařilo do *Staphylococcus aureus* RN4220 natransformovat.

5.4.2 TESTOVÁNÍ VLIVU DÉLKY A SEKVENCE uORF NA INDUKČNÍ PROFIL ATENUÁTORU *vgaALC*

Záměrem této části diplomové práce bylo prostudovat roli uORF atenuátoru *vgaALC* v rozpoznávání antibiotik. V experimentu byl využit WT uORF kódující tripeptid MIN a dále mutantní uORF kódující vedoucí peptidy o sekvenci MINEPYFQK, MGG, MKF, MRQ a MRL. Kontrolou v experimentu byl prázdný vektor pRMC2 a konstrukt uORF_mut použitý v experimentu z odd. 5.1.3, který nese mutaci ve start kodonu uORF. Indukční pattern výše uvedených variant atenuátorů *vgaALC* byl zjišťován v laboratorním kmenu *Staphylococcus aureus* RN4220 v odpovědi na přítomnost linkomycinu, klindamycinu, pristinamycinu IIA, tiamulinu, tetracyklinu, erythromycinu a spiramycinu.

Pro účel stanovení vhodné koncentrace antibiotika pro indukci genové exprese byla nejprve mikrodiluční metodou stanovena citlivost všech testovaných kmenů k těmto antibiotikům. Měření bylo provedeno dle postupu uvedeného v odd. 4.2.6.1 s následujícími odchylkami: měření probíhalo v BHI médiu (v tomto médiu byly kultivovány buňky, u nichž byla následně stanovována úroveň genové exprese) a při koncentraci selekčního antibiotika 5 µg/ml (důvod snížení selekční koncentrace z obvykle používané koncentrace 25 µg/ml je uveden níže).

Stanovení MIC bylo provedeno nezávisle dvakrát až třikrát vždy v duplikátech. Tab. 26 ukazuje hodnoty MIC nejvíce se opakující v jednotlivých měřeních.

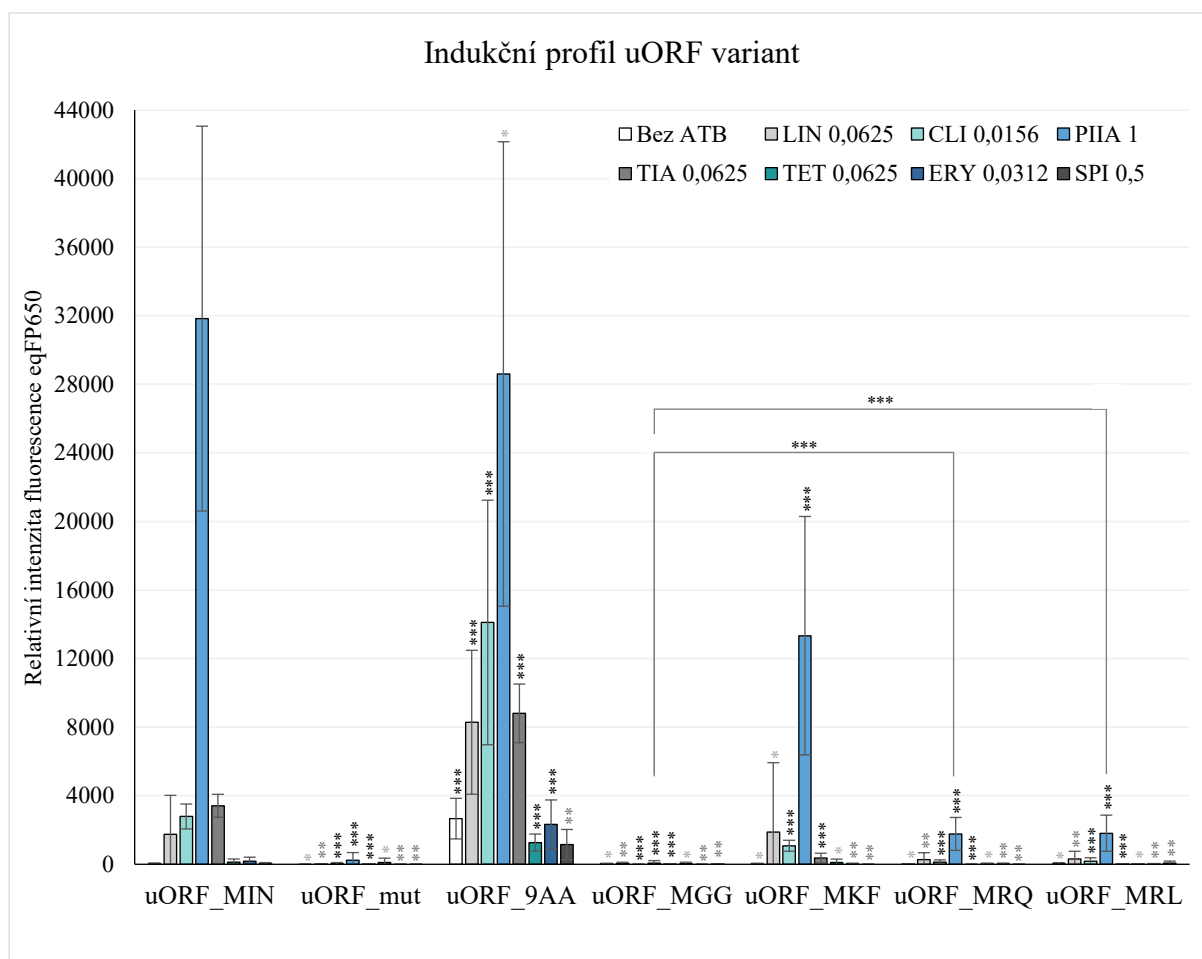
Tab. 26: Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) antibiotik blokujících translaci pro testované kmeny. LIN – linkomycin (linkosamid), CLI – klindamycin (linkosamid), PIIA – pristinamycin IIA (streptogramin A), TIA – tiamulin (pleuromutilin), TET – tetracyklin, ERY – erythromycin (14-členný makrolid), SPI – spiramycin (16-členný makrolid).

<i>S. aureus</i> RN4220	MIC (µg/ml)						
	LIN (L)	CLI (L)	PIIA (S _A)	TIA (P)	TET	ERY (M ₁₄)	SPI (M ₁₆)
pRMC2	0,25	0,063	2-4	0,25	1	0,125	2
uORF_MIN	0,5	0,063	4	0,125-0,25	0,25	0,125	2
uORF_mut	0,25	0,063	4	0,25	0,25-0,5	0,125	2
uORF_9AA	0,25	0,063	8	0,25	0,25-0,5	0,125	1-2
uORF_MGG	0,25	0,031-0,063	4	0,25	0,25-0,5	0,125	2
uORF_MKF	0,25	0,063	4	0,25	0,25-0,5	0,125	2
uORF_MRQ	0,25	0,031-0,063	4	0,25	0,25-0,5	0,125	2
uORF_MRL	0,25	0,063	4	0,25	0,25-0,5	0,125	2

Pro indukci genové exprese byla zvolena koncentrace antibiotika odpovídající přibližně čtvrtině MIC (MIC₂₅): linkomycin (0,0625 µg/ml), klindamycin (0,0156 µg/ml), pristinamycin IIA (1 µg/ml), tiamulin (0,0625 µg/ml), tetracyklin (0,0625 µg/ml), erythromycin (0,0312 µg/ml) a spiramycin (0,5 µg/ml). MIC měření ukázalo, že při této koncentraci antibiotika jsou buňky schopny narůst do denzity odpovídající nejméně 65 % denzity buněk kultivovaných v nepřítomnosti antibiotika (není ukázáno). Kontrolní měření indukce genové exprese u WT atenuátoru *vga_{ALC}* a u varianty s prodlouženým uORF ukázalo, že při této koncentraci již dochází k signifikantní genové expresi (není ukázáno).

Testování vlivu koncentrace selekčního antibiotika chloramfenikolu na indukci klindamycinem, pristinamycinem IIA a tetracyklinem u konstruktů s prodlouženým uORF, ukázalo, že při koncentraci chloramfenikolu 25 µg/ml je signál po indukci tetracyklinem o více než polovinu nižší než při koncentraci 5 µg/ml, menší pokles v naměřené fluorescenci byl pozorován také v případě klindamycinu a pristinamycinu IIA. Pro udržení plasmidu v buňce byla z tohoto důvodu v hlavním experimentu použita koncentrace chloramfenikolu 5 µg/ml.

Postup přípravy vzorků pro fluorescenční měření je uveden v odd. 4.2.7.1. Měření bylo provedeno nezávisle čtyřikrát vždy v duplikátech. Gain pro všechna fluorescenční měření byl nastaven manuálně na hodnotu 228. Výsledný graf ukazuje průměr všech měření. Intenzita fluorescence naměřená pro kmen s prázdným vektorem byla považována za autofluorescenci buněk a byla odečtena od intenzity fluorescence kmenů s konstruktem kódujícím eqFP650. Indukční profil atenuátorů *vga_{ALC}* s mutovanými uORF je ukázán na Grafu 4.



Graf 4: Indukční profil atenuátoru *vgaA_{LC}* s různými variantami uORF. Vedoucí peptid MIN je optimální pro detekci LSAP antibiotik. Pro rozpoznání těchto antibiotik je klíčová aminokyselinová sekvence vedoucího peptidu. Prodloužení uORF vede ke konstitutivní expresi a k zintenzivnění LSAP indukce. Hvězdičkami je znázorněna *P*-hodnota vypočítaná *t*-testem pro dvojici wild-type uORF a mutovaný uORF v přítomnosti daného antibiotika, případně pro dvojici naznačenou svorkami: *** ($P \leq 0,01$; velmi významný rozdíl); ** ($0,01 < P < 0,1$; středně významný rozdíl); * ($0,1 \leq P$; nevýznamný rozdíl). Negativní kontrola: atenuátor bez uORF (konstrukt uORF_mut nesoucí bodovou mutaci ve start kodonu uORF). Kultivace probíhala ve 2 ml BHI média s 5 $\mu\text{g/ml}$ selekčního antibiotika chloramfenikolu a s nebo bez testovaného antibiotika, hodnota $A_{600\text{nm}}$ a intenzita fluorescence byla měřena v 1x PBS.

V případě většiny konstruktů nedochází v nepřítomnosti antibiotika k expresi fluorescenčního reportéru, což je v souladu s očekáváním. Výjimkou je pouze konstrukt uORF_9AA kódující prodloužený vedoucí peptid. Jedním z možných vysvětlení může být, že struktura atenuátoru je uzpůsobena uORF o délce tří smysluplných kodonů. V případě výraznějšího prodloužení uORF je větší část mRNA obsazena translatujícími ribozomy, které mohou destabilizovat sekundární strukturu daného transkriptu, v důsledku čehož pak může dojít k narušení regulační schopnosti atenuátoru. Alternativním vysvětlení je, že zavedení příslušných bodových mutací (přestože jen tří) narušilo regulační sekundární strukturu mRNA. Terminátor pak v důsledku toho není dostatečně účinný. Nicméně i přesto je v případě tohoto konstruktů patrná velmi silná indukce linkomycinem, klindamycinem, pristinamycinem IIA a tiamulinem. Pozorovanou slabou expresí v přítomnosti tetracyklinu, erythromycinu a

spiramycinu je nutno zanedbat, neboť příslušné naměřené signály nepřevyšují signál naměřený u buněk kultivovaných bez antibiotika (kontrola).

WT atenuátor *vga_{ALC}* kódující vedoucí peptid o sekvenci MIN odpovídá velmi silně na přítomnost pristinamycinu IIA, slaběji pak na přítomnost linkomycinu, klindamycinu a tiamulinu, což je v souladu s publikovanými výsledky (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). Gen *vmlR* nesoucí putativní uORF, který kóduje tripeptid o stejné sekvenci odpovídá na linkomycin a pristinamycin IIA (v přítomnosti rezistenčního proteinu VmlR) (Ohki et al., 2005).

Obdobný indukční profil jako je u vedoucího peptidu MIN vykazuje také vedoucí peptid o sekvenci MKF – velmi silně odpovídá na přítomnost pristinamycinu IIA, méně pak na přítomnost linkomycinu a klindamycinu. To je v souladu se specificitou indukce genu *vgaL*, ze kterého vedoucí peptid MKF pochází. Bylo ukázáno, že *vgaL* je indukován linkomycinem (v přítomnosti rezistenčního proteinu VgaL), indukce pristinamycinem IIA nicméně testována nebyla (Dar et al., 2016).

Varianta atenuátoru kódující vedoucí peptid o sekvenci MRL odpovídá pouze na pristinamycin IIA, a to výrazně slaběji než vedoucí peptid MIN ale zároveň výrazně silněji než vedoucí peptid MGG, případně atenuátor bez uORF. Stejně tak atenuátor, jehož uORF kóduje vedoucí peptid o sekvenci MRQ. Toto zjištění je velmi překvapivé, neboť u původního atenuátoru *tetQ* translačně fúzovaného s reportérovým genem byla pozorována indukce linkomycinem, tetracyklinem a erythromycinem, indukce pristinamycinem IIA nicméně testována nebyla (Wang et al., 2004).

Velmi zajímavým zjištěním je, že atenuátor kódující na druhé a třetí pozici uORF glyciny (nejmenší kódované aminokyseliny) neodpovídá na přítomnost žádného z testovaných antibiotik. To jednoznačně ukazuje, že pro prvotní rozpoznání navázaných LS_{AP} antibiotik je důležitá aminokyselinová sekvence uORF. Tento výsledek zároveň také naznačuje, že se na uORF v přítomnosti indukujících antibiotik formuje SRC (což přímo experimentálně prozatím prokázáno nebylo) tak, jako u jiných na atenuátorů závislých na ribozomu.

V souladu s očekáváním atenuátor s mutací ve start kodonu uORF nebyl indukován linkomycinem ani žádným z dalších testovaných antibiotik.

Erythromycin neindukuje expresi z žádné z testovaných variant atenuátorů, což je v souladu s faktem, že pro rozpoznání tohoto antibiotika je obvykle nezbytná syntéza delšího vedoucího peptidu (Ramu et al., 2009; Vázquez-Laslop et al., 2011a). Erythromycinová indukce by patrně byla pozorována u varianty atenuátoru s uORF kódujícím tetrapeptid MRLR (Sothiselvam et al., 2014). Indukce spiramycinem není pozorována u žádného z testovaných

konstruktů, což je v souladu s očekáváním, neboť 16-členné makrolidy jako induktory obvykle nevystupují (Gupta et al., 2016; Sothiselvam et al., 2014; Vázquez-Laslop et al., 2011b).

Výše uvedená pozorování jednoznačně potvrzují, že pro primární rozpoznání antibiotika atenuátorem genu *vgaALC* je esenciální charakter vedoucího peptidu kódovaného uORF, zejména jeho aminokyselinová sekvence, a naopak není důležitá přítomnost stop kodonu na čtvrté pozici uORF. Pokud jsou součástí vedoucího peptidu prostorově nevýrazné aminokyseliny (glycin), k rozpoznání antibiotika nedochází. Zároveň změna aminokyselinové sekvence vedoucího peptidu vede k posunu antibiotické specificity atenuátoru. Získaná data ukazují, že aminokyselinová sekvence MIN je optimální pro rozpoznání testovaných linkosamidů, streptograminů A a pleuromutilinů, tedy antibiotik, ke kterým rezistenční protein VgaA udílí rezistenci.

5.5 BUNĚČNÁ LOKALIZACE REZISTENČNÍHO PROTEINU VgaALC SYNTETIZOVANÉHO VE FYZIOLOGICKÉM MNOŽSTVÍ

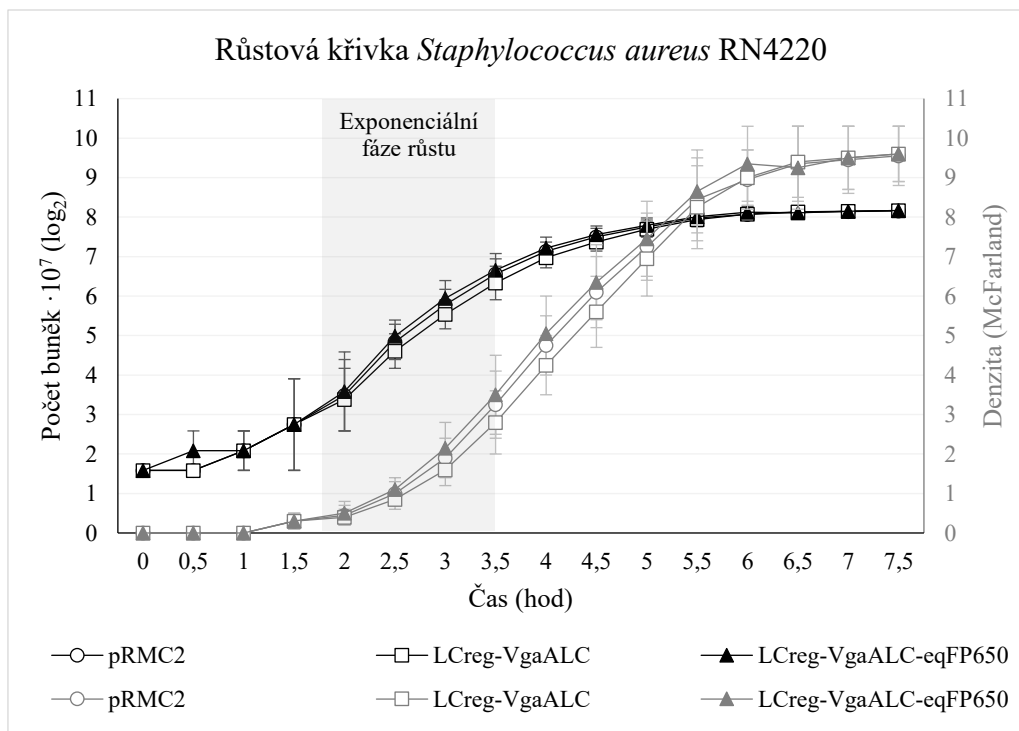
Otázka buněčné lokalizace ARE ABCF proteinů není doposud zcela dořešena. Přestože je v současnosti již definitivně potvrzeno, že tyto proteiny udílejí rezistenci mechanismem ochrany ribozomu (Lenart et al., 2015; Sharkey et al., 2016; Su et al., 2018), není jasné, proč frakcionace buněk a následná Western blot analýza ukazuje membránovou lokalizaci některých těchto proteinů (Chesneau et al., 2005; Olano et al., 1995). Jedním z možných vysvětlení je, že ARE ABCF interagují s membránovým transportérem (Kerr et al., 2005; Reynolds et al., 2003). Tato součinnost byla nicméně dosud potvrzena pouze pro jediný z ARE ABCF proteinů, protein MsrD, který spolupracuje s MFS transportérem MefE (Nunez-Samudio and Chesneau, 2013).

V rámci diplomové práce Mgr. Bich Nguyen Thi Ngoc (Nguyen Thi Ngoc, 2018) vypracované v naší laboratoři byla technikami fluorescenční mikroskopie zkoumána buněčná lokalizace ARE ABCF proteinů VgaALC a MsrA (výsledky pozorování shrnuty v diskuzi této diplomové práce). Uvedená studie byla provedena s využitím systému, kdy byl rezistenční gen exprimován z arteficiálního promotoru (exprese indukována přidavkem anhydrotetracyklinu o koncentraci 100 ng/ml). Tento systém však nereflektuje množství antibiotika v prostředí a množství produkovaného proteinu tak neodpovídá fyziologickému stavu. Cílem zde prezentovaného experimentu bylo pomocí fluorescenční mikroskopie ukázat buněčnou lokalizaci proteinu VgaALC, jehož produkce je řízena přirozeným regulátorem, a ověřit tak některé ze závěrů předcházející diplomové práce (Nguyen Thi Ngoc, 2018).

5.5.1 STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY KMENU *Staphylococcus aureus* RN4220 NESOUCÍHO KONSTRUKT L_{Creg}-V_{gaALC}-eqFP650

Před vlastním mikroskopickým pozorováním bylo nutné stanovit růstovou křivku testovaných kmenů tak, aby bylo možné určit, jaké hodnoty buněčné denzity přibližně odpovídají jednotlivým fázím růstu. Růstová křivka byla stanovena pro kmen *Staphylococcus aureus* RN4220 nesoucí gen *vgaALC* pod kontrolou přirozené regulační oblasti, stejný gen translačně fúzovaný s fluorescenčním reportérem *eqFP650* a prázdný vektor pRMC2. Buňky byly kultivovány za stejných podmínek, které byly následně aplikovány při kultivaci buněk pro mikroskopování. Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média s přidáním selekčním antibiotikem na třepačce při otáčkách 200 RPM a teplotě 37 °C. Buněčný nárůst byl zjišťován pomocí McFarland denzitometru (DENSI-LA-METER II) každých 30 min po dobu sedmi a půl hodin. Tento přístroj je schopen měřit zákal až do hodnoty 15 McF. Při vyšších denzitách tak není nutné suspenzi ředit, což je výhodné právě v případě práce s malým objemem kultury. Stejným způsobem byla určována buněčná denzita kultury při kultivaci buněk pro mikroskopovací pozorování. Měření bylo provedeno pouze pro kultivaci bez linkomycinu.

Z naměřených dat (Graf 5) vyplývá, že všechny testované kmeny rostou stejně. Lag fáze je dlouhá přibližně jednu hodinu. Exponenciální fáze začíná přibližně v devadesáté minutě, trvá dvě hodiny a kultura na jejím konci dosáhne denzity přibližně 3,5 McF. Kultura ve stacionární fázi dosahuje denzity až 9,5 McF. Lze předpokládat, že při koncentracích linkomycinu výrazně nižších než MIC (pro kmen s konstruktem L_{Creg}-V_{gaALC}-eqFP650 32 µg/ml při kultivaci v MH médiu (viz odd. 5.3.1.1.1) a 16 µg/ml při kultivaci v BHI médiu (viz odd. 5.3.2)) bude růstová křivka přibližně stejná, při vyšších koncentracích pak bude docházet k inhibici růstu.



Graf 5: Růstová křivka kmenů *Staphylococcus aureus* RN4220 nesoucích prázdný vektor pRMC2 a konstrukty LCreg-VgaALC a LCreg-VgaALC-eqFP650. Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média s přidáním selektivním antibiotikem na třepačce při otáčkách 200 RPM a teplotě 37 °C. Měření bylo prováděno každých 30 minut.

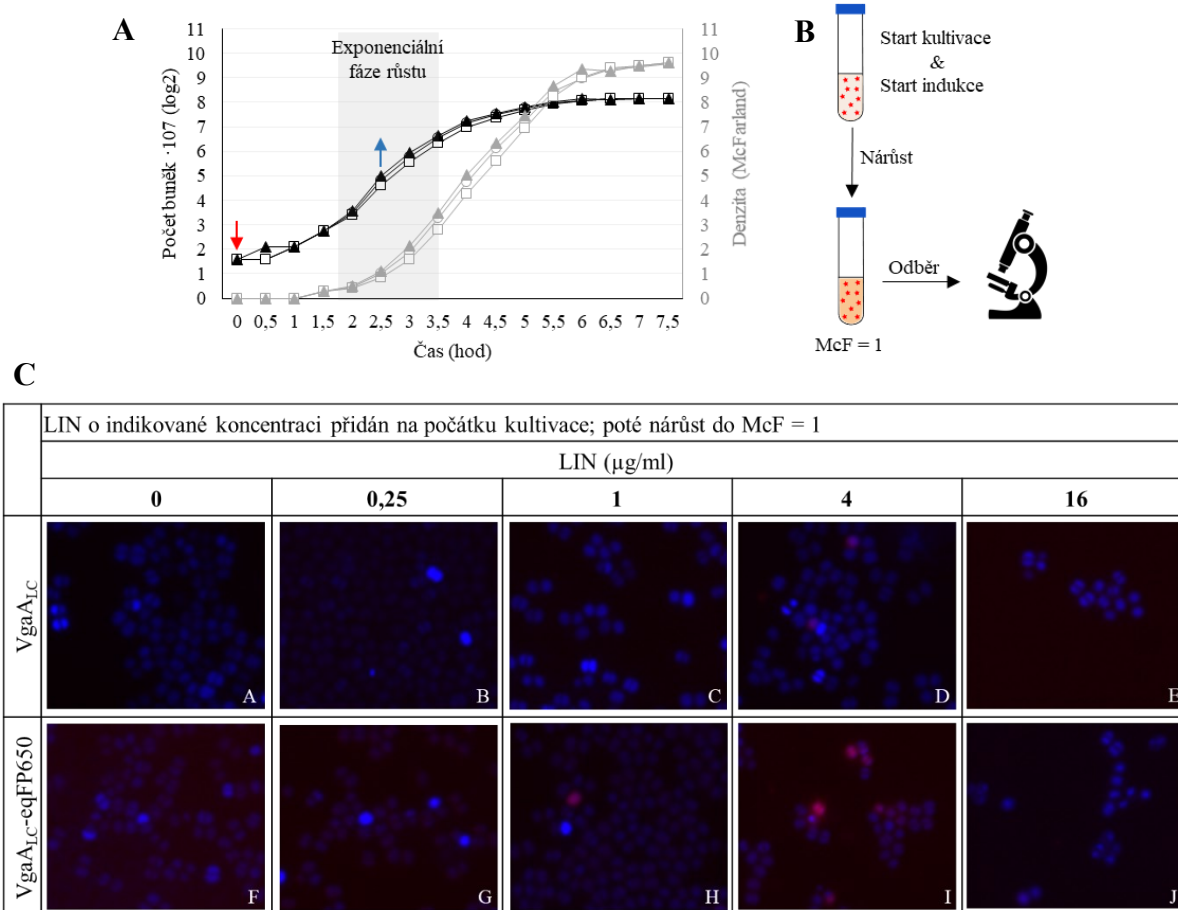
5.5.2 VIZUALIZACE VgaALC POMOCÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

V případě exprese z arteficiálního promotoru je buněčná lokalizace proteinu VgaALC závislá na teplotních podmínkách, době exprese, na fázi růstu, kdy je exprese započata, a na bakteriálním kmenu, a naopak nezávisí na přítomnosti linkomycinu (Nguyen Thi Ngoc, 2018). Pokud je produkce gen *vgaALC* pod kontrolou přirozeného regulátoru, produkce proteinu je závislá na množství indukujícího antibiotika linkomycinu v prostředí (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) (a odd. 5.3 této diplomové práce). Zde provedené pozorování by tak nemělo být ovlivněno artefakty způsobenými nadprodukcí (nepřirozenou mírou produkce) rezistenčního proteinu, které potenciálně mohly ovlivnit výsledky výchozí studie. V rámci jednotlivých experimentů byla sledována lokalizace proteinu v buňkách po indukci linkomycinem o různých koncentracích v různých růstových fázích.

Postup kultivace a přípravy vzorků pro mikroskopické pozorování je uveden v odd. 4.2.8.1. Všechny kultivace byly prováděny při 37 °C ve 3 ml BHI média s přidáním selektivním antibiotikem. Indukující antibiotikum bylo přidáváno do kultury v různých koncentracích: 0; 0,125; 0,25; 1; 4; 16; 32; 64 µg/ml a časech (resp. fázích růstu): McF = 0 (počátek kultivace); 0,1 (lag fáze); 0,4; 1; 2; 3,5 (exponenciální fáze); 4 (nástup stacionární fáze); 9 (kultivace přes

noc; stacionární fáze). Postup vlastního mikroskopování je uveden v odd. 4.2.8.2. Výsledné snímky uspořádané do pěti obrázků představují překryv dvou barevných kanálů, modrého (DAPI značící DNA) a červeného (proteinový reportér eqFP650 translačně fúzovaný s Vga_{ALC}). Pro každý vzorek bylo pořízeno osm až deset snímků z různých částí suspenze nanesené na mikroskopovací sklíčko.

Nejprve byl sledován vliv přítomnosti různých koncentrací linkomycinu, který byl přidán na začátku kultivace, na lokalizaci Vga_{ALC} v exponenciální fázi ($McF = 1$). Negativní kontrolou byl protein bez fluorescenčního reportéru a kultivace bez linkomycinu. Ze získaných dat (Obr. 34) je patrné, že rezistenční protein je za těchto podmínek rozptýlen v buňkách čistě difuzně nezávisle na množství linkomycinu. Dále si lze povšimnout, že část buněk vykazuje výrazně silnější červený signál značící nadprodukcí fúzního proteinu (Obr. 34C: H a I). Populace buněk je tedy v expresi rezistenčního proteinu heterogenní. Heterogenita v genové expresi se vyskytuje u buněk kultivovaných v přítomnosti linkomycinu o koncentracích 1 a 4 $\mu\text{g/ml}$. Buňky kultivované v přítomnosti linkomycinu o koncentraci 16 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 34C: J) vga_{ALC} neexprimují, což je v souladu s předchozími výsledky (viz odd. 5.3.2), kdy byla měřena intenzita fluorescence reportéru (odpovídající úrovni exprese genu) při různých koncentracích linkomycinu. Proteosyntéza je v tomto případě pravděpodobně zablokována, neboť MIC pro daný kmen je 16-32 $\mu\text{g/ml}$ v závislosti na kultivačních podmínkách (viz odd. 5.3.1.1.1 a 5.3.2). Je zde ale potřeba poznamenat, že v experimentu z odd. 5.3.2 byly buňky kultivovány přes noc (měření bylo provedeno na buňkách ve stacionární fázi), zatímco v tomto experimentu byly kultivovány do dosažení $McF = 1$ (analýza byla provedena na buňkách v exponenciální fázi).

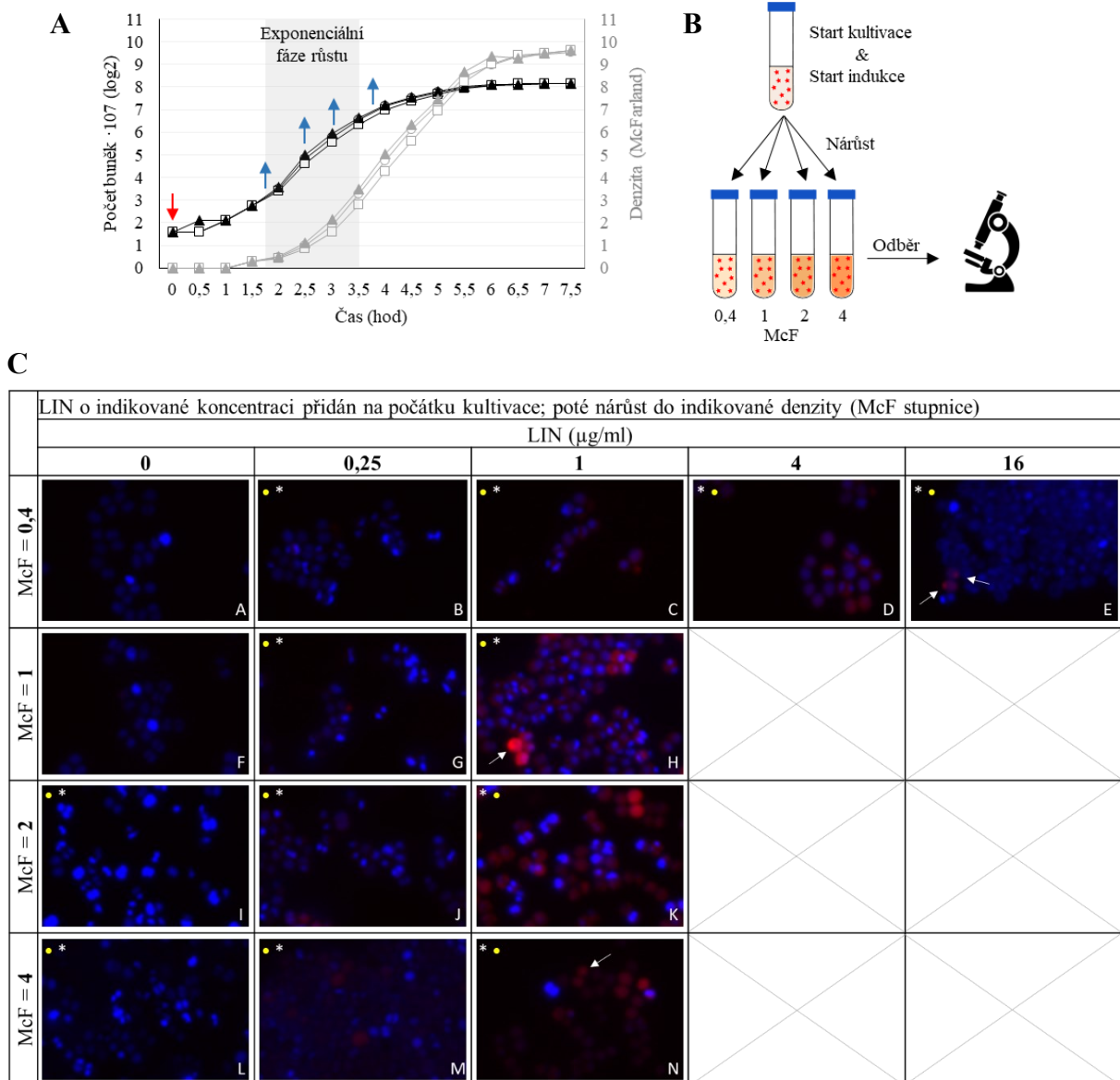


Obr. 34: Vliv koncentrace linkomycinu (LIN) přidávaného na počátku kultivace na buněčnou lokalizaci rezistenčního proteinu Vga_{ALC} v kmenu *Staphylococcus aureus* RN4220. (A) Růstová křivka *Staphylococcus aureus* RN4220 s vyznačeným časem přidání antibiotika (červená šipka) a časem odběru vzorku pro mikroskopování (modrá šipka). (B) Schematické znázornění průběhu experimentu. (C) Mikroskopie. Modrý signál odpovídá DNA (DAPI), červený signál odpovídá značenému Vga_{ALC} (eqFP650). Expres vga_{ALC} probíhá pouze v přítomnosti linkomycinu, a to do koncentrace nižší než MIC. Expres je v rámci populace buněk heterogenní. Vga_{ALC} je v buňkách za všech podmínek rozptýlen čistě difúzně. Rozložení barevné kanály jsou ukázány v Příloze 3 (Obr. P-2). Negativní kontrola: kmen s konstruktem bez fluorescenčního reportéru. Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média s přidáním selektivním antibiotikem a linkomycinem o indikované koncentraci do McF = 1. Buňky resuspendované v 1x PBS a obarvené barvičkou DAPI byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem.

V další fázi byl sledován vliv růstové fáze na lokalizaci a míru produkce rezistenčního proteinu Vga_{ALC} v buňkách. Buňky byly od počátku kultivovány v přítomnosti linkomycinu o několika koncentracích a pod mikroskopem byly pozorovány po nárůstu do čtyřech různých denzit. Negativní kontrolou v experimentu byl konstrukt bez fluorescenčního reportéru a kultivace bez linkomycinu. Na výsledném obrázku (Obr. 35) nejsou ukázány vzorky bez fluorescenčního reportéru, tyto vzorky dle předpokladu neposkytovaly červený signál odpovídající reportéru eqFP650. Část vzorků z tohoto experimentu nebyla fotografována ihned po kultivaci, ale až následující den. V takovém případě byly vzorky nabarveny barvičkou DAPI a zamraženy v 10% glycerolu v 1x PBS, případně zamraženy v 10% glycerolu v 1x PBS a barvičkou DAPI nabarveny až následující den těsně před pozorováním. Z důvodu, že barvení

před zmražením se ukázalo jako nevhodné (modrý signál není rovnoměrně rozprostřen po celé ploše buňky), se tento postup v dalších experimentech nevyužíval a buňky se dále barvily až po rozmražení. Část kultivací s linkomycinem o koncentraci 4 a 16 $\mu\text{g/ml}$ rostla velmi pomalu, proto je nebylo možné zařadit do experimentu a v prezentovaném obrázku chybí.

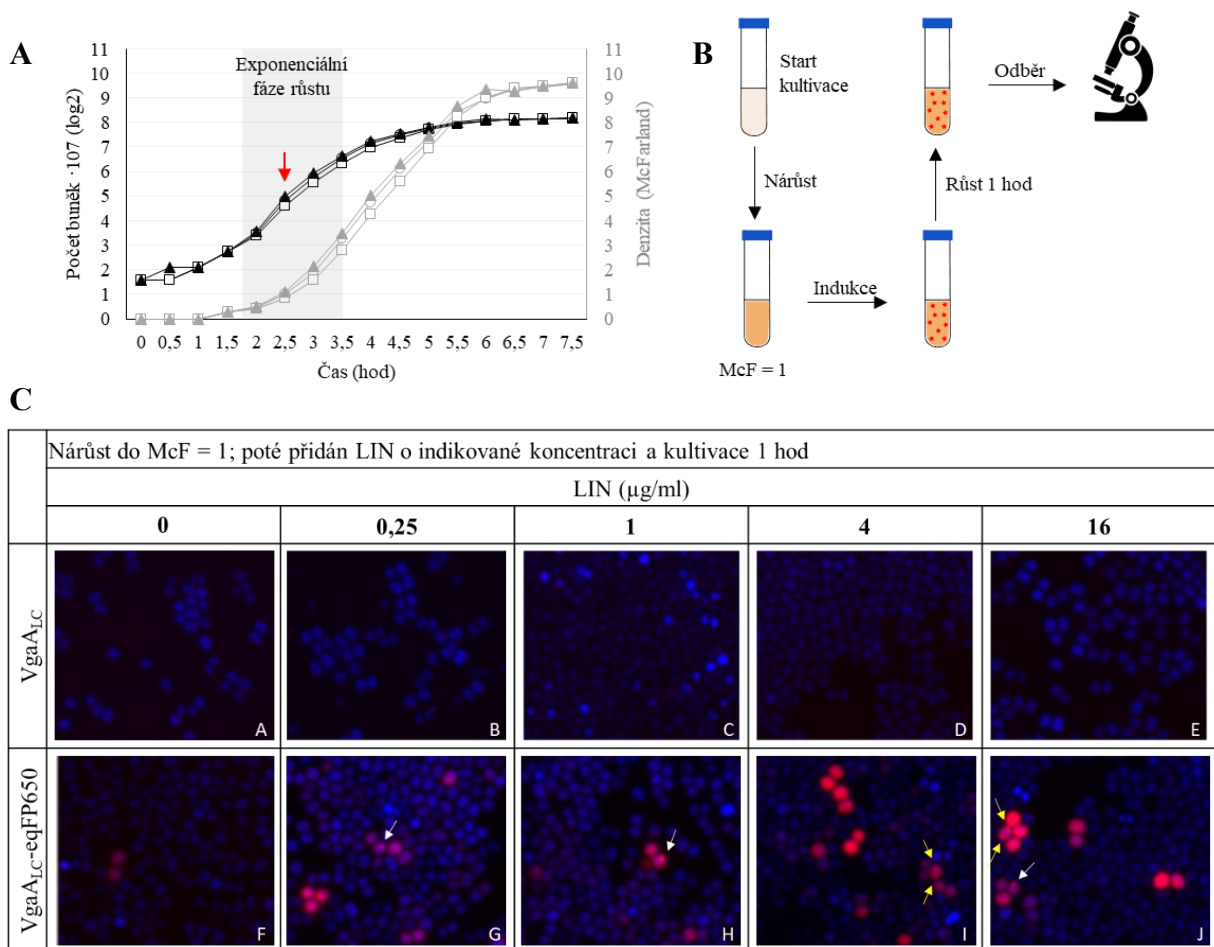
Výsledky potvrzují předchozí pozorování, že v přítomnosti linkomycinu od počátku kultivace je rezistenční protein v buňkách rozptýlen difuzně, pouze u několika málo buněk (Obr. 35C: E a H) je patrná difuzní lokalizace kombinovaná s ohniskovou. Tyto buňky vykazují zvýšenou expresi. Opět je patrná heterogenita v genové expresi. V přítomnosti linkomycinu o koncentraci 16 $\mu\text{g/ml}$ k expresi *vgaALC* nedochází, což je v souladu s výsledky prvního dílčího experimentu (Obr. 34) a s naměřenými hodnotami intenzity fluorescence reportéru (viz odd. 5.3.2). Se závěry z odd. 5.3.2 dále souhlasí, že genová exprese je přibližně stejná při koncentraci linkomycinu 1 a 4 $\mu\text{g/ml}$ a současně vyšší než při koncentraci 0,25 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 35: Vliv koncentrace linkomycinu (LIN) přidávaného do kultury na počátku kultivace na buněčnou lokalizaci rezistenčního proteinu Vga_{ALC} v buňkách kultivovaných do indikované hustoty (McF stupnice). (A) Růstová křivka *Staphylococcus aureus* RN4220 s vyznačeným časem přidání antibiotika (červená šipka) a časem odběru vzorků pro mikroskopování (modré šipky). (B) Schematické znázornění průběhu experimentu. (C) Mikroskopie. Modrý signál odpovídá DNA (DAPI), červený signál odpovídá značenému Vga_{ALC} (eqFP650). Bílé šipky poukazují na ohniska v počtu jedno na buňku, žluté šipky poukazují na ohniska v počtu dvě na buňku. Expresce *vgaALC* probíhá pouze v přítomnosti linkomycinu a je v rámci populace buněk heterogenní. Vga_{ALC} je ve většině buněk rozptýlen difuzně, u několika buněk se zvýšenou expresí je lokalizace částečně difúzní, částečně ohnisková. Rozložení barevné kanály jsou ukázány v Příloze 3 (Obr. P-3). Negativní kontrola: kmen s konstruktem bez fluorescenčního reportéru (není součástí obrázku). Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média s přidáním selektivním antibiotikem a linkomycinem o indikované koncentraci do indikované hustoty (McF stupnice). Poté byly buňky resuspendovány v 1x PBS, obarveny barvičkou DAPI, zamrazeny v 10% glycerolu a následující den mikroskopovány (), případně zamrazeny v 10% glycerolu a následující den resuspendovány v 1x PBS, obarveny barvičkou DAPI a poté mikroskopovány (*).**

Následně byl sledován vliv přítomnosti různých koncentrací linkomycinu, který byl přidán v exponenciální fázi (McF = 1), na lokalizaci Vga_{ALC}. Po přidání antibiotika byla kultura inkubována na třepačce 1 hodinu. Negativní kontrolou v experimentu byl konstrukt bez fluorescenčního reportéru a kultivace bez linkomycinu. Získaná data (Obr. 36) potvrzují

předchozí pozorování, že buňky uvnitř populace produkují VgaA_{LC} nestejně. Zde je heterogenita v genové expresi patrná u buněk kultivovaných s linkomycinem nezávisle na jeho koncentraci. Důvodem, proč je exprese pozorována i při minimální inhibiční koncentraci (16 μg/ml), je pravděpodobně fakt, že antibiotikum bylo do kultury přidáno až po dosažení denzity, která odpovídá exponenciální fázi. Buňky tedy byly v momentě přidání linkomycinu metabolicky aktivní a obsahovaly velké množství ribozomů. Antibiotikum tak v tomto množství zablokovalo pouze část ribozomů. Naopak v případě přítomnosti linkomycinu o koncentraci 16 μg/ml hned od počátku kultivace buňka nemá dostatek volných ribozomů, a proto k expresi rezistenčního proteinu nedochází. V podmínkách, kdy bylo antibiotikum přidáno do kultury až po dosažení exponenciální fáze je protein v buňkách rozptýlen ve většině případů pouze difuzně. Mimo to se ale u velmi malé části buněk objevuje distribuce částečně difuzní, částečně ohnisková. Tato ohniska se vyskytují v počtu obvykle jedno na buňku (označení bílou šipkou), méně pak v počtu dvě na buňku (označení žlutou šipkou). Částečně fokálně lokalizovaný protein je patrný pouze u buněk se zvýšenou expresí rezistenčního genu.

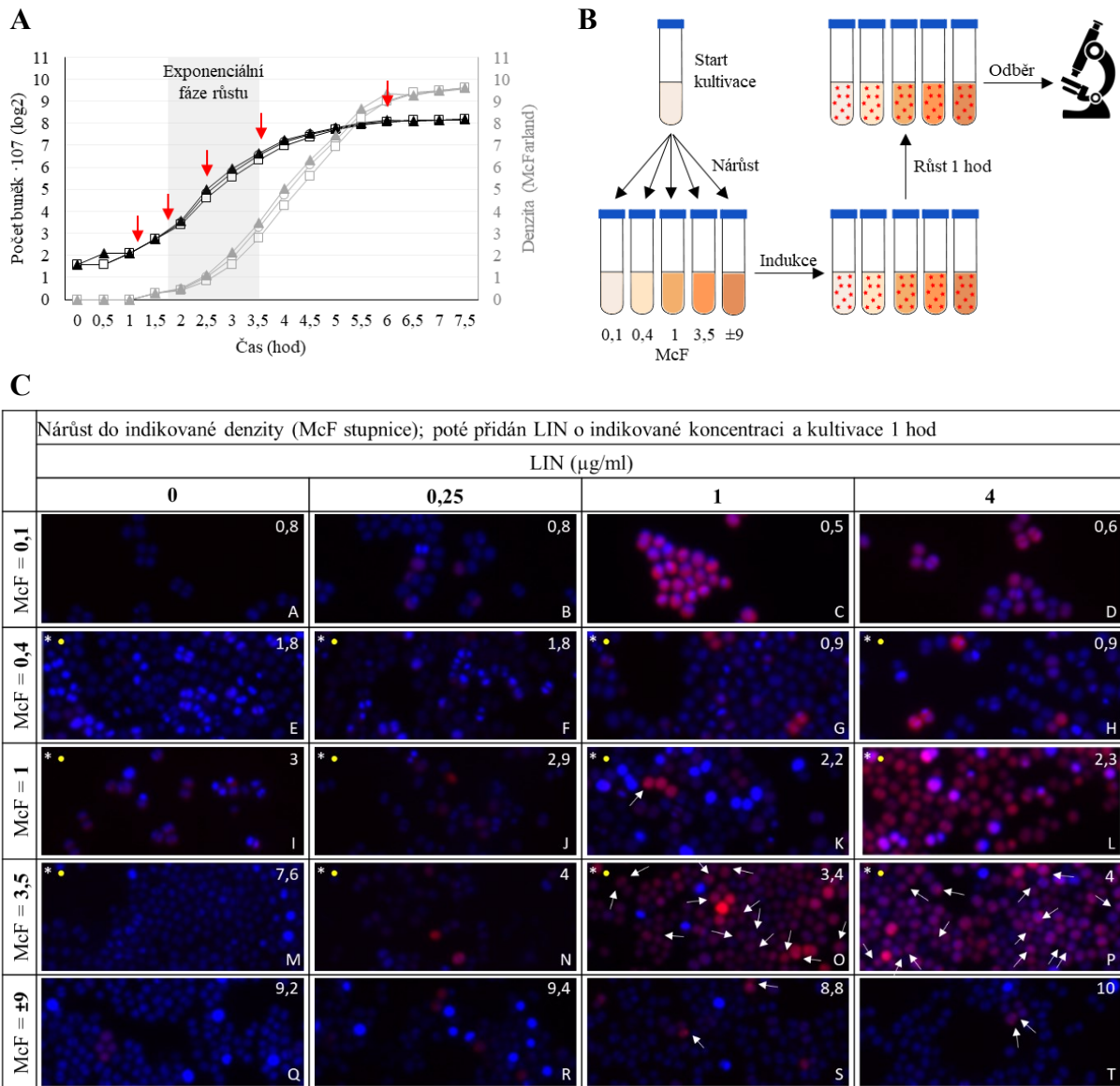


Obr. 36: Vliv koncentrace linkomycinu (LIN) přidaného do kultury po dosažení $McF = 1$ na buněčnou lokalizaci rezistenčního proteinu Vga_{ALC} . (A) Růstová křivka *Staphylococcus aureus* RN4220 s vyznačeným časem přidání antibiotika (červená šipka), odběr vzorku pro mikroskopování následoval po jedné hodině kultivace. (B) Schematické znázornění průběhu experimentu. (C) Mikroskopie. Modrý signál odpovídá DNA (DAPI), červený signál odpovídá značenému Vga_{ALC} (eqFP650). Bílé šipky poukazují na ohniska v počtu jedno na buňku, žluté šipky poukazují na ohniska v počtu dvě na buňku. Expres vga_{ALC} probíhá pouze v přítomnosti linkomycinu a je v rámci populace buněk heterogenní. Vga_{ALC} je ve většině buněk rozptýlen difuzně, u několika buněk se zvýšenou expresí je lokalizace částečně difuzní, částečně ohnisková. Rozložené barevné kanály jsou ukázány v Příloze 3 (Obr. P-4). Negativní kontrola: kmen s konstruktem bez fluorescenčního reportéru. Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média s přidaným selekčním antibiotikem do $McF = 1$, po přidavku linkomycinu o indikované koncentraci kultivace pokračovala 1 hodinu. Buňky resuspendované v 1x PBS a obarvené barvičkou DAPI byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem.

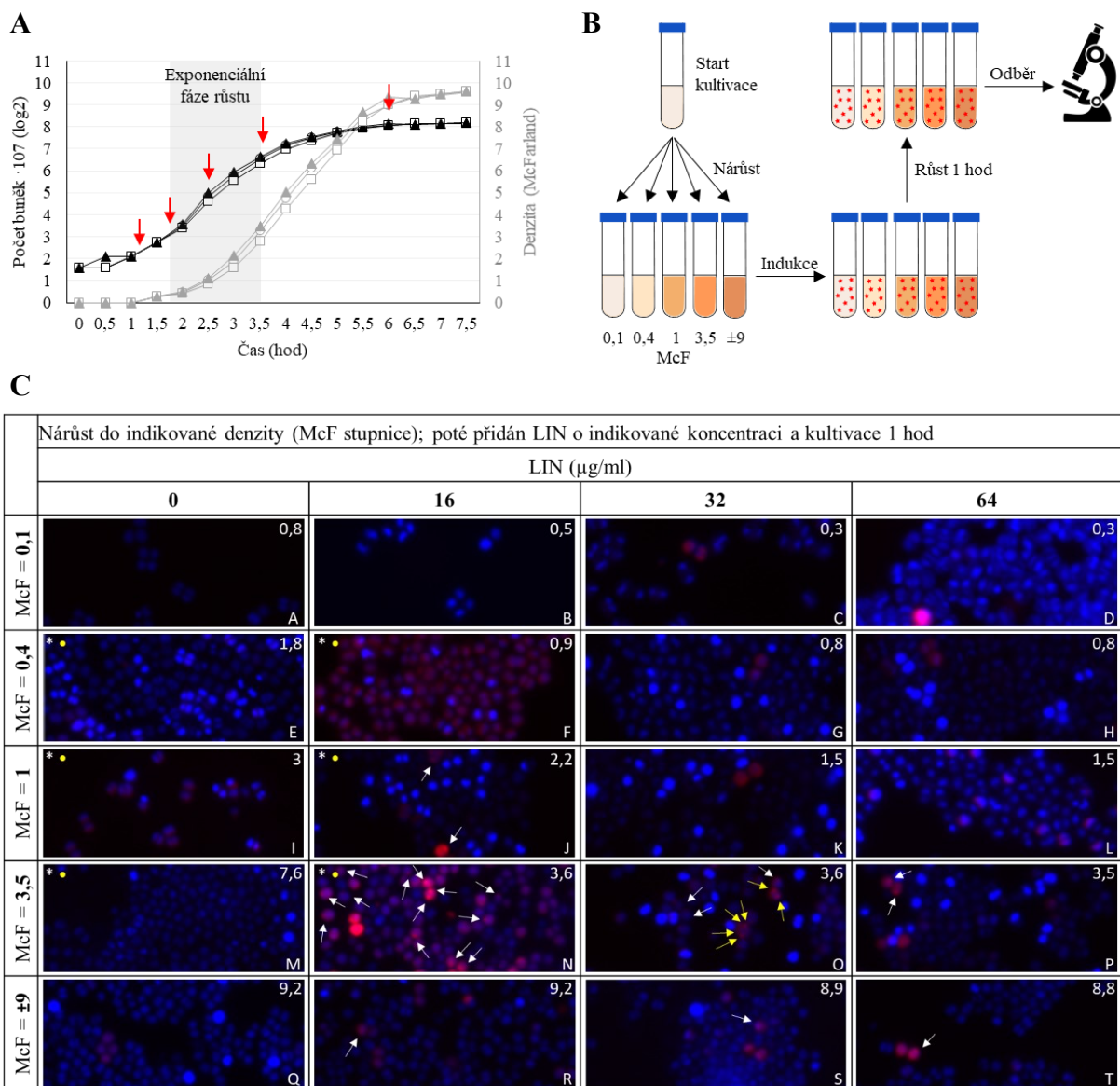
V další fázi byl sledován vliv růstové fáze, ve které byl přidán linkomycin, na lokalizaci a míru produkce rezistenčního proteinu Vga_{ALC} v buňkách. Linkomycin byl v tomto případě přidán v lag fázi ($McF = 0,1$), v exponenciální fázi ($McF = 0,4$; 1 a 3,5) a ve stacionární fázi ($McF = \pm 9$) (kultivace přes noc 18 hod). Po přidání antibiotika byla kultura inkubována na třepačce 1 hodinu. Negativní kontrolou v experimentu byl konstrukt bez fluorescenčního reportéru a kultivace bez linkomycinu. Část vzorků z tohoto experimentu nebyla fotografována ihned po kultivaci, ale až následující den. V takovém případě byly vzorky zamrazeny v 10% glycerolu v 1x PBS a následující den byly těsně před samotným pozorováním obarveny barvičkou DAPI.

Získaná data (Obr. 37 a 38) potvrzují předchozí pozorování, že k expresi genu vga_{ALC} dochází v největší míře u buněk indukovaných linkomycinem o koncentracích 1 – 16 $\mu\text{g/ml}$, a to v případě, že byl k buňkám přidán po dosažení exponenciální fáze ($McF = 1$, případně 3,5), kdy jsou buňky metabolicky vysoce aktivní. Naopak nejnižší je exprese v případě přidavku linkomycinu po nárůstu do stacionární fáze ($McF = \pm 9$). To je v souladu s faktem, že se tyto buňky nacházejí ve stacionární fázi a jejich metabolismus je utlumen. Dále opět platí, že exprese genu je v rámci populace heterogenní. Heterogenita se vyskytuje u buněk kultivovaných s linkomycinem o koncentracích 0,25 – 16 $\mu\text{g/ml}$. Vyšší koncentrace antibiotika (32 a 64 $\mu\text{g/ml}$) pravděpodobně způsobují zablokování velké části ribozomů, které tak nejsou schopné syntézy rezistenčního proteinu, proto u daných kultivací není exprese patrná. U většiny buněk, které byly kultivovány s antibiotikem po dosažení lag fáze ($McF = 0,1$); exponenciální fáze ($McF = 0,4$; 1) a stacionární fáze ($McF = \pm 9$), je Vga_{ALC} rozptýlen čistě difuzně nezávisle na koncentraci antibiotika. U velmi malé části buněk (především u buněk kultivovaných s antibiotikem po dosažení stacionární fáze) je za těchto podmínek patrná částečně difuzní, částečně ohnisková lokalizace. Ohniska se opět vyskytují u buněk s vyšší genovou expresí oproti zbytku populace obvykle v počtu jedno na buňku. Nápadně vyšší zastoupení částečně ohniskové, částečně difuzní lokalizace rezistenčního proteinu je patrné u buněk, ke kterým byl linkomycin o různých koncentracích přidán po dosažení konce exponenciální fáze ($McF = 3,5$)

(Obr. 37C: O, P a Obr. 38C: N, O, P). Zajímavé je, že v tomto případě jsou ohniska znatelná nejen u buněk se zvýšenou expresí *vga_{ALC}*, ale i u buněk s nižším fluorescenčním signálem.



Obr. 37: Vliv koncentrace linkomycinu (LIN) přidaného do kultury po dosažení indikované hustoty (McF stupnice) na buněčnou lokalizaci rezistenčního proteinu *Vga_{ALC}*. (A) Růstová křivka *Staphylococcus aureus* RN4220 s vyznačenými časy přidání antibiotika (červené šipky), odběry vzorků pro mikroskopování následovaly po jedné hodině kultivace. (B) Schematické znázornění průběhu experimentu. (C) Mikroskopie. Modrý signál odpovídá DNA (DAPI), červený signál odpovídá značenému *Vga_{ALC}* (eqFP650). Bílé šipky poukazují na ohniska v počtu jedno na buňku. Hodnoty v pravém horním rohu představují hustotu kultury (McF stupnice) dosažené po hodinové kultivaci s antibiotikem. Expres *vga_{ALC}* probíhá pouze v přítomnosti linkomycinu a je v rámci populace buněk heterogenní. *Vga_{ALC}* je ve většině buněk rozptýlen difuzně, zejména u buněk kultivovaných do McF = 3,5 je však lokalizace částečně difuzní, částečně ohnisková (nezávisle na koncentraci antibiotika a na intenzitě exprese). Rozložené barevné kanály jsou ukázány v Příloze 3 (Obr. P-5). Negativní kontrola: kmen s konstruktem bez fluorescenčního reportéru (není součástí obrázku). Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média s přidáním selektivním antibiotikem do indikované hustoty (McF stupnice), po přidavku linkomycinu o indikované koncentraci kultivace pokračovala 1 hodinu. Buňky resuspendované v 1x PBS a obarvené barvičkou DAPI byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem. U vzorků s označením *• proběhlo nejprve zamrazení v 10% glycerolu, následující den poté proběhlo resuspendování v 1x PBS, obarvení barvičkou DAPI a mikroskopování.



Obr. 38: Vliv koncentrace linkomycinu (LIN) přidávaného do kultury po dosažení indikované density (McF stupnice) na buněčnou lokalizaci rezistenčního proteinu Vga_{ALC}. (A) Růstová křivka *Staphylococcus aureus* RN4220 s vyznačenými časy přidání antibiotika (červené šipky), odběry vzorků pro mikroskopování následovaly po jedné hodině kultivace. (B) Schematické znázornění průběhu experimentu. (C) Mikroskopie. Modrý signál odpovídá DNA (DAPI), červený signál odpovídá značenému Vga_{ALC} (eqFP650). Bílé šipky poukazují na ohniska v počtu jedno na buňku, žluté šipky poukazují na ohniska v počtu dvě na buňku. Hodnoty v pravém horním rohu představují densitu kultury (McF stupnice) dosažené po hodinové kultivaci s antibiotikem. Expres vga_{ALC} probíhá pouze v přítomnosti linkomycinu a je v rámci populace buněk heterogenní. Vga_{ALC} je ve většině buněk rozptýlen difúzně, zejména u buněk kultivovaných do McF = 3,5 je však lokalizace částečně difúzní, částečně ohnisková (nezávisle na koncentraci antibiotika a na intenzitě exprese). Rozložené barevné kanály jsou ukázány v Příloze 3 (Obr. P-6). Negativní kontrola: kmen s konstruktem bez fluorescenčního reportéru (není součástí obrázku). Kultivace probíhala ve 3 ml BHI média s přidáním selektivním antibiotikem do indikované density (McF stupnice), po přidání linkomycinu o indikované koncentraci kultivace pokračovala 1 hodinu. Buňky resuspendované v 1x PBS a obarvené barvičkou DAPI byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem. U vzorků s označením *• proběhlo nejprve zamrazení v 10% glycerolu, následující den poté proběhlo resuspendování v 1x PBS, obarvení barvičkou DAPI a mikroskopování.

Následující dvě tabulky (Tab. 27 a 28) představují výsledek souhrnné analýzy heterogenity v genové expresi vga_{ALC} v rámci populace buněk za různých kultivačních podmínek. Hlavní čísla v tabulce ukazují procentuální zastoupení buněk s velmi silnou expresí vga_{ALC}, které byly

vypočítány z jednoho reprezentativního snímku buněčné kultury v daných kultivačních podmínkách. Hodnoty z obou tabulek současně byly barevně zvýrazněny pomocí podmíněného formátování.

Z dat vyplývá, že kultura obsahuje největší podíl buněk s velmi silnou expresí v podmínkách, kdy bylo indukující antibiotikum přidáno v exponenciální fázi (McF = 0,4; 1; 3,5). Pokud bylo indukující antibiotikum přidáno na počátku kultivace, kultura obsahuje relativně největší podíl buněk s velmi silnou expresí *vga_{ALC}* po nárůstu do exponenciální fáze (McF = 0,4; 1; 2). Tyto hodnoty jsou však nižší než v prvně jmenovaném případě. Nejeфективnější koncentrací linkomycinu pro indukci tvorby buněk s velmi silnou expresí *vga_{ALC}* je 1 až 4 µg/ml, případně 16 µg/ml. Podstata heterologní exprese *vga_{ALC}* není známa a její možné příčiny jsou diskutovány později.

Tab. 27: Procentuální zastoupení buněk s velmi silnou expresí v kultuře, která byla indukována různými koncentracemi linkomycinu od počátku kultivace. V pravém horním rohu každé buňky je uveden počet buněk, ze kterých byla procentuální hodnota vypočtena. Šipkou směřující dolů je naznačeno přidání linkomycinu na počátku kultivace. Vodorovnou šipkou je znázorněna kultivace na třepačce. Šipkou směřující nahoru je naznačena fáze odběru buněk pro mikroskopování.

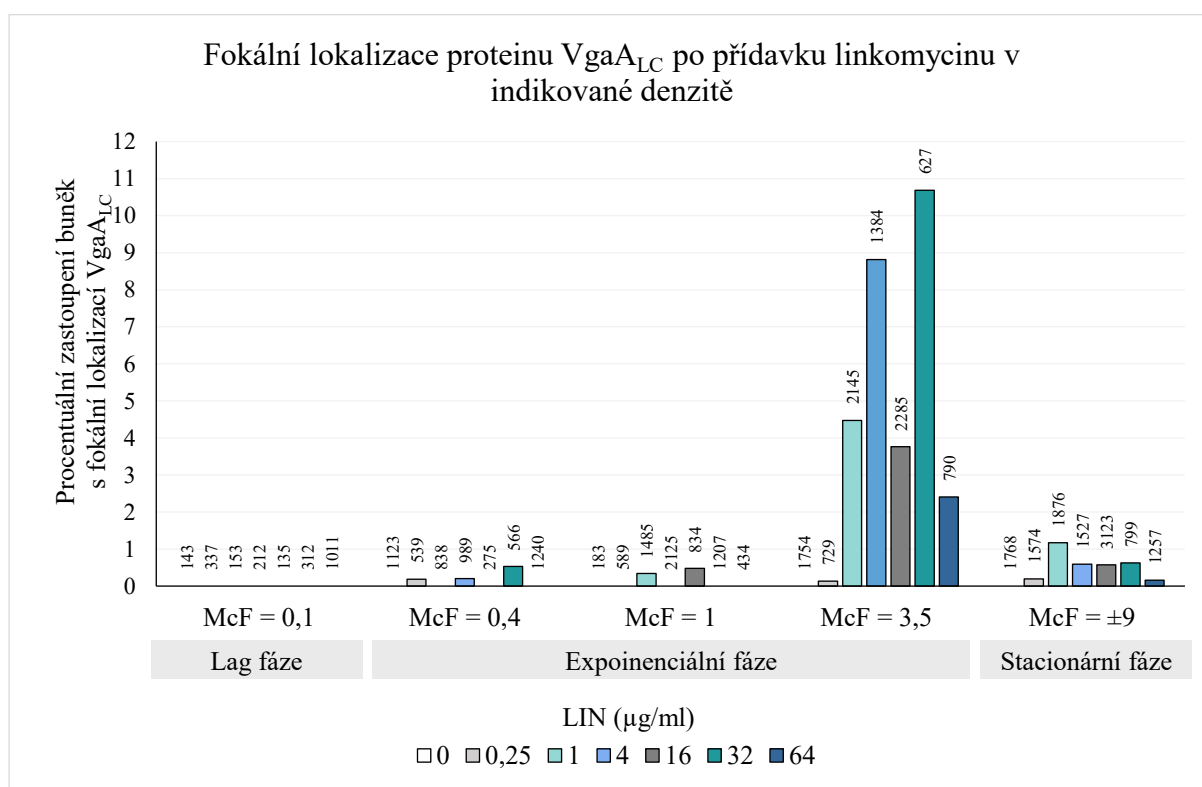
Zastoupení buněk s velmi silnou expresí (%)		LIN (µg/ml)				
		přidán na počátku kultivace				
		0	0,25	1	4	16
↓ LIN → ↑	McF = 0,4	0,00 ⁹⁴	0,00 ¹²⁷	1,19 ⁸⁴	1,75 ¹¹⁴	1,62 ⁴³¹
↓ LIN → ↑	McF = 1	0,00 ⁷³⁶	0,00 ³²⁰	0,31 ⁶⁵⁵	3,61 ²⁴⁹	1,74 ¹¹⁵
↓ LIN → ↑	McF = 2	0,00 ³⁹⁸	1,12 ⁴⁴⁷	1,65 ⁹⁷¹	nd	nd
↓ LIN → ↑	McF = 4	0,00 ⁹⁵⁶	0,24 ⁸³⁴	0,73 ²¹⁸²	nd	nd

Tab. 28: Procentuální zastoupení buněk s velmi silnou expresí v kultuře, která byla indukována různými koncentracemi linkomycinu v různých fázích růstu. V pravém horním rohu každé buňky je uveden počet buněk, ze kterých byla procentuální hodnota vypočtena. Šipkou směřující dolů je naznačena fáze přidání linkomycinu. Vodorovnou šipkou je znázorněna kultivace na třepačce. Šipkou směřující nahoru je naznačen odběr buněk pro mikroskopování po hodinové kultivaci.

Zastoupení buněk s velmi silnou expresí (%)		LIN (µg/ml)				
		přidán v indikované denzitě (McF), poté kultivace 1 hod				
		0	0,25	1	4	16
Lag	McF = 0,1 → ↓ LIN -1h → ↑	0,00 ¹⁴³	1,78 ³³⁷	0,00 ¹⁵³	4,72 ²¹²	0,00 ¹³⁵
Exp	McF = 0,4 → ↓ LIN -1h → ↑	0,00 ¹¹²³	0,37 ⁵³⁹	9,90 ⁸³⁸	2,73 ⁹⁸⁹	0,00 ²⁷⁵
	McF = 1 → ↓ LIN -1h → ↑	0,00 ¹⁸³	0,85 ⁵⁸⁹	3,37 ¹⁴⁸⁵	6,59 ²¹²⁵	0,60 ⁸³⁴
	McF = 3,5 → ↓ LIN -1h → ↑	0,00 ¹⁷⁵⁴	0,69 ⁷²⁹	3,50 ²¹⁴⁵	4,12 ¹³⁸⁴	3,89 ²²⁸⁵
Stac	McF = ±9 → ↓ LIN -1h → ↑	0,00 ¹⁷⁶⁸	0,64 ¹⁵⁷⁴	1,07 ¹⁸⁷⁶	0,79 ¹⁵²⁷	1,15 ³¹²³

Následující graf (Graf 6) představuje výsledek souhrnné analýzy ohniskové lokalizace proteinu *Vga_{ALC}*. Hodnoty na ose y představují procentuální zastoupení buněk s fokální lokalizací *Vga_{ALC}*. Hodnoty byly vypočítány z jednoho reprezentativního snímku buněčné kultury v daných kultivačních podmínkách.

Pokud bylo indukující antibiotikum přidáno na počátku kultivace, v lag fázi, případně na počátku exponenciální fáze, k tvorbě ohnisek téměř nedocházelo. Naopak indukce linkomycinem na konci exponenciální fáze růstu (McF = 3,5) vedla k nejintenzivnější tvorbě ohnisek. Tato ohniska se tvořila po přidavku linkomycinu o koncentracích 1, 4, 16, 32 a 64 $\mu\text{g/ml}$. Absence antibiotika či jeho velmi nízká koncentrace (0,25 $\mu\text{g/ml}$) k tvorbě ohnisek nevedla. Ohnisková lokalizace byla dále pozorována ve výrazně menším počtu po indukci linkomycinem ve stacionární fázi (McF = ± 9). V tomto případě byl podíl buněk s fokální lokalizací přibližně stejný při všech testovaných koncentracích indukujícího antibiotika. Tato pozorování naznačují, že ohnisková lokalizace nemá funkční souvislost. K tvorbě ohnisek dochází pravděpodobně vlivem nadprodukce rezistenčního proteinu a ta jsou tak pravděpodobně tvořena nerozpustným proteinem.



Graf 6: Fokální lokalizace proteinu Vga_{A_{LC}} po přidavku linkomycinu v indikované buněčné denzitě. Osa x znázorňuje buněčnou denzitu, ve které bylo přidáno indukující antibiotikum o koncentraci 0; 0,25; 1; 4; 16; 32 nebo 64 $\mu\text{g/ml}$. Osa y znázorňuje procentuální zastoupení buněk s fokální lokalizací proteinu Vga_{A_{LC}}. Číselné hodnoty u každé z datových řad představují celkový počet buněk, ze kterého byla procentuální hodnota vypočtena. Největší podíl buněk s fokální lokalizací je pozorován po indukci antibiotikem o koncentraci 1 až 64 $\mu\text{g/ml}$ na konci exponenciální fáze (McF = 3,5), méně pak po indukci ve stacionární fázi (McF = ± 9).

6 DISKUZE

V předkládané diplomové práci bylo ukázáno, že gen *vga_{ALC}* ze *Staphylococcus haemolyticus* kódující ARE ABCF rezistenční protein je regulován na transkripční úrovni ribozomem zprostředkovanou atenuací. Exprese genu je spouštěna v odpovědi na LSAP antibiotika, která jsou primárně rozpoznávána pomocí vedoucího peptidu kódovaného uORF. Celková antibiotická specifita indukce se však odvíjí také od antibiotické specifity rezistenčního proteinu, pomocí které je regulační systém doladován. Protein, jehož produkce je řízena přirozeným regulátorem reflektujícím množství antibiotika v prostředí udílí vyšší úroveň rezistence než stejný protein pod kontrolou arteficiálního regulátoru. Mikroskopická pozorování ukázala, že produkce proteinu kontrolovaného přirozeným regulátorem je v rámci populace buněk heterogenní a že jeho lokalizace uvnitř buňky je spíše difuzní.

V první části práce bylo dokázáno, že promotor genu se nachází přibližně mezi 248. a 375. nukleotidem upstream od ORF genu (viz odd. 5.1.2). Počítačová predikce následně ukázala, že se v této oblasti nachází dva potenciální promotory (5'UTR o délkách 314, resp. 259 nukleotidů). Obdobnou délku mají 5'UTR oblasti jiných atenuací regulovaných rezistenčních genů – například geny *vgaL* (Dar et al., 2016), *vmlR* (Ohki et al., 2005) a *tetM* (Su et al., 1992) regulované na transkripční úrovni nesou 5'UTR oblast o délce 207, 225, resp. 272 nukleotidů, a geny *ermB* (Min et al., 2008), *ermC* (Gryczan et al., 1980) a *ermD* (Hue and Bechhofer, 1992) regulované na translační úrovni nesou 5'UTR oblast o délce 259, 141, resp. 354 nukleotidů.

Dále bylo ukázáno, že pro zachování inducibility genové exprese je nezbytné, aby byl v rámci 5'UTR oblasti zachován intaktní krátký otevřený čtecí rámec kódující vedoucí peptid o sekvenci MIN (viz odd. 5.1.3). Pomocí nástroje RBS Calculator (De Novo DNA) je predikováno, že frekvence iniciace translace tohoto uORF je téměř třikrát vyšší než frekvence iniciace translace strukturního ORF *vga_{ALC}* (4671 vs 1740 au). U genových variant *vga_{ALIKE1}* a *vga_{ALIKE2}* (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) je pak tento rozdíl dvojnásobný (2125 vs 1041 au) a u varianty *vga_{AV}* (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) dokonce desetinásobný (3934 vs 363 au). Je možné usuzovat, že čím je translace regulačního čtecího rámce efektivnější, tím je atenuátor k přítomnosti antibiotika senzitivnější (jeho přítomnost detekuje dříve). V souladu s touto hypotézou je, že na přítomnost testovaných LSAP antibiotik odpovídal nejintenzivněji atenuátor *vga_{AV}*, nejméně intenzivně pak atenuátor *vga_{ALIKE}* (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1).

Dalším předpokladem pro regulaci ribozomem zprostředkovanou atenuací je vazba antibiotika do ribozomu. Prostřednictvím Erm 23S rRNA methyltransferasy bylo nepřímě ukázáno, že pro spuštění exprese *vga_{ALC}* není dostačující pouze přítomnost indukujícího

antibiotika uvnitř buňky, ale je nezbytná jeho vazba dovnitř ribozomu (viz odd. 5.1.4). Erm-methylovaný ribozom zabraňuje vazbě makrolidů, linkosamidů a streptograminů B, nikoli však streptograminů A a pleuromutilinů. Zajímavé by tak bylo otestovat, zda si pristinamycin IIA a tiamulin v těchto podmínkách schopnost indukovat expresi *vgaALC* zachovávají.

S využitím programu PASIFIC pro predikci transkripční *cis*-regulace prostřednictvím atenuátoru bylo predikováno, že gen *vgaA* je regulován transkripční atenuací (Dar et al., 2016). *In silico* modelování sekundární struktury mRNA provedené programem RNAfold nicméně ukázalo, že 5'UTR oblast genu nese kromě putativního terminátoru také vlásenku maskující ribozom-vazebné místo rezistenčního genu, díky čemuž nelze vyloučit ani regulaci na translační úrovni. RT-PCR mapování délky transkriptu provedené v rámci této diplomové práce ukázal, že regulace genu *vgaALC* se odehrává na úrovni transkripce (viz odd. 5.2.2). Nelze však vyloučit, že se uplatňuje regulace na obou úrovních, tedy transkripční i translační. Exprese genu by v takovém případě byla tlumena v nepřítomnosti antibiotika terminátorovou vlásenkou i vlásenkou blokující RBS. V přítomnosti antibiotika pak zformovaný SRC rozruší obě tyto struktury a exprese genu je spuštěna. Přítomnost jak terminátoru tak i vlásenky maskující RBS je predikována také u ARE ABCF genu *vmlR* (Ohki et al., 2005). V rámci navazující práce bude regulační role terminátorové vlásenky a vlásenky maskující RBS ověřena pomocí mutagenese.

VgaALC atenuátor odpovídá na linkosamidy, streptograminy A a pleuromutiliny (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1), což jsou antibiotika z hlediska chemické struktury velmi rozdílná, nicméně s překrývajícími se vazebnými místy (Sharkey and O'Neill, 2018). Jedná se o jeden z prvních popsanych atenuátorů odpovídajících na streptograminy a zároveň první popsany atenuátor odpovídající na pleuromutiliny. Indukce streptograminy A (pristinamycinem IIA) byla dříve ukázána u ARE ABCF genu *vmlR*, jehož předpokládaný uORF kóduje vedoucí peptid o stejné sekvenci jako *vgaALC*, tedy MIN (Dar et al., 2016; Ohki et al., 2005). Indukce směsí streptograminů A a B (dalfopristinem/quinupristinem) pak byla ukázána u genu *erm47* kódujícího vedoucí peptid o sekvenci MQIYGGIYHIRLNSSLNQSIN (Guerin et al., 2020). Linkosamidová indukce byla pozorována u více genů pro rezistenční mechanismy různých typů (proteiny ochraňující ribozom, ribozomální methyltransferasy, transportéry) (viz odd. 3.3.1.4). Jejich regulátory se mezi sebou výrazně liší svými uORF, které kódují vedoucí peptidy o zcela rozdílných sekvencích i délkách (tři až padesát tři aminokyseliny). Lze tedy předpokládat, že pro specifické rozpoznávání linkosamidů existuje více mechanismů. Mechanismus LSAP řízeného vzniku SRC nebyl ani u jednoho z popsanych atenuátorů podrobně studován.

Expresa genů *vgaA* (a pravděpodobně i ostatních ARE ABCF genů) je indukována všemi antibiotiky, ke kterým protein udílí rezistenci (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) (a odd. 5.3.2

této diplomové práce). V tomto případě totiž konkrétní antibiotikum není detekováno jen prostřednictvím specifických aminokyselinových motivů vedoucího peptidu, tak jako tomu je mj. u *erm* genů (což je jedním z důvodů, proč jsou tyto geny indukovány pouze malou strukturně uniformní skupinou antibiotik (Vázquez-Laslop et al., 2011b; Weisblum, 1995b)). V případě genů *vgaA* je výsledný indukční profil udáván rezistenční aktivitou proteinu. Ta zpětnovazebně a nepřímou rozhoduje, která LS_{AP} antibiotika budou ve výsledku fungovat jako efektivní induktory a která nikoli. Jedná se o vůbec první popsáný případ, kde rezistenční protein sám určuje antibiotickou specifitu vlastní indukce (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). Lze očekávat, že u ostatních ARE ABCF genů je systém regulace obdobný.

Podstatou doladování specifity indukce pomocí rezistenčního proteinu je, že ARE ABCF protein poskytuje pouze jednorázovou ochranu ribozomu, což znamená, že ribozom musí být při každém dalším kole translace ochráněn znovu. Pokud je přítomno LS_{AP} antibiotikum, ke kterému daná varianta neudílí rezistenci, ribozomy zůstávají antibiotikem blokovány a syntéza rezistenčního proteinu nemůže efektivně probíhat, přestože atenuátor antibiotikum rozpoznává. Pokud je naopak přítomno antibiotikum, ke kterému daná varianta poskytuje rezistenci, může docházet k syntéze tohoto proteinu, neboť ribozom je chráněn (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). Lze předpokládat, že toto prvotní ochránění ribozomu je možné díky bazální hladině rezistenčního proteinu, jenž je udržována v důsledku terminace, která není stoprocentně účinná (což je obvyklá vlastnost podmíněných terminátorů (Chen et al., 2013)). Naopak například u genů *erm* kódujících methyltransferasu, která chrání ribozom trvale, se tento způsob doladování antibiotické specifity indukce uplatnit nemůže.

Dynamická ochrana ribozomu zároveň zajišťuje zpětnovazebnou regulaci negativní ve velmi nízkých koncentracích antibiotika, a pozitivní při vyšších koncentracích. To umožňuje produkci proteinu v množství, které je úměrné množství přítomného antibiotika, což minimalizuje zátěž na fitness buňky. Zpětnovazebné doladování antibiotické specifity indukce zároveň zajišťuje rychlou adaptaci regulačního systému v případě vzniku nové varianty rezistenčního proteinu s odlišným rezistenčním fenotypem. Celý systém je tak nejen velmi efektivní, ale i flexibilní (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1) (a odd. 5.3.2 této diplomové práce).

Mezi koncentrací antibiotika a úrovní genové exprese *vgaALC* je patrná přímá úměra v relativně velkém rozmezí koncentrací antibiotika, proto je možné potenciálně uvažovat biotechnologické využití tohoto systému pro snadnou, rychlou a levnou detekci množství antibiotika ve vzorku. Příkladem konkrétní aplikace může být stanovení množství určitého antibiotika v médiu v průběhu kultivace producenta daného antibiotika. V literatuře byl již

popsán reportérový systém pro vyhledávání translačních inhibitorů, který je založený na atenuaci (konkrétně je využit upravený atenuátor *trp* operonu *E. coli*) (Osterman et al., 2012).

Rezistenční aktivita proteinu je nicméně zodpovědná pouze za finální doladění celého systému regulace. Primárním faktorem determinujícím, že expresi genu budou indukovat LS_{AP} antibiotika, nikoli jiná, je zřejmě charakter vedoucího peptidu, který je kódován uORF (viz odd. 5.4.2). uORF kódující tripeptid spíše rozpozná antibiotika blokující translaci v její časně fázi (LS_{AP}), než antibiotika, která translaci zastavují později (makrolidy). LS_{AP} antibiotika mohou být zároveň ale rozpoznávána i delšími vedoucími peptidy (Koběřská et al., 2021; Reilman et al., 2014) (a odd. 5.4.2 této diplomové práce). To ukazuje, že pro zformování SRC nejsou vyžadovány translační terminační faktory ukončující proteosyntézu, jak by mohla naznačovat velmi malá velikost uORF, která je konzervovaná u několika ARE ABCF (Dar et al., 2016).

V rámci experimentu, ve kterém byl testován vliv sekvence a délky vedoucího peptidu na schopnost detekce vybraných LS_{AP} antibiotik, makrolidů a tetracyklinu, bylo ukázáno (viz odd. 5.4.2), že WT tripeptid MIN se ze všech testovaných variant krátkých uORF jeví jako neoptimalnější varianta právě pro detekci linkosamidů, streptograminů A a pleuromutilinů. V případě prodloužení uORF je pozorovaná indukce LS_{AP} antibiotiky ještě výrazně vyšší než u WT uORF. Jak již bylo uvedeno, může to být následkem většího počtu ribozomů, které jsou na mRNA navázané, a které tak mohou výrazně destabilizovat sekundární uspořádání atenuátoru. Varianty MRQ a MRL slabě reagují pouze na streptograminy A. Důležitost aminokyselinové sekvence pro rozpoznání antibiotika navázaného v ribozomu jednoznačně potvrzuje také varianta atenuátoru s uORF kódujícím tripeptid MGG, který neodpovídá na přítomnost žádného z testovaných antibiotik. Velmi pravděpodobným vysvětlením je, že dva po sobě jdoucí glyciny, které jsou nejmenší kódovanou aminokyselinou, patrně nemají dostatečnou velikost, aby se dostaly do kontaktu s antibiotikem a detekovaly tak jeho přítomnost, případně aby se dostaly do kontaktu s 23S rRNA a způsobily vznik SRC.

Navzdory očekávání vedoucí peptid o sekvenci MRQ není schopen detekovat přítomnost tetracyklinu. Protože vazebné místo tetracyklinu je v oblasti párování tRNA-mRNA (Brodersen et al., 2000; Jenner et al., 2013; Pioletti et al., 2001), lze uvažovat, že jeho rozpoznání není závislé na aminokyselinové sekvenci vedoucího peptidu, ale spíše na nukleotidové sekvenci uORF či na jeho kodonovém složení, resp. kodonových preferencích daného bakteriálního kmenu. Způsob rozpoznání navázaného antibiotika pomocí nukleotidů by byl v principu obdobou způsobu rozpoznání antibiotika pomocí aminokyselin. Kodonové složení pak určuje, jak rychle bude vedoucí peptid syntetizován, a v důsledku toho kolik času budou mít komponenty translační mašinerie zaujmout konformaci, která povede ke vzniku SRC.

Abychom zjistili, zda se některý z těchto mechanismů v rozpoznávání tetracyklinů uplatňuje, bude zapotřebí další podrobné studium tohoto systému.

Všechna výše uvedená zjištění ohledně role uORF v rozpoznávání antibiotik jsou základem navazujícího studia, jehož cílem bude objasnit okolnosti vzniku SRC na *vga_{ALC}* mRNA. Konkrétně bude stanovováno (např. pomocí toeprintingové eseje), v jaké pozici vedoucího peptidu dochází k formování SRC a jakým způsobem je jeho vznik závislý na aminokyselinové sekvenci a délce vedoucího peptidu. Zajímavé bude srovnat pozice SRC indukovaných různými typy antibiotik, a také zda vznik SRC může vyvolat varianta *Vga_{ALTGAG}* sama o sobě, jak naznačila její konstitutivní exprese nezávislá na přítomnosti antibiotika, která byla pozorována v rámci studie (Vimberg et al., 2020 - Příloha 1). Nejdetailejší popis SRC komplexu poskytuje cryo-EM struktura, proto bude cílem ji získat.

Znalost přesného mechanismu formování SRC v přítomnosti LSAP antibiotik umožní navrhnout nové deriváty antibiotik, které schopnost indukovat vznik SRC ztratí. Například u některých semisyntetických derivátů makrolidů stojí za ztrátou schopnosti indukovat vznik SRC na některých uORF rezistenčních genů modifikace či úplná náhrada kladinosy (Vázquez-Laslop et al., 2011b).

V rámci poslední části diplomové práce byla pomocí fluorescenční mikroskopie studována buněčná lokalizace rezistenčního proteinu *Vga_{ALC}* kontrolovaného přirozeným regulátorem u *Staphylococcus aureus* RN4220 (viz odd. 5.5.2). Lokalizace stejného proteinu avšak kontrolovaného umělým regulátorem byla v naší laboratoři zkoumána již dříve v rámci diplomové práce Mgr. Bich Nguyen Thi Ngoc (Nguyen Thi Ngoc, 2018). V tomto případě bylo pozorováno, že protein *Vga_{ALC}* je u většiny buněk za většiny podmínek rozptýlen čistě difuzně. Pouze při expresi rezistenčního proteinu započaté v exponenciální fázi a probíhající při teplotě 25 °C docházelo k tvorbě mnohopočetných ohnisek. Příčinou jejich vzniku však pravděpodobně byla suboptimální teplota, kvůli které se protein shlukoval do nerozpustných tělísek. Genová exprese za stejných podmínek, avšak při teplotě 37 °C k tvorbě ohnisek totiž nevedla. Mimo to byla pozorována také lokalizace v jediném ohnisku kombinovaná s difuzní lokalizací. K té docházelo u části buněk pozorovaných v exponenciální fázi růstu, u kterých byla exprese *vga_{ALC}* započata na začátku kultivace (při 37 °C) (Nguyen Thi Ngoc, 2018).

V předkládané diplomové práci bylo ukázáno (viz odd. 5.5.2), že většina pozorovaných buněk se vyznačuje čistě difuzní lokalizací *Vga_{ALC}*, což je v souladu s dřívějšími výsledky (Nguyen Thi Ngoc, 2018). Buňky s jednopočetnou ohniskovou lokalizací kombinovanou s difuzní lokalizací se v největším počtu vyskytují v případě započetí indukce *vga_{ALC}* linkomycinem o koncentraci 1 až 64 µg/ml na konci exponenciální fáze (linkomycin o

koncentraci 0,25 $\mu\text{g/ml}$ tvorbu ohnisek téměř nevyvolával). V této fázi růstu metabolická aktivita buněk ustává a buňky téměř nerostou, což bylo potvrzeno i během stanovování nárůstu buněk po hodinové kultivaci v přítomnosti a nepřítomnosti antibiotika. V případě absence antibiotika došlo za daný časový interval pouze ke zdvojnásobení buněčné denzity, v případě přidání antibiotika došlo k úplnému zastavení růstu nezávisle na koncentraci. Nabízí se tak vysvětlení, že v buňce v této fázi růstu dochází k redukci počtu aktivních ribozomů a rezistenční proteiny, jejichž funkce je spjata právě s těmito buněčnými komponentami, se v důsledku toho shlukují do útvarů, které jsou pozorovatelné jako ohniska.

V návaznosti na to se nabízí otázka, zda si proteiny tvořící tato ohniska zachovávají svou funkci či nikoli. Pro Vga_{ALC} kontrolovaný arteficiálním regulátorem bylo ukázáno (Nguyen Thi Ngoc, 2018), že protein je lépe lokalizován v jednom ohnisku (ohnisko vykazuje vyšší intenzitu fluorescence) a je méně difuzně rozptýlen v případě kmenů klinických izolátů stafylokoka než v případě laboratorního kmenu. Současně má protein Vga_{ALC} v klinických izolátech lepší rezistenční aktivitu (Nguyen Thi Ngoc, 2018), což by mohlo naznačovat, že si protein lokalizovaný v ohniskách svou funkci zachovává. Dalším pozorováním podporujícím tuto hypotézu je, že protein MsrA po přidavku erythromycinu (antibiotikum, ke kterému protein udílí rezistenci) o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ změnil svou lokalizaci z čistě ohniskové na čistě difuzní (Nguyen Thi Ngoc, 2018). To by mohlo naznačovat, že MsrA proteiny se v odpovědi na antibiotikum vrací na ribozom a svou aktivitu si tedy zachovávají. Avšak u proteinu Vga_{ALC} po přidavku linkomycinu ke změně lokalizace nedocházelo (Nguyen Thi Ngoc, 2018). U těchto dvou experimentů nebylo provedeno opakování, proto nelze vyvozené závěry brát jako konečné. Naopak v případě proteinu pod kontrolou přirozeného regulátoru bylo pozorováno, že se ohniska vyskytují často, nikoli však vždy, u buněk vykazujících zvýšenou expresi rezistenčního genu, což by mohlo naznačovat, že se jedná o inkluzní tělíska vzniklá nadprodukcí proteinu. V takovém případě by se dalo očekávat, že protein zde umístěný svou funkci spíše ztratil. Přesnou podstatu ohniskové lokalizace proteinu Vga_{ALC} tak experimenty z této práce neodhalily. Je nicméně důvodné se domnívat, že se jedná spíše o artefakt, jehož příčinou jsou neoptimální podmínky pro expresi.

V rámci předkládané práce bylo dále pozorováno (viz odd. 5.5.2), že produkce rezistenčního proteinu Vga_{ALC} kontrolovaného přirozeným regulátorem je v rámci populace buněk značně heterogenní – u jednotlivých buněk byla pozorována různá intenzita signálu, a u některých pak výrazná nadprodukce rezistenčního proteinu. Heterogenita v expresi byla pozorována nezávisle na koncentraci antibiotika i na růstové fázi, ve které byla indukce započata. Podstata této heterogenity v genové expresi není jasná. V případě použití

arteficiálního promotoru (Nguyen Thi Ngoc, 2018) byly buňky s výrazně silnější expresí pozorovány také, ale ve výrazně menším počtu. To naznačuje, že se pravděpodobně nejedná o heterogenitu způsobenou případným rozdílným počtem kopií plasmidu u jednotlivých buněk (v obou typech experimentů byl využit stejný vektor pRMC2). V literatuře obdobná pozorování, kdy je atenuátorem kontrolovaný gen exprimován jednotlivými buňkami populace nestejně, popsána nebyla. Je však velmi dobře známo, že bakteriální populace tvořená geneticky uniformními buňkami vykazuje heterogenitu v mnoha fenotypových projevech, od velikosti a tvaru buňky, přes růstovou rychlost a motilitu, až po toleranci k různým stresům včetně antibiotik. Tato do jisté míry náhodná heterogenita je adaptací na fluktuaci podmínek prostředí a umožňuje populaci buněk být připravená na možné budoucí změny (Ackermann, 2015; Evans et al., 2018). Uvedený fenomén sice nevysvětluje přímo heterogenitu v expresi genu *vgaALC* (v tomto případě již stresová situace nastala – buňka se nachází v prostředí s antibiotikem), lze však uvažovat, že stojí za heterogenitou v expresi genů pro transportérové systémy, které dopravují antibiotikum do buňky, čímž ovlivňují citlivost buňky k tomuto antibiotiku. Bylo např. ukázáno, že v kultuře *Salmonella enterica* vykazují jednotlivé buňky výraznou heterogenitu v expresi porinu *ompC*, která je spojena s výraznou heterogenitou v rezistenci ke kanamycinu, který tímto porinem proniká do buňky (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014). Heterogenita ve spouštění exprese genu *vgaALC* tak může být obdobně dána rozdílnou intracelulární hladinou linkomycinu, která je způsobena rozdílnou schopností jednotlivých buněk přijímat toto antibiotikum.

Pokud část populace buněk exprimuje rezistenční gen ve zvýšené míře, nabízí se otázka, zda tyto buňky vykazují vyšší úroveň rezistence ve srovnání s ostatními buňkami populace. Této otázce bychom se rádi věnovali v rámci navazujícího výzkumu. Jednou z možností, jak tuto hypotézu otestovat, je roztrždit buňky se silným a slabým signálem technikou průtokové cytometrie spojené se sortováním buněk a stanovit dynamiku růstu v přítomnosti antibiotika, případně vzájemně porovnat proteomy obou typů buněk.

Téma regulace genové exprese ARE ABCF proteinů a zapojení těchto proteinů do regulačních procesů není zcela jistě ještě vyčerpané a zaslouží si další pozornost. V rámci doktorského studia se plánuje této problematice dále věnovat. Cílem dalšího studia bude mimo jiné objasnit přesný mechanismus formování SRC v přítomnosti LS_{AP} antibiotik a ukázat, do jaké míry se na rozpoznávání těchto antibiotik podílí charakter uORF a do jaké míry rezistenční aktivita proteinu. Mimo to bude dále analyzována předpokládaná regulační role ARE ABCF proteinů, kterou naznačuje chování proteinu VgaAL_{TGAG}. Pozornost bude věnována také přirozené heterogenitě v expresi *vgaALC* v rámci bakteriální populace.

7 SOUHRN

- Regulace exprese genu *vgaALC* je zajišťována 5' koncovou nepřekládanou oblastí mRNA. Pro správné fungování regulátoru je nezbytná přítomnost krátkého uORF kódujícího vedoucí peptid o sekvenci MIN. Podmínkou pro spuštění exprese genu je vazba indukujícího antibiotika do ribozomu. Společně tato pozorování ukazují, že gen *vgaALC* je regulován prostřednictvím r5'UTR elementu typu leader peptid mechanismem zvaným ribozomem zprostředkovaná atenuace.
- Pomocí techniky RT-PCR bylo ukázáno, že v nepřítomnosti antibiotika je transkripce genu předčasně ukončována. Gen *vgaALC* je tedy regulován transkripční atenuací.
- Mutované proteiny Vga_{ALC} s posunutou antibiotickou specificitou posouvají antibiotickou specificitu indukce vlastní genové exprese. Rezistenční protein tedy svou aktivitou zpětnovazebně ovlivňuje vlastní produkci tak, aby k ní docházelo výhradně v přítomnosti antibiotik, ke kterým udílí rezistenci.
- Změna délky či sekvence uORF vede k zásadní změně indukčního profilu atenuátoru v nepřítomnosti rezistenčního proteinu. Tento poznatek bude využit v navazujícím studiu, jehož cílem bude objasnit, do jaké míry je reálně antibiotická specificita indukce genové exprese dána rezistenční aktivitou proteinu a jak velkou roli v ní hraje charakter uORF.
- Pokud jsou buňky *Staphylococcus aureus* kultivovány od počátku v přítomnosti linkomycinu, je v nich protein Vga_{ALC} rozptýlen téměř výhradně čistě difuzně. Zároveň je patrná značná heterogenita v expresi rezistenčního genu v rámci populace.
- Pokud jsou buňky *Staphylococcus aureus* kultivovány v přítomnosti linkomycinu až po dosažení určité denzity, je v nich protein Vga_{ALC} rozptýlen většinou čistě difuzně, méně často částečně ohniskově (jedná se o jedno ohnisko lokalizované v blízkosti membrány). Největší podíl buněk s částečně ohniskovou lokalizací je patrný v případě přidání linkomycinu na konci exponenciální fáze. Zároveň platí, že buňky jedné populace jsou v expresi rezistenčního genu značně heterogenní. Částečně ohnisková lokalizace se vyskytuje u buněk s intenzivnější expresí genu *vgaALC*.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Ackermann, M. (2015).** A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 497–508.
- Alexieva, Z., Duvall, E.J., Ambulos, N.P., Kim, U.J., and Lovett, P.S. (1988).** Chloramphenicol induction of cat-86 requires ribosome stalling at a specific site in the leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 3057–3061.
- Allignet, J., Loncle, V., and El Solh, N. (1992).** Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene* *117*, 45–51.
- Almutairi, M.M., Svetlov, M.S., Hansen, D.A., Khabibullina, N.F., Klepacki, D., Kang, H.Y., Sherman, D.H., Vázquez-Laslop, N., Polikanov, Y.S., and Mankin, A.S. (2017).** Co-produced natural ketolides methymycin and pikromycin inhibit bacterial growth by preventing synthesis of a limited number of proteins. *Nucleic Acids Res.* *45*, 9573–9582.
- Andersson, D.I., and Hughes, D. (2010).** Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 260–271.
- Andersson, D.I., and Levin, B.R. (1999).** The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* *2*, 489–493.
- Arenz, S., Ramu, H., Gupta, P., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., and Wilson, D.N. (2014a).** Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide. *Nat. Commun.* *5*, 1–8.
- Arenz, S., Meydan, S., Starosta, A.L., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., and Wilson, D.N. (2014b).** Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation. *Mol. Cell* *56*, 446–452.
- Arenz, S., Bock, L. V., Graf, M., Innis, C.A., Beckmann, R., Grubmüller, H., Vaiana, A.C., and Wilson, D.N. (2016).** A combined cryo-EM and molecular dynamics approach reveals the mechanism of ErmBL-mediated translation arrest. *Nat. Commun.* *7*, 1–14.
- Beckert, B., Leroy, E.C., Sothiselvam, S., Bock, L. V., Svetlov, M.S., Graf, M., Arenz, S., Abdelshahid, M., Seip, B., Grubmüller, H., et al. (2021).** Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics. *Nat. Commun.* *12*, 1–15.
- Bernhard, K., Schrempf, H., and Goebel, W. (1978).** Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *133*, 897–903.
- Bertrand, K., Korn, L., Lee, F., Platt, T., Squires, C.L., Squires, C., and Yanofsky, C. (1975).** New features of the regulation of the tryptophan operon. *Science* (80-). *189*, 22–26.
- Bischoff, L., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2014).** Molecular basis for the ribosome functioning as an L-tryptophan sensor. *Cell Rep.* *9*, 469–475.
- Boël, G., Smith, P.C., Ning, W., Englander, M.T., Chen, B., Hashem, Y., Testa, A.J., Fischer, J.J., Wieden, H.-J., Frank, J., et al. (2014).** The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 143–151.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000).** The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit. *Cell* *103*, 1143–1154.
- Bryskier, A. (2005).** Lincosamines. In *Antimicrobial Agents*, (ASM Press), pp. 592–603.
- Bulkley, D., Innis, C.A., Blaha, G., and Steitz, T.A. (2010).** Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17158–17163.
- Burgos Zepeda, M.Y., Alessandri, K., Murat, D., El Amri, C., and Dassa, E. (2010).** C-terminal domain of the Uup ATP-binding cassette ATPase is an essential folding domain that binds to DNA. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1804*, 755–761.
- Caetano-Anollés, D., Kim, K.M., Mittenenthal, J.E., and Caetano-Anollés, G. (2011).** Proteome evolution and the metabolic origins of translation and cellular life. *J. Mol. Evol.* *72*, 14–33.
- Carlier, L., Haase, A.S., Burgos Zepeda, M.Y., Dassa, E., and Lequin, O. (2012).** The C-terminal domain of the Uup protein is a DNA-binding coiled coil motif. *J. Struct. Biol.* *180*, 577–584.
- Chancey, S.T., Zähler, D., and Stephens, D.S. (2012).** Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol.* *7*, 959–978.

- Chancey, S.T., Bai, X., Kumar, N., Drabek, E.F., Daugherty, S.C., Colon, T., Ott, S., Sengamalay, N., Sadzewicz, L., Tallon, L.J., et al. (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*, e0116254.
- Chen, B., Boël, G., Hashem, Y., Ning, W., Fei, J., Wang, C., Gonzalez, R.L., Hunt, J.F., and Frank, J. (2014).** EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 152–159.
- Chen, Y.J., Liu, P., Nielsen, A.A.K., Brophy, J.A.N., Clancy, K., Peterson, T., and Voigt, C.A. (2013).** Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nat. Methods* *10*, 659–664.
- Chesneau, O., Ligeret, H., Hosan-Aghaie, N., Morvan, A., and Dassa, E. (2005).** Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the *Vga* proteins of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 973–980.
- Chinali, G., Moureau, P., and Cocito, C. (1984).** The action of virginiamycin M on the acceptor, donor, and catalytic sites of peptidyltransferase. *J. Biol. Chem.* *259*, 9563–9568.
- Chinali, G., Nyssen, E., Di Giambattista, M., and Cocito, C. (1988a).** Action of erythromycin and virginiamycin S on polypeptide synthesis in cell-free systems. *BBA - Gene Struct. Expr.* *951*, 42–52.
- Chinali, G., Nyssen, E., Di Giambattista, M., and Cocito, C. (1988b).** Inhibition of polypeptide synthesis in cell-free systems by virginiamycin S and erythromycin. Evidence for a common mode of action of type B synergimycins and 14-membered macrolides. *BBA - Gene Struct. Expr.* *949*, 71–78.
- Choi, J., Marks, J., Zhang, J., Chen, D.H., Wang, J., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., and Puglisi, J.D. (2020).** Dynamics of the context-specific translation arrest by chloramphenicol and linezolid. *Nat. Chem. Biol.* *16*, 310–317.
- Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E., and Vannuffel, P. (1997).** Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* *39*, 7–13.
- Crowe-McAuliffe, C., Graf, M., Huter, P., Takada, H., Abdelshahid, M., Nováček, J., Murina, V., Atkinson, G.C., Hauryliuk, V., and Wilson, D.N. (2018).** Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 8978–8983.
- Crowe-McAuliffe, C., Murina, V., Turnbull, K.J., Kasari, M., Mohamad, M., Polte, C., Takada, H., Vaitkevicius, K., Johansson, J., Ignatova, Z., et al. (2020).** Structural basis of resistance to lincosamide, streptogramin A, and pleuromutilin antibiotics by ABCF ATPases in Gram-positive pathogens. *BioRxiv* 2020.11.24.396648.
- Dar, D., and Sorek, R. (2017).** Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *36*, 111–117.
- Dar, D., Shamir, M., Mellin, J.R., Koutero, M., Stern-Ginossar, N., Cossart, P., and Sorek, R. (2016).** Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria. *Science* (80-.). *352*, aad9822.
- Davidovich, C., Bashan, A., Auerbach-Nevo, T., Yaggie, R.D., Gontarek, R.R., and Yonath, A. (2007).** Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4291–4296.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008).** Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *72*, 317–364.
- Dean, M., Rzhetsky, A., and Allikmets, R. (2001).** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* *42*, 1007–1017.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., and Courvalin, P. (2007).** Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* *20*, 79–114.
- Dersch, P., Khan, M.A., Mühlen, S., and Görke, B. (2017).** Roles of regulatory RNAs for antibiotic resistance in bacteria and their potential value as novel drug targets. *Front. Microbiol.* *8*, 1–12.
- Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S., and Cate, J.H.D. (2010).** Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17152–17157.
- Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., Joslyn, D.A., and Burkholder, P.R. (1947).** Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* (80-.). *106*, 417.
- Evans, C.R., Fan, Y., Weiss, K., and Ling, J. (2018).** Errors during gene expression: Single-cell heterogeneity,

stress resistance, and microbe-host interactions. *MBio* 9.

Fey, P.D., Endres, J.L., Yajjala, V.K., Widhelm, T.J., Boissy, R.J., Bose, J.L., and Bayles, K.W. (2013). A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *MBio* 4, e00537-12.

Fostier, C.R., Monlezun, L., Ousalem, F., Singh, S., Hunt, J.F., and Boël, G. (2020). ABC-F translation factors: From antibiotic resistance to immune response. *FEBS Lett.* 1873-3468.13984.

Goethe, O., Heuer, A., Ma, X., Wang, Z., and Herzon, S.B. (2019). Antibacterial properties and clinical potential of pleuromutilins. *Nat. Prod. Rep.* 36, 220–247.

Gong, F., and Yanofsky, C. (2002). Instruction of translating ribosome by nascent peptide. *Science* (80-.). 297, 1864–1867.

Grossman, T.H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025387.

Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2006). From ribosome to riboswitch: Control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 329–338.

Gryczan, T.J., Grandi, G., Hahn, J., Grandi, R., and Dubnau, D. (1980). Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance. *Nucleic Acids Res.* 8, 6081–6097.

Guerin, F., Rose, S., Cattoir, V., and Douthwaite, S. (2020). *Helicobacterium kunzii* methyltransferase Erm(47) responsible for MLSB resistance is induced by diverse ribosome-targeting antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 371–378.

Gupta, P., Sothiselvam, S., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S. (2013). Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why erm genes are inducible. *Nat. Commun.* 4, 1–9.

Gupta, P., Liu, B., Klepacki, D., Gupta, V., Schulten, K., Mankin, A.S., and Vázquez-Laslop, N. (2016). Nascent peptide assists the ribosome in recognizing chemically distinct small molecules. *Nat. Chem. Biol.* 12, 153–158.

Gürel, G., Blaha, G., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2009). U2504 Determines the Species Specificity of the A-Site Cleft Antibiotics: The Structures of Tiamulin, Homoharringtonine, and Bruceantin Bound to the Ribosome. *J. Mol. Biol.* 389, 146–156.

Hansen, J.L., Ippolito, J.A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2002). The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* 10, 117–128.

Hansen, J.L., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2003). Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* 330, 1061–1075.

Hardesty, B., Picking, W.D., and Odom, O.W. (1990). The extension of polyphenylalanine and polylysine peptides on *Escherichia coli* ribosomes. *BBA - Gene Struct. Expr.* 1050, 197–202.

Harms, J.M., Schlünzen, F., Fucini, P., Bartels, H., and Yonath, A. (2004). Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalfofpristin and quinupristin. *BMC Biol.* 2, 1–10.

Haroche, J., Allignet, J., Buchrieser, C., and El Solh, N. (2000). Characterization of a variant of vga(A) conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2271–2275.

Hopkins, F.G., and Cole, S.W. (1903). A contribution to the chemistry of proteids. Part II. The constitution of tryptophane, and the action of bacteria upon it. *J. Physiol.* 29, 451–466.

Horinouchi, S., and Weisblum, B. (1980). Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 7079–7083.

Hue, K.K., and Bechhofer, D.H. (1992). Regulation of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene ermD. *J. Bacteriol.* 174, 5860–5868.

Hutchings, M., Truman, A., and Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* 51, 72–80.

Ippolito, J.A., Kanyo, Z.F., Wang, D., Franceschi, F.J., Moore, P.B., Steitz, T.A., and Duffy, E.M. (2008). Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. *J. Med. Chem.* 51, 3353–3356.

Jackson, E.N., and Yanofsky, C. (1973). The region between the operator and first structural gene of the tryptophan operon of *Escherichia coli* may have a regulatory function. *J. Mol. Biol.* 76, 89–101.

Jacquet, E., Girard, J.-M., Ramaen, O., Pamard, O., Lévaïque, H., Betton, J.-M., Dassa, E., and 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.
- Jenner, L., Starosta, A.L., Terry, D.S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S.C., Wilson, D.N., and Yusupova, G. (2013).** Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 3812–3816.
- Johansson, M., Chen, J., Tsai, A., Kornberg, G., and Puglisi, J.D. (2014).** Sequence-dependent elongation dynamics on macrolide-bound ribosomes. *Cell Rep.* *7*, 1534–1546.
- Kannan, K., and Mankin, A.S. (2011).** Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: Species-specific binding and action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1241*, 33–47.
- Kannan, K., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S. (2012).** Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel. *Cell* *151*, 508–520.
- Kannan, K., Kanabar, P., Schryer, D., Florin, T., Oh, E., Bahroos, N., Tenson, T., Weissman, J.S., and Mankin, A.S. (2014).** The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 15958–15963.
- Katz, L., and Ashley, G.W. (2005).** Translation and protein synthesis: Macrolides. *Chem. Rev.* *105*, 499–528.
- Kavanagh, F., Hervey, A., and Robbins, W.J. (1951).** Antibiotic substances from Basidiomycetes: VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* Pilat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *37*, 570–574.
- Kehrenberg, C., and Schwarz, S. (2004).** *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 615–618.
- Kerr, I.D. (2004).** Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 166–173.
- Kerr, I.D., Reynolds, E.D., and Cove, J.H. (2005).** ABC proteins and antibiotic drug resistance: Is it all about transport? *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 1000–1002.
- Khan, S.A., and Novick, R.P. (1983).** Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* *10*, 251–259.
- Kloss, P., Xiong, L., Shinabarger, D.L., and Mankin, A.S. (1999).** Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J. Mol. Biol.* *294*, 93–101.
- Koběrská, M., Veselá, L., Vimberg, V., Lenart, J., Veselá, J., Kameník, Z., Janata, J., and Balíková Novotná, G. (2021).** Beyond self-resistance: ABCF ATPase LmrC is a signal-transducing component of an antibiotic-I driven signaling cascade hastening the onset of lincomycin biosynthesis. *BioRxiv*.
- Krishnan, A., Burroughs, A.M., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2020).** Comprehensive classification of ABC ATPases and their functional radiation in nucleoprotein dynamics and biological conflict systems. *Nucleic Acids Res.* *48*, 10045–10075.
- Leach, K.L., Swaney, S.M., Colca, J.R., McDonald, W.G., Blinn, J.R., Thomasco, L.M.M., Gadwood, R.C., Shinabarger, D., Xiong, L., and Mankin, A.S. (2007).** The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol. Cell* *26*, 393–402.
- Lee, F., and Yanofsky, C. (1977).** Transcription termination at the *trp* operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 4365–4369.
- Lenart, J., Vimberg, V., Veselá, L., Janata, J., and Balíková Novotná, G. (2015).** Detailed mutational analysis of Vga(A) interdomain linker: Implication for antibiotic resistance specificity and mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 1360–1364.
- Lodato, P.B., Rogers, E.J., and Lovett, P.S. (2006).** A variation of the translation attenuation model can explain the inducible regulation of the pBC16 tetracycline resistance gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *188*, 4749–4758.
- Lovett, P.S. (1990).** Translational attenuation as the regulator of inducible *cat* genes. *J. Bacteriol.* *172*, 1–6.
- Lovett, P.S. (1996).** Translation attenuation regulation of chloramphenicol resistance in bacteria - A review. *Gene* *179*, 157–162.
- Lovett, P.S., and Rogers, E.J. (1996).** Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiol. Rev.* *60*, 366–385.
- Lozano, C., Aspiroz, C., Rezusta, A., Gómez-Sanz, E., Simon, C., Gómez, P., Ortega, C., Revillo, M.J., Zarazaga, M., and Torres, C. (2012).** Identification of novel *vga(A)*-carrying plasmids and a Tn5406-like

transposon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* of human and animal origin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 306–312.

Mandin, P., Toledo-Arana, A., Fouquier d'Hérouel, A., and Repoila, F. (2013). RNA-mediated control of bacterial gene expression: Role of regulatory non-coding RNAs. In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 1–36.

Marks, J., Kannan, K., Roncase, E.J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S. (2016). Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12150–12155.

Mast, Y., and Wohlleben, W. (2014). Streptogramins - two are better than one! *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 44–50.

Matsuoka, M., Jánosi, L., Endou, K., and Nakajima, Y. (1999). Cloning and sequences of inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter. *FEMS Microbiol. Lett.* 181, 91–100.

Mayford, M., and Weisblum, B. (1990). The *ermC* leader peptide: Amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *J. Bacteriol.* 172, 3772–3779.

Mendes, R.E., Smith, T.C., Deshpande, L., Diekema, D.J., Sader, H.S., and Jones, R.N. (2011). Plasmid-borne *vga(A)*-encoding gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 recovered from swine and a swine farmer in the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 71, 177–180.

Menninger, J.R., and Coleman, R.A. (1993). Lincosamide antibiotics stimulate dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2027–2029.

Menninger, J.R., and Otto, D.P. (1982). Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21, 811–818.

Millman, A., Dar, D., Shamir, M., and Sorek, R. (2016). Computational prediction of regulatory, premature transcription termination in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 45, 886–893.

Min, Y.-H., Kwon, A.-R., Yoon, E.-J., Shim, M.-J., and Choi, E.-C. (2008). Translational attenuation and mRNA stabilization as mechanisms of *erm(B)* induction by erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1782–1789.

Mojumdar, M., and Khan, S.A. (1988). Characterization of the tetracycline resistance gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 170, 5522–5528.

Monk, I.R., Tree, J.J., Howden, B.P., Stinear, T.P., and Foster, T.J. (2015). Complete bypass of restriction systems for major *Staphylococcus aureus* lineages. *MBio* 6, ePP308-15.

Morosini, M.I., Ayala, J.A., Baquero, F., Martínez, J.L., and Blázquez, J. (2000). Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3137–3143.

Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre, M.S., and Pardesi, K.R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* 10, 539.

Murina, V., Kasari, M., Haurlyuk, V., and Atkinson, G.C. (2018). Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Res.* 46, 3753–3763.

Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinnu, M., Saha, C.K., Grimshaw, J.W., Seki, T., Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., et al. (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.

Murphy, E. (1985). Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 162, 633–640.

Naville, M., and Gautheret, D. (2009). Transcription attenuation in bacteria: Theme and variations. *Briefings Funct. Genomics Proteomics* 8, 482–492.

Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., and Wilson, D.N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.* 395, 559–575.

Nguyen Thi Ngoc, B. (2018). Buněčná lokalizace rezistentních proteinů Vga(A)LC a Msr(A) prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Charles University.

Novotná, G., and 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.

Nunez-Samudio, V., and Chesneau, O. (2013). Functional interplay between the ATP binding cassette Msr(D)

- protein and the membrane facilitator superfamily Mef(E) transporter for macrolide resistance in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* *164*, 226–235.
- Ohki, R., Tateno, K., Takizawa, T., Aiso, T., and Murata, M. (2005).** Transcriptional termination control of a novel ABC transporter gene involved in antibiotic resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *187*, 5946–5954.
- Olano, C., Rodriguez, A.M., Méndez, C., and Salas, J.A. (1995).** A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* *16*, 333–343.
- Osterman, I.A., Prokhorova, I. V., Sysoev, V.O., Boykova, Y. V., Efremenkova, O. V., Svetlov, M.S., Kolb, V.A., Bogdanov, A.A., Sergiev, P. V., and Dontsova, O.A. (2012).** Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 1774–1783.
- Otaka, T., and Kaji, A. (1975).** Release of (oligo)peptidyl tRNA from ribosomes by erythromycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 2649–2652.
- Ousalem, F., Singh, S., Chesneau, O., Hunt, J.F., and Boël, G. (2019).** ABC-F proteins in mRNA translation and antibiotic resistance. *Res. Microbiol.* *170*, 435–447.
- Palva, A., Vidgren, G., Simonen, M., Rintala, H., and Laamanen, P. (1990).** Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pBC16 from *Bacillus cereus*. *Nucleic Acids Res.* *18*, 1635.
- Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., et al. (2001).** Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* *20*, 1829–1839.
- Poulsen, S.M., Kofoed, C., and Vester, B. (2000).** Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *J. Mol. Biol.* *304*, 471–481.
- Qin, X., Poon, B., Kwong, J., Niles, D., Schmidt, B.Z., Rajagopal, L., and Gantt, S. (2011).** Two paediatric cases of skin and soft-tissue infections due to clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a plasmid-encoded vga(A) allelic variant for a putative efflux pump. *Int. J. Antimicrob. Agents* *38*, 81–83.
- Ramu, H., Mankin, A., and Vázquez-Laslop, N. (2009).** Programmed drug-dependent ribosome stalling. *Mol. Microbiol.* *71*, 811–824.
- Ramu, H., Vázquez-Laslop, N., Klepacki, D., Dai, Q., Piccirilli, J., Micura, R., and Mankin, A.S. (2011).** Nascent peptide in the ribosome exit tunnel affects functional properties of the A-site of the peptidyl transferase center. *Mol. Cell* *41*, 321–330.
- Rees, D.C., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009).** ABC transporters: The power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 218–227.
- Reilman, E., Mars, R.A.T., van Dijl, J.M., and Denham, E.L. (2014).** The multidrug ABC transporter BmrC/BmrD of *Bacillus subtilis* is regulated via a ribosome-mediated transcriptional attenuation mechanism. *Nucleic Acids Res.* *42*, 11393–11407.
- Reynolds, E.D., Ross, J.I., and Cove, J.H. (2003).** Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: Incomplete transporters? *Int. J. Antimicrob. Agents* *22*, 228–236.
- Rice, L.B. (2008).** Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J. Infect. Dis.* *197*, 1079–1081.
- Rogers, E.J., and Lovett, P.S. (1990).** Erythromycin induces expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene cat-86. *J. Bacteriol.* *172*, 4694–4695.
- Romby, P., and Charpentier, E. (2010).** An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 217–237.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., and Wootton, J.C. (1990).** Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* *4*, 1207–1214.
- Sánchez-Romero, M.A., and Casadesús, J. (2014).** Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 355–360.
- Sandler, P., and Weisblum, B. (1988).** Erythromycin-induced stabilization of ermA messenger RNA in *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* *203*, 905–915.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., and Franceschi, F. (2001).** Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* *413*, 814–821.
- Schlünzen, F., Pyetan, E., Fucini, P., Yonath, A., and Harms, J.M. (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.

Schwarz, S., Cardoso, M., and Wegener, H.C. (1992). Nucleotide sequence and phylogeny of the tet(L) tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *36*, 580–588.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* *28*, 519–542.

Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Brenner Michael, G., Febler, A.T., and Vester, B. (2016). Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: Mode of action and mechanisms of resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *6*, a027037.

Sharkey, L.K.R., and O'Neill, A.J. (2018). Antibiotic resistance ABC-F proteins: Bringing target protection into the limelight. *ACS Infect. Dis.* *4*, 239–246.

Sharkey, L.K.R., Edwards, T.A., and O'Neill, A.J. (2016). ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *MBio* *7*, e01975-15.

Shcherbo, D., Shemiakina, I.I., Ryabova, A. V., Luker, K.E., Schmidt, B.T., Souslova, E.A., Gorodnicheva, T. V., Strukova, L., Shidlovskiy, K.M., Britanova, O. V., et al. (2010). Near-infrared fluorescent proteins. *Nat. Methods* *7*, 827–829.

Shivakumar, A.G., Hahn, J., Grandi, G., Kozlov, Y.I., and Dubnau, D. (1980). Posttranscriptional regulation of an erythromycin resistance protein specified by plasmic pE194. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 3903–3907.

Singh, K. V, Malathum, K., and Murray, B.E. (2001). Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 263–266.

Sothiselvam, S., Liu, B., Han, W., Ramu, H., Klepacki, D., Atkinson, G.C., Brauer, A., Remm, M., Tenson, T., Schulten, K., et al. (2014). Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 9804–9809.

Sothiselvam, S., Neuner, S., Rigger, L., Klepacki, D., Micura, R., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S. (2016). Binding of macrolide antibiotics leads to ribosomal selection against specific substrates based on their charge and size. *Cell Rep.* *16*, 1789–1799.

Spížek, J., and Řezanka, T. (2017). Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem. Pharmacol.* *133*, 20–28.

Starosta, A.L., Karpenko, V. V, Shishkina, A. V, Mikolajka, A., Sumbatyan, N. V, Schluenzen, F., Korshunova, G.A., Bogdanov, A.A., and Wilson, D.N. (2010). Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition. *Chem. Biol.* *17*, 504–514.

Stokes, H.W., and Hall, R.M. (1991). Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation. *Plasmid* *26*, 10–19.

Su, W., Kumar, V., Ding, Y., Ero, R., Serra, A., Lee, B.S.T., Wong, A.S.W., Shi, J., Sze, S.K., Yang, L., et al. (2018). Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 5157–5162.

Su, Y.A., He, P., and Clewell, D.B. (1992). Characterization of the tet(M) determinant of Tn916: Evidence for regulation by transcription attenuation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *36*, 769–778.

Tenson, T., Lovmar, M., and 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.

Tessé, S., Trueba, F., Berthet, N., Hot, C., and Chesneau, O. (2013). Resistance genes underlying the LSA phenotype of staphylococcal isolates from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 4543–4546.

Theis, T., Skurray, R.A., and Brown, M.H. (2007). Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* *70*, 355–362.

Thomas, C., and Tampé, R. (2020). Structural and mechanistic principles of ABC transporters. *Annu. Rev. Biochem.* *89*, 605–636.

Torres, C., Galián, C., Freiberg, C., Fantino, J.-R., and Jault, J.-M. (2009). The YheI/YheH heterodimer from *Bacillus subtilis* is a multidrug ABC transporter. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 615–622.

Trudel, M., Springer, M., Graffe, M., Fayat, G., Blanquet, S., and Grunberg-Manago, M. (1984). Regulation of *E. coli* phenylalanyl-tRNA synthetase operon in vivo. *BBA - Gene Struct. Expr.* *782*, 10–17.

- Tu, D., Blaha, G., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2005).** Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell* *121*, 257–270.
- Vázquez-Laslop, N., Thum, C., and Mankin, A.S. (2008).** Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling. *Mol. Cell* *30*, 190–202.
- Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., and Mankin, A.S. (2010).** The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide. *EMBO J.* *29*, 3108–3117.
- Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., and Mankin, A.S. (2011a).** Nascent peptide-mediated ribosome stalling promoted by antibiotics (Vienna: Springer Vienna).
- Vázquez-Laslop, N., Klepacki, D., Mulhearn, D.C., Ramu, H., Krasnykh, O., Franzblau, S., and Mankin, A.S. (2011b).** Role of antibiotic ligand in nascent peptide-dependent ribosome stalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10496–10501.
- Vimberg, V., Cavanagh, J.P., Novotná, M., Lenart, J., Nguyen Thi Ngoc, B., Veselá, J., Pain, M., Koběřská, M., and Balíková Novotná, G. (2020).** Ribosome-mediated attenuation of *vga(A)* expression is shaped by the antibiotic resistance specificity of Vga(A) protein variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* *64*, e00666-20.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982).** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* *1*, 945–951.
- Wang, Y., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (2004).** Regulation of a bacteroides operon that controls excision and transfer of the conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* *186*, 2548–2557.
- Wang, Y., Rotman, E.R., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (2005).** Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* *187*, 2673–2680.
- Weisblum, B. (1995a).** Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 797–805.
- Weisblum, B. (1995b).** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 577–585.
- Wilson, D.N. (2009).** The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *44*, 393–433.
- Wilson, D.N. (2011).** On the specificity of antibiotics targeting the large ribosomal subunit. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1241*, 1–16.
- Wilson, D.N. (2014).** Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 35–48.
- Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A.L., Connell, S.R., and Fucini, P. (2008).** The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 13339–13344.
- Wilson, D.N., Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., and O’Neill, A.J. (2020).** Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–12.
- World Health Organisation (2020). Antibiotic resistance fact sheet.
- Wu, T.H., Wood, D.L., Stein, P.L., and Comer, M.M. (1984).** Transcription of a gene cluster coding for two aminoacyl-tRNA synthetases and an initiation factor in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *173*, 177–209.
- Yang, B., Lei, Z., Zhao, Y., Ahmed, S., Wang, C., Zhang, S., Fu, S., Cao, J., and Qiu, Y. (2017).** Combination susceptibility testing of common antimicrobials in vitro and the effects of sub-MIC of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Front. Microbiol.* *8*, 2125.
- Zhang, Y., Werling, U., and Edelmann, W. (2012).** SLiCE: A novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res.* *40*, e55.
- Zhu, Y., Wang, C., Schwarz, S., Liu, W., Yang, Q., Luan, T., Wang, L., Liu, S., and Zhang, W. (2020).** Identification of a novel tetracycline resistance gene, *tet* (63), located on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1–6.



Ribosome-Mediated Attenuation of *vga(A)* Expression Is Shaped by the Antibiotic Resistance Specificity of *Vga(A)* Protein Variants

Vladimir Vimberg,^a Jorunn Pauline Cavanagh,^{b,c} Michaela Novotna,^a Jakub Lenart,^{a,d} Bich Nguyen Thi Ngoc,^a Jana Vesela,^a Maria Pain,^c Marketa Koberska,^a Gabriela Balikova Novotna^a

^aInstitute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Vestec, Czech Republic

^bDepartment of Pediatrics, University Hospital of North Norway, Tromsø, Norway

^cDepartment of Clinical Medicine, UiT–The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway

^dDepartment of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

ABSTRACT *Vga(A)* protein variants confer different levels of resistance to lincosamides, streptogramin A, and pleuromutilins (LS_AP) by displacing antibiotics from the ribosome. Here, we show that expression of *vga(A)* variants from *Staphylococcus haemolyticus* is regulated by *cis*-regulatory RNA in response to the LS_AP antibiotics by the mechanism of ribosome-mediated attenuation. The specificity of induction depends on *Vga(A)*-mediated resistance rather than on the sequence of the riboregulator. Fine tuning between *Vga(A)* activity and its expression in response to the antibiotics may contribute to the selection of more potent *Vga(A)* variants because newly acquired mutation can be immediately phenotypically manifested.

KEYWORDS ABCF proteins, *Staphylococcus haemolyticus*, *Vga(A)*, antibiotic resistance, clindamycin, lincosamides, pleuromutilins, regulation of gene expression, ribosome-mediated attenuation

The expression of antibiotic resistance genes is commonly activated in response to ribosome-targeting antibiotics by ribosome-mediated attenuation (1). In the absence of antibiotic, the secondary structure of the 5' untranslated RNA (5' UTR) inhibits the expression of the resistance gene by either masking the ribosome binding site (RBS) or by generating a premature transcriptional terminator. Upon antibiotic binding, the ribosomes stall during translating at a short upstream regulatory open reading frame (uORF), which disrupts the formation of the inhibitory 5' UTR structure, thus releasing the gene repression (1). The ability of an attenuator to sense the expression of a respective resistance gene and the antibiotic specificity of the protein together determine the overall resistance phenotype. Therefore, it is of great importance to understand the molecular mechanisms behind the specificity of antibiotic-driven expression of resistance determinants.

Antibiotic resistance proteins of the ATP binding cassette F (ARE-ABCF) family collectively confer resistance to antibiotics targeting the ribosomal peptidyl transferase center (PTC) by the ribosome protection mechanism (reviewed in references 2–5). At least seven phylogenetic lineages of ARE-ABCF are widely distributed, namely in the genomes of *Firmicutes* (AREs 1 to 3, 6, and 7) and *Actinobacteria* (AREs 4 and 5) species (6). Antibiotic resistance phenotypes of characterized ARE-ABCFs correspond to the spatial overlap in antibiotic binding sites (2, 4), namely, proteins *Vga*, *Lsa*, *Sal*, *VmlR*, and *Lmo0919* confer resistance to lincosamides, streptogramin A, and pleuromutilins (LS_AP), while *Msr* proteins confer resistance to macrolides, ketolides, and streptogramin B (MKS_B), and proteins *OprA* and *PoxTA* mediate resistance to phenicols and oxazolidinones (PhO).

Citation Vimberg V, Cavanagh JP, Novotna M, Lenart J, Nguyen Thi Ngoc B, Vesela J, Pain M, Koberska M, Balikova Novotna G. 2020.

Ribosome-mediated attenuation of *vga(A)* expression is shaped by the antibiotic resistance specificity of *Vga(A)* protein variants. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00666-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00666-20>.

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Gabriela Balikova Novotna, gnovotna@biomed.cas.cz.

Received 7 April 2020

Returned for modification 1 May 2020

Accepted 10 August 2020

Accepted manuscript posted online 17 August 2020

Published 20 October 2020

Vga(A) is one of the best-studied ARE-ABCFs (7–11). Naturally occurring Vga(A) variants confer different levels of resistance to LS_AP antibiotics in staphylococci (9, 12–18). Among human isolates, the incidence of *vga(A)* is usually low in *Staphylococcus aureus* (19–21), while it is more common in *Staphylococcus haemolyticus*, where it is often combined with *msr(A)*, which encodes the macrolide-streptogramin B resistance protein of the same ARE1 subfamily (9, 22). A considerably higher incidence of *vga(A)* and related *vga* resistance genes (up to 33%) are present in *S. aureus* isolates of animal origin (18, 23–25), where they have spread in response to extensive usage of pleuromutins in food-producing animals (26). In connection with the recent approval of lefamulin, the first systemic pleuromutinin in human medicine, *vga* resistance genes may also spread rapidly among *S. aureus* strains of human origin in the future.

According to the current model of the ARE-ABCF-mediated ribosome protection mechanism (3–5), Vga(A) binds the exit site (E site for uncharged tRNA) of the ribosome and displaces the antibiotic by a linker connecting the two nucleotide binding domains (NBD). The linker is also termed the antibiotic resistance domain (ARD) (27), since it is essential for resistance (11). The variable stretch of 15 amino acids in the ARD determines the antibiotic specificity of Vga(A) variants (9, 10). Although it has been suggested that *vga(A)* expression is regulated by ribosome-mediated attenuation of transcription (28), the mechanism was not experimentally proven. Moreover, how antibiotics differentially induce the expression of *vga(A)* variants with the different antibiotic specificity is an open question.

Here, we investigated the resistance phenotype and expression profile of *vga(A)* variants in clinical and commensal isolates of *Staphylococcus haemolyticus* (22, 29), and we further dissected how the expression of different *vga(A)* variants is regulated in response to different antibiotics.

RESULTS

Naturally occurring *vga(A)* variants are expressed differentially in response to clindamycin. A search for *vga(A)* in 182 previously whole-genome sequenced *S. haemolyticus* strains (22, 30) revealed five different protein variants in 23 strains (Fig. 1A; see also Table S3 in the supplemental material). Vga(A)_{LC} present in 17 strains was described previously (9); one Vga(A)_V variant present in one strain differed from the previously described Vga(A)_V (31) by a P(12)H substitution. Three protein variants, Vga(A)_{NEW} (in two strains), Vga(A)_{LIKE1} (in two strains), and Vga(A)_{LIKE2} (in one strain), where the last two differ by the V(165)I substitution, are identified here for the first time (Fig. 1A). Despite each Vga(A) variant having a unique combination of seven amino acids in the 15-amino-acid-long region of the linker crucial for antibiotic specificity (Fig. 1A) (10), 18 out of 23 strains were resistant to lincomycin (lincosamide), pristinamycin IIA (streptogramin A), and tiamulin (pleuromutinin). The Vga(A) variants only differed in resistance to the lincosamide clindamycin (see Table S4 in the supplemental material). All but two clindamycin-resistant strains (SH5 and SH20) harbored *vga(A)*_{LC}, which is consistent with the previously reported specificity of this variant (9). In the two clindamycin-resistant strains (SH20 and SH5) without *vga(A)*_{LC}, the clindamycin resistance could be explained by the presence of *erm(A)* and *Inu(A)*, encoding a 23S rRNA methyltransferase and a lincosamide nucleotidyltransferase, respectively. Thus, we conclude that the *vga(A)*_{LC} variant confers resistance to clindamycin in the analyzed *S. haemolyticus* isolates, as all strains apart from SH5 and SH20 did not harbor any additional resistance genes that could explain the observed clindamycin resistance.

Expression analysis of *vga(A)* in response to the subinhibitory concentration of antibiotics in 14 strains revealed that in most cases, *vga(A)* was expressed only after exposure to LS_AP antibiotics, and that the *vga(A)* expression profile of all but two tested strains (SH31 and SH20) correlated with the resistance phenotype (Fig. 1B; see also Fig. S2 and S4 in the supplemental material). Clindamycin, in particular, induced the expression of *vga(A)*_{LC} in strains that were clindamycin resistant, while in four *vga(A)*_{LC}-positive but clindamycin-susceptible strains, the expression of *vga(A)*_{LC} was not detected upon clindamycin induction (Fig. 1B). Strains in which the resistance pheno-

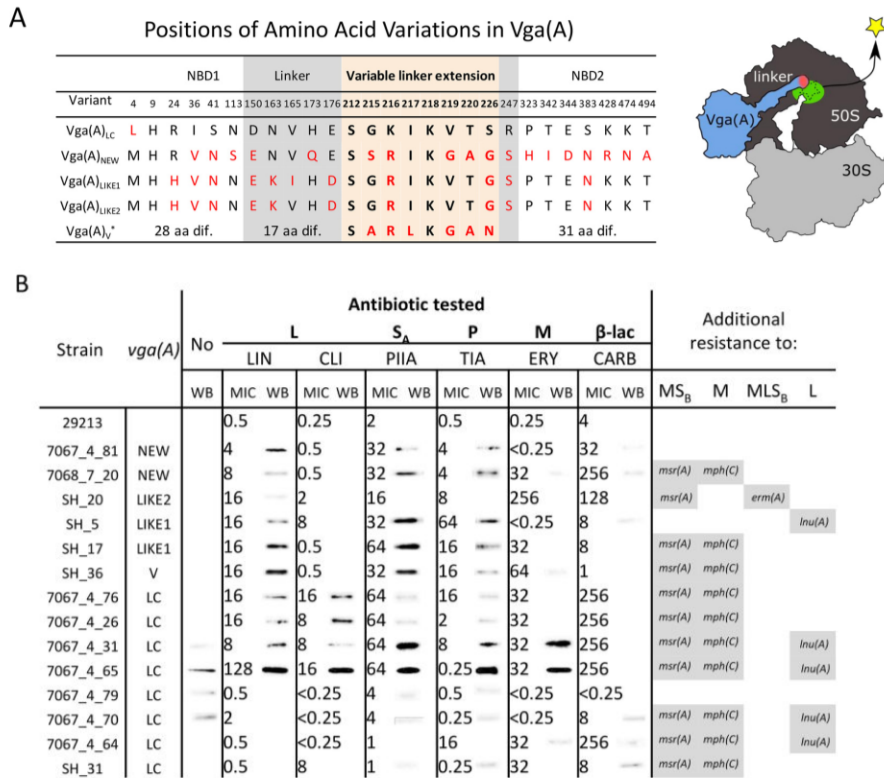


FIG 1 Vga(A) variants differ in their expression profiles in response to antibiotics in *S. haemolyticus*. (A) Differences in amino acid sequences of Vga(A) variants among *Staphylococcus haemolyticus* strains. Only positions of amino acid variations are shown. Amino acid variations from Vga(A)_{LC} are shown in red; variations within a 15-amino-acid-long linker stretch that was proven to affect resistance specificity are highlighted by the pink background. Model of Vga(A) binding to the ribosome showing the position of the variable region at the Vga(A) linker. (B) MICs of lincomycin (LIN), clindamycin (CLI), erythromycin (ERY), pristinamycin IIA (PIIA), tiamulin (TIA), and carbenicillin (CARB) for *S. haemolyticus* strains with *vga(A)* variants, and Western blots (WBs) showing Vga(A) production in response to the subinhibitory concentration of respective antibiotic. Representative WBs of at least two independent experiments each are shown. All WBs are shown in Fig. S1 in the supplemental material. Full WBs of seven representative strains together with loading WB control are shown in Fig. S2 in the supplemental material, and the growth of these strains in the presence of antibiotics is shown in Fig. S3. Additional macrolide (M), lincosamide (L), streptogramin B (S_B) resistance determinants identified in the genomes of tested strains are shown on the right.

type did not correlate with the *vga(A)* expression profile (Fig. 1B) include strain SH31, in which *vga(A)_{LC}* expression was not detected upon induction of clindamycin despite phenotypic clindamycin resistance, and strain SH20, in which antibiotic-induced expression of *vga(A)_{LIKE2}* seems to be suppressed due to the presence of *ermA*. As ErmA renders ribosomes resistant to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics (see Fig. S1B in the supplemental material), our observation indicates that the ribosome-mediated attenuation mechanism regulates *vga(A)* expression.

***vga(A)* expression is regulated by the mechanism of ribosome-mediated attenuation.** Next, we addressed the mechanism of regulation of *vga(A)* expression. It was experimentally proven that two homologs of *vga(A)*, *lmo0919* and *vmI(R)* from *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*, respectively, are regulated by ribosome-mediated attenuation of transcription in response to lincosamides (28, 32). Simultaneously, it was shown that despite the nucleotide sequence of the upstream regulatory region of *vga(A)* and *lmo0919* homologs diverging significantly, the position and size of a 3-amino-acid uORF are conserved across large evolutionary distances; therefore, the

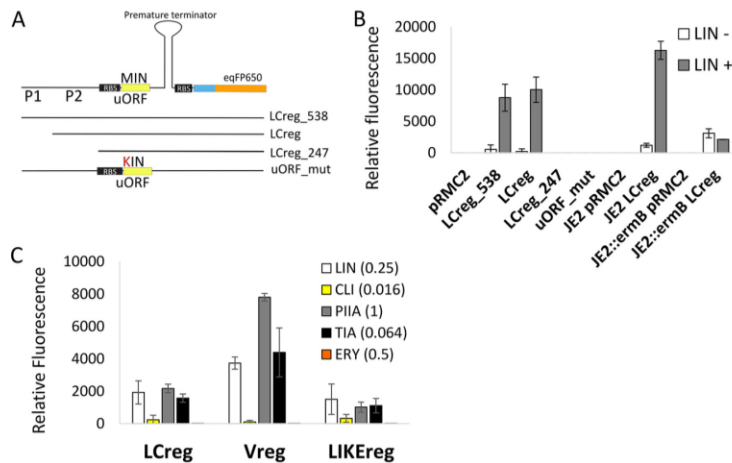


FIG 2 Expression of *vga(A)* is regulated by a ribosome-mediated attenuation mechanism. (A) Testing the activity of transcriptional attenuator encoded upstream of *vga(A)_{LC}* using fluorescent reporter fusion. Graphical overview of reporter constructs encompassing 538, 375, and 247 nucleotides upstream of the *vga(A)_{LC}*, including predicted promoters P1 and P2 and the first 19 codons fused to eqFP650 fluorescent protein and LCreg_538 construct in which the start codon ATG of the predicted upstream regulatory open reading frame (uORF), was mutated to AAG (uORF_mut). (B) Relative fluorescence intensity of eqFP650 reporter constructs LCreg_538, LCreg, LCreg_247, and uORF_mut expressed in *S. aureus* RN4220 in the absence or the presence of lincomycin (LIN, 0.25 mg/liter) and LCreg reporter construct expressed in *S. aureus* JE2 without or with constitutively expressed *ermB*, inserted in the genome. ErmB prevents the binding of lincomycin to the ribosome. (C) Relative fluorescence intensity of *S. aureus* RN4220 expressing eqFP650 fluorescent protein under the control of *vga(A)_{LC}* (LCreg), *vga(A)_V* (Vreg), or *vga(A)_{LIKE}* (LIKereg) 5' UTRs in response to lincomycin (LIN), clindamycin (CLI), pristinamycin IIA (PIIA), tiamulin (TIA), and erythromycin (ERY) at an antibiotic concentration which corresponded to the maximum level of induction. (B, C) Averages and standard deviations of three independent measurements are shown. The alignment of 5' UTRs and secondary structure predictions are shown in Fig. S5 in the supplemental material. The full range of antibiotic concentrations and corresponding fluorescence levels are shown in Fig. S6a. The growth of *S. aureus* RN4220 in the presence of antibiotics is shown in Fig. S6b.

same mechanism for their regulation has been suggested (28). To validate the attenuation mechanism of *vga(A)* regulation, regions 538, 375, and 247 nucleotides upstream of *vga(A)_{LC}*, together with the first 19 codons of *vga(A)_{LC}*, were translationally fused with the red fluorescent protein eqFP650 (33), leading to plasmids LCreg_538, LCreg, and LCreg_247, respectively. Also, a mutation of the uORF (MIN) start codon (ATG to AAG) in the LCreg_538 construct leading to plasmid uORF_mut was generated (Fig. 2A). Relative fluorescence in response to the subinhibitory concentration of lincomycin (0.25 mg/liter) of *S. aureus* carrying reporter constructs showed that expression of eqFP650 was induced only in strains with LCreg_538 and LCreg plasmids (Fig. 2B). The signal was not detected in LCreg_247, which does not contain the predicted promoter or the uORF_mut-lacking start codon. These results indicate that *vga(A)* is transcribed together with its leader sequence and that an intact uORF is required for induction. In addition, induction of eqFP650 was also abolished when the LCreg fusion construct was coexpressed with the constitutively expressed ErmB 23S rRNA methyltransferase (34), which prevents binding of lincomycin to ribosomes and thus the formation of stalled ribosome complex (Fig. 2B). Together, our results imply that *vga(A)* expression is regulated by a ribosome-mediated attenuation mechanism in response to ribosome-bound lincomycin.

The sequence of the 5' UTR does not determine the antibiotic specificity of *vga(A)* induction. Sequence and secondary structure analysis of 5' UTRs showed that a putative regulatory region of all *vga(A)* variants is homologous with predicted terminator and antiterminator structures and identical short uORFs coding for the 3-amino-acid peptide MIN; however, each variant has its unique 5' UTR sequence

differing in 4 to 36 nucleotides (see Fig. S5 in the supplemental material). To identify whether this polymorphism could be responsible for a different expression of *vga(A)* variants in response to antibiotics in *S. haemolyticus*, we compared the expression of eqFP650 fused with 375, 374, and 458 upstream regions of *vga(A)*_{LC}, *vga(A)*_{LIKE1}, and *vga(A)*_V, respectively (plasmids LCreg, LIKEreg, and Vreg expressed in RN4220), after exposure to a range of lincomycin, clindamycin, pristinamycin IIA, tiamulin, and erythromycin concentrations. All tested *vga(A)* 5'-UTR reporters reached the maximal eqFP650 fluorescence in the presence of lincomycin, clindamycin, pristinamycin IIA, and tiamulin at an antibiotic concentration close to MIC₅₀ for susceptible strains (Fig. 2C; see also Table S6 and Fig. S6 in the supplemental material). In contrast, erythromycin did not induce expression of eqFP650 (Fig. 2C and Fig. S6). However, the total level of fluorescence among antibiotics differed. Clindamycin was the weakest inducer of eqFP650 expression, independent of 5' UTRs of *vga(A)*_{LC} or other 5'-UTR variants, leaving unexplained the observation that *vga(A)*_{LC} but not other *vga(A)* variants, was induced by exposure to clindamycin in *S. haemolyticus*.

The specificity of *vga(A)* expression is shaped according to the antibiotic specificity of *Vga(A)* variants. Since the polymorphism of 5' UTRs did not explain differences in *vga(A)* expression in response to clindamycin, we hypothesized that the *Vga(A)* protein itself might determine the specificity of its expression. To test this hypothesis, we investigated the expression of the LCreg reporter in the presence of constitutively produced *Vga(A)* mutants. The mutants differed in only five amino acids in the middle of the inter-NBD linker (amino acid positions 212, 218, 219, 220, and 226; see Table S5 in the supplemental material) but exhibited different abilities to confer resistance to lincosamides (10). The experiment was done as described previously; however, a wider range of antibiotic concentrations reflecting resistance of *S. aureus* RN4220 expressing *vga(A)* was tested (Fig. 3A).

As shown in Fig. 3A, the expression of fluorescent reporters LCreg and Vreg in response to antibiotics was substantially improved when they were coexpressed with *Vga(A)*. Moreover, the expression of the reporters correlated with the level of resistance conferred by a particular *Vga(A)* mutant (Fig. 3A), indicating that *Vga(A)* drives the antibiotic specificity of its induction. However, coexpression of the 5' UTR regulatory regions with *Vga(A)* mutants expressed constitutively in *trans* may not reflect the situation in clinical isolates, where the presence of antibiotics fine tunes the expression of *Vga(A)*. Therefore, we fused LCreg with full-length *vga(A)*_{LC} and eqFP650 to create LCreg-*vga(A)*_{LC}-eqFP650 translation fusion construct, and we compared its expression in RN4220 with that in strains in which LCreg was expressed alone or in combination with constitutive *vga(A)*_{LC} (see Fig. S7 in the supplemental material). Similarly, as in the previous experiment, the induction pattern of LCreg-*vga(A)*_{LC}-eqFP650 corresponded to the specificity of *Vga(A)*_{LC} but it was even more efficient in terms of both the level of induction (Fig. S7A) and the conferred resistance (Fig. S7B). Collectively, these results demonstrate that *Vga(A)* indeed shapes the specificity of its expression in response to antibiotics.

The resistance activity of *Vga(A)* is the main factor affecting the specificity of the *vga(A)* induction. There are two possibilities for how *Vga(A)* can affect the specificity of self-induction. The first is that ribosome protection by *Vga(A)* allows growth at higher antibiotic concentrations, which results in higher *vga(A)* expression. However, the observation that the ATP hydrolysis-deficient *Vga(A)*_{LC}EQ2 mutant inhibits transpeptidation *in vitro* (11) suggests that *Vga(A)* can by itself induce ribosome stalling. Therefore, the second possibility is that the *Vga(A)* protein can be directly involved in the induction. To find out whether *Vga(A)* contributes to the activation of its expression, we evaluated an LCreg reporter in the presence of ATPase-deficient *Vga(A)*_{LC}EQ2 or functional *Vga(A)* variants in the absence or the presence of antibiotics. At subinhibitory concentrations of lincomycin (0.25 mg/liter) and pristinamycin IIA (0.25 mg/liter), the fluorescence of the reporter was significantly higher in the absence than in the presence of functional *Vga(A)* (Fig. 3B). In contrast, the presence of *Vga(A)*_{LC}EQ2, which does not confer resistance (see Table S6 and Fig. S9 in the

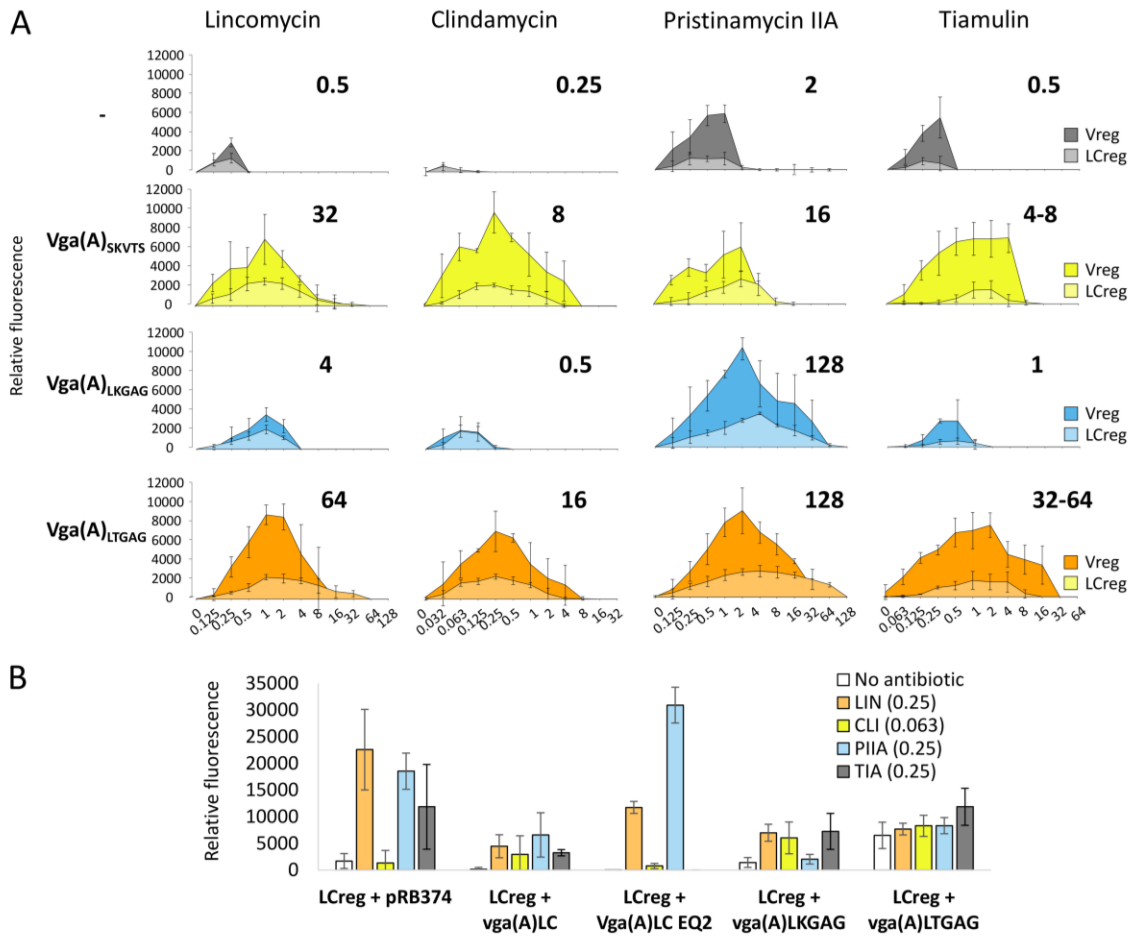


FIG 3 Expression of *vga(A)* in response to antibiotics is shaped by the resistance activity of *Vga(A)*. (A) Effect of constitutive expression of mutated *vga(A)* (10) with different specificity of resistance to lincosamides, streptogramin A, and pleuromutilins on the expression of eqFP650 reporter under the control of the *vga(A)_{LC}* 5' UTR (LCreg) in *S. aureus* RN4220. Relative fluorescence intensity of cells grown in the presence of different concentrations of lincomycin (LIN), clindamycin (CLI), pristinamycin IIA (PIIA), and tiamulin (TIA) overnight in 96-well plates are shown. MIC values of *S. aureus* RN4220 expressing different *Vga(A)* mutants are indicated above each graph. (B) Comparison of the activity of LCreg reporter in the absence or the presence of a subinhibitory concentration of LIN, CLI, PIIA, or TIA in *S. aureus* RN4220 expressing active *Vga(A)*, *Vga(A)_{LC}*, *Vga(A)_{LKGAG}*, *Vga(A)_{LTGAG}*, or ATPase-deficient *Vga(A)_{LC}EQ2* forms. Fluorescence intensity of cells grown in 3-ml cultures in the absence or the presence of antibiotics until an optical density of 1 is reached is shown. (A, B) Averages and standard deviations of three independent measurements are shown. The constitutive production of all *Vga(A)* variants was checked by Western blot analysis (see Fig. S8 in the supplemental material). Growth of RN4220 expressing different *Vga(A)* variants in the presence of antibiotics is shown in Fig. S9. Fig. S10 shows that the expression of *vga(A)_{LC}EQ2* does not inhibit the growth of RN4220.

supplemental material), resulted in a similar induction pattern as that of LCreg expressed alone (Fig. 3B). The exception was tiamulin, which did not induce expression in the presence of *Vga(A)_{LC}EQ2* because tiamulin substantially inhibited the growth of the respective strain (Fig. S9B). These observations suggest that active *Vga(A)* variants at low concentrations of antibiotics clear the antibiotic from the ribosome, thereby reducing reporter expression in a feedback manner. Contrary to our expectations, *Vga(A)_{LTGAG}*, but not *Vga(A)_{LC}EQ2*, activated LCreg reporter expression in the absence of antibiotics (Fig. 3B). This indicates that only this *Vga(A)* variant can induce reporter expression similarly to an antibiotic. Taken together, our results suggest that the induction of *vga(A)* expression is predominantly fine-tuned indirectly through the resistance activity of *Vga(A)* variants.

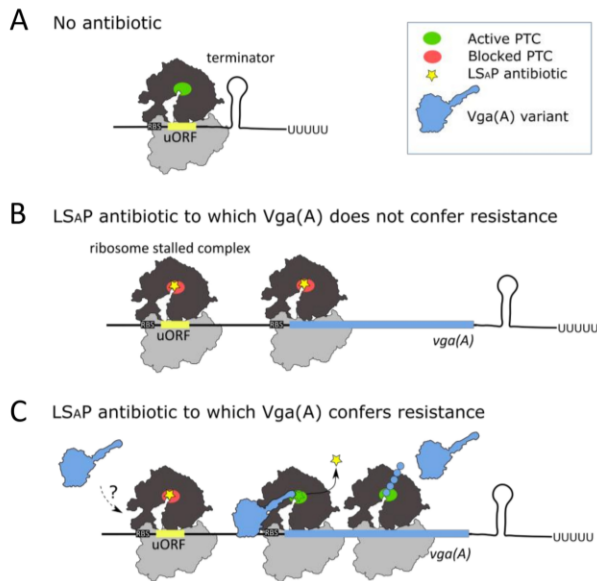


FIG 4 Proposed model for fine-tuned *vga(A)* expression in response to antibiotics. (A) In the absence of antibiotic, transcription of *vga(A)* is prematurely terminated by the 5' UTR secondary structure. (B) Ribosome stalled complex formed at uORF in the presence of lincosamide, streptogramin A, or pleuromutilin (LS_AP) antibiotic to which a particular *vga(A)* variant does not confer resistance releases the transcription-permissive 5' UTR secondary structure. Gene is transcribed; however, *Vga(A)* is not effectively translated at higher antibiotic concentrations, since *Vga(A)* cannot rescue the ribosome from inhibition. (C) In the presence of an LS_AP antibiotic to which a particular *Vga(A)* variant confers resistance, ribosomes are protected, and *Vga(A)* is effectively translated proportionally to the amount of antibiotic. We speculate that direct modulation of the stalled ribosome complex by *Vga(A)* is part of regulation.

DISCUSSION

In this work, we show that induction of *vga(A)*_{LC} expression is mediated by an attenuation mechanism that involves a short ORF encoding the MIN peptide and requires antibiotics to bind to the ribosome (Fig. 2B). We dissected the differential ability of clindamycin to induce *vga(A)* expression in *S. haemolyticus* isolates (Fig. 1B) by analyzing the antibiotic specificity of attenuators located upstream of several *vga(A)* variants in *S. aureus*. We have shown that differential expression of *vga(A)* is not due to the discriminatory ability of the attenuators toward clindamycin but depends on the ability of *vga(A)* to confer resistance (Fig. 2C and Fig. 3A). Induction of reporters with clindamycin in the presence of *Vga(A)*_{LC} resulted in maximum values even at a concentration approximately four times lower than that for lincomycin (see Fig. S7A in the supplemental material). Therefore, clindamycin, which inhibits *S. aureus* ribosomes more effectively than lincomycin (35), seems to be a more effective inducer than lincomycin in the presence of a *vga(A)* variant that confers resistance to clindamycin. The antibiotic responsiveness of the attenuator, together with the ability of *Vga(A)* to confer resistance, results in the tuned expression of *vga(A)* that reflects both the amount of antibiotic and the resistance specificity of the protein (Fig. 4). In other words, mutations leading to more effective forms of *Vga(A)* can be immediately phenotypically manifested without the need to modify the specificity of the attenuator. On the other hand, a *Vga(A)* variant which is not effective in protecting the ribosome will not be produced. From a clinical perspective, more potent *Vga(A)* variants active against new LS_AP antibiotic derivatives can emerge more easily.

Although we have shown that the ability of *Vga(A)* to confer resistance is an important prerequisite for antibiotic-induced *vga(A)* expression, we have also observed that *Vga(A)*_{LTGAG}, which is the most efficient *Vga(A)* form, activated reporter in the

absence of antibiotic (Fig. 3B). This observation indicates that Vga(A) may additionally modify its expression directly by interacting with the ribosome during ribosome stalling. Structures of the related antibiotic resistance ABCF proteins VmlR and Msr(E) in complex with the ribosome (27, 36) revealed that linkers reach the PTC of the ribosome where, consistently with this hypothesis, they change conformations of the same 23S rRNA residues that are important for antibiotic-induced ribosome stalling at uORFs upstream of *erm* resistance genes (37–39). For further understanding of the involvement of Vga(A) proteins in the direct regulation of their expression, it will be necessary to separate proposed regulatory activity from antibiotic resistance activity. However, this could be challenging, namely, because both antibiotic removal and modulation of ribosome stalling might involve the same Vga(A)-induced conformational changes of the PTC.

Lincomycin, pristinamycin IIA, and tiamulin represent the three antibiotic classes with an overlapping binding site on the ribosome to which *vga(A)* confers resistance (10). Although LS_AP antibiotics differ substantially in their structure (40), we have demonstrated here for the first time that they all induce *vga(A)* expression, whereas a macrolide antibiotic, erythromycin, to which *vga(A)* does not confer the resistance, does not (Fig. 2C). Contrary to the broad inducing specificity of *vga(A)*, expression of *erm* genes conferring resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics are induced only by some macrolides (41). Whether a macrolide is an inducer is determined by the specific motifs within the uORF sequence (42–44). On the other hand, uORFs of *vga(A)* (MIN) and *lmo0919* (MKF) (28) do not share sequence similarity, but both are only 3 amino acids long. The short size of the uORF may correspond to the fact that translation in the presence of lincomycin stops after 1 or 2 cycles (45). It is therefore reasonable to think that the short length of the *vga(A)* uORF broadly but clearly defines the specificity of the *vga(A)* attenuator to structurally diverse LS_AP antibiotics with the overlapping binding sites.

Interestingly, the 3-amino-acid uORFs seem to be shared by attenuators of many *vga(A)* homologs that confer resistance to LS_AP antibiotics (28) but not by attenuators of other lincomycin resistance gene classes (46, 47). Therefore, the size of the short uORF does not seem to be a prerequisite for the attenuation induced by lincosamides in general but could be important for the LS_AP antibiotic resistance proteins of the ABCF family, where it may reflect direct involvement of these proteins in the induction.

Among *vga(A)* variants found in *S. haemolyticus*, the dominant variant, especially in clinical isolates, was *vga(A)*_{LC}, which is the only *vga(A)* variant that conferred resistance to clindamycin (see Table S3 in the supplemental material). Despite the acquired knowledge of *vga(A)* regulation gained by this study, we were unable to explain many of the observed findings (Fig. 1B). Although the sequences of the 5' UTRs and the *vga(A)*_{LC} genes were identical, some strains did not produce Vga(A)_{LC} in response to antibiotics, while in others, the production was constitutive (Fig. 1B). These inconsistencies indicate that the *vga(A)* regulation is complex, perhaps involving co-occurring macrolide-lincosamide-streptogramin-pleuromutilin resistance proteins or reflecting strain-specific polymorphism. Notably, five LS_AP sensitive strains with silenced *vga(A)*_{LC} (see Table S4 in the supplemental material) represent a potential threat to the therapeutic efficacy of these antibiotics, since these strains may revert to antibiotic-resistance during treatment (48). Further studies are required to understand the mechanism of *vga(A)* induction and the direct involvement of Vga(A) and other cellular factors in this process.

MATERIALS AND METHODS

Strains. The following *S. haemolyticus* strains from two previously described whole-genome sequenced collections were used: 134 invasive *S. haemolyticus* isolates collected from geographically diverse origins across Europe, North America, and Japan, and 48 *S. haemolyticus* isolates collected from the skin of healthy volunteers (22, 30). Sequences of natural *vga(A)* variants and mutants are provided in the File S2 in the supplemental material. *Staphylococcus aureus* RN4220 was used as a host for eqFP650 reporter constructs. *Staphylococcus aureus* JE2 and its insertion mutant NE1858 with *ermB* inserted into the ABC transporter ATP-binding protein (JE2::*ermB*) (49) were used to test the effect of *ermB* expression on the induction of *vga(A)* by lincomycin. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used as a reference

strain for susceptibility testing. *Escherichia coli* strains XL1-Blue and BL21 were used for cloning and heterologous expression of $Vga(A)_{LC}$. *Escherichia coli* IM08B was used to prepare plasmids for highly efficient electroporation into staphylococci (50).

Antibiotics. Chloramphenicol, lincomycin, clindamycin, tiamulin, and erythromycin were purchased from Sigma-Aldrich; carbenicillin was purchased from Duchefa Biochemie, and pristinamycin IIA was kindly provided by Aventis Pharma (Vitry-sur-Seine, France).

Plasmids. All plasmids used in the study are described in Table S1 in the supplemental material. Oligonucleotides used for cloning are listed in the Table S2. eqFP650 reporter constructs were assembled using seamless ligation cloning extract (SLICE) (51). All created plasmids were sequenced and then transformed into *Escherichia coli* IM08B (50) to mimic adenine methylation patterns of recipient staphylococcal strains, purified, and electroporated into *S. aureus* strains using a MicroPulser electroporation apparatus (Bio-Rad) according to the instrument application guide. Site-directed mutagenesis was performed using two complementary primers, according to the QuikChange site-directed mutagenesis kit protocol (Agilent Technologies).

MICs. MICs for *S. haemolyticus* were determined by the broth microdilution method according to ISO standard 20776-1. MICs for *S. aureus* RN4220 carrying plasmids were determined in the presence of 25 μ g/ml chloramphenicol and that of 25 μ g/ml kanamycin to maintain pRMC2 and pRB374-based constructs, respectively. All measurements were performed in triplicates two times. Susceptible *S. aureus* ATCC 29213 was used as a control.

Production of the recombinant $Vga(A)_{LC}$ protein and anti- $Vga(A)$ antibody preparation. Production of $Vga(A)_{LC}$ (plasmid pJL040) in *E. coli* BL21 (DE3, Novagen) in the presence of coexpressed chaperonins GroES and GroEL was induced by adding 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) when optical density at 600 nm (OD_{600}) reached 0.6, then further incubated for 16 h at 18°C.

$Vga(A)_{LC}$ was purified as described previously (7) with the following exceptions: cell extract was loaded onto 1-ml home-packed Ni Sepharose high-performance (HP) (GE Healthcare Life Sciences) columns, washed with 50 mM NaH_2PO_4/K_2HPO_4 , 2 M NaCl, and 50 mM imidazole (pH 7.5), and eluted with 250 mM imidazole. Fractions containing $Vga(A)_{LC}$ were mixed and concentrated on an Amicon Ultra 10K device (Merck Millipore) to a final volume of 1 ml and loaded onto an ENrich SEC 650 column (Bio-Rad) equilibrated by 50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM dithiothreitol, and 10% glycerol (pH 8). Protein was further stored at $-80^\circ C$.

Polyclonal anti- $Vga(A)$ antibody was produced by BioGenes GmbH (Berlin, Germany) by immunizing rabbits with purified $Vga(A)_{LC}$ -6 \times His protein. Immunized serum was then affinity purified against agarose-bound $Vga(A)_{LC}$ -6 \times His and then against Msr(A)-6 \times His to remove the His tag-reacting antibody fraction. The specificity of the anti- $Vga(A)$ antibody was tested by Western blot analysis of *S. aureus* RN4220 with an empty pRMC2 vector and with vectors expressing $Vga(A)_{LC}$ or Msr(A)-6 \times His (see Fig. S1 in the supplemental material).

Western blot analysis of $Vga(A)$ expression. $Vga(A)$ expression was tested in *S. haemolyticus* cells harvested from cultures grown to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.7 to 1.2 in 1 ml brain heart infusion (BHI) in the absence or the presence of subinhibitory concentrations of lincomycin (0.25 μ g/ml), clindamycin (0.125 μ g/ml), erythromycin (0.125 μ g/ml), pristinamycin IIA (0.25 μ g/ml), tiamulin (0.25 μ g/ml), and carbenicillin (0.25 μ g/ml). Harvested cells were washed twice in 1 \times phosphate-buffered saline (PBS) and lysed by lysostaphin (1 μ g per 100 μ l of resuspended cells in 1 \times PBS) for 15 min at 37°C. 6 \times SDS loading buffer (20 μ l; BioLabs) was added to the lysed cell suspension, and the overall mixture was incubated for 15 min at 96°C. Furthermore, 10 μ l of the mixture was loaded and separated on a 12% SDS-PAGE gel. After separation, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P; Merck Millipore, United States) using the Bio-Rad SemiDry blotting system (10 min at 15 V). $Vga(A)$ was detected by an anti- $Vga(A)$ polyclonal antibody (1:1,000) and by secondary goat anti-rabbit IgG antibody horseradish peroxidase (HRP) conjugate (1:2,000) (Sigma-Aldrich, Germany). Protein abundance was measured using Immobilon Western HRP substrate (Merck Millipore, United States), and the signal was developed using the Bio-Rad ChemiDoc MP imaging system.

eqFP650 reporter fluorescence measurements. Colonies grown overnight at 37°C on BHI agar plates with appropriate antibiotics were resuspended in 0.9% NaCl to a McFarland turbidity standard of 0.5. Suspension (5 μ l) was inoculated in 200 μ l BHI per well in black 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Germany) in the absence or presence of antibiotics at a range of concentrations. For strains without *vga(A)* expression, the antibiotics and ranges were as follows: lincomycin (0.008 to 1 μ g/ml), clindamycin (0.002 to 0.25 μ g/ml), and pristinamycin IIA (0.15 to 16 μ g/ml). For strains expressing mutated *vga(A)*, the antibiotics and ranges were as follows: lincomycin (0.125 to 128 μ g/ml), clindamycin (0.031 to 32 μ g/ml), and pristinamycin IIA (0.125 to 128 μ g/ml). Bacteria were grown for 24 h at 37°C and fluorescence (excitation at 590 nm [Ex_{590}]/emission at 590 nm [Em_{590}]), and absorbance at 600 nm (A_{600}) of the bacterial cultures were measured at the end of cultivation using a Tecan Infinite 200 Pro plate reader. Autofluorescence values of the strains without eqFP650 were subtracted from the fluorescence values of the strains that encoded eqFP650, and they were normalized to the absorbance. The experiment was repeated three times, each time with duplicates.

For better sensitivity, testing of the strains with constitutive *vga(A)* expression in the presence of subinhibitory concentrations of antibiotics (Fig. 3B) was performed on 3 ml of culture inoculated with 150 μ l from the 0.5 McFarland suspension and cultivated until an OD_{600} of 1 at 37°C. Cells were harvested by centrifugation (5,000 rpm, 10 min), resuspended in 200 μ l of 1 \times PBS, and 100 μ l was transferred to black 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Germany) to measure the fluorescence, while 100 μ l was subjected to cell lysis and Western blot analysis to control the presence of $Vga(A)$ proteins.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 4 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, XLSX file, 0.01 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

Research on this project was supported by Czech Science Foundation grant number 15-16225Y, Grant Agency of Charles University grant number 772214 (granted to J.L.), by the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic within the National Sustainability Program II (project BIOCEV-FAR; LQ1604), and by the project BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) from the European Regional Development Fund in the Czech Republic.

REFERENCES

- Dar D, Sorek R. 2017. Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 36:111–117. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.005>.
- Sharkey LKR, O'Neill AJ. 2018. Antibiotic resistance ABC-F proteins: bringing target protection into the limelight. *ACS Infect Dis* 4:239–246. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00251>.
- 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. <https://doi.org/10.1002/pro.3589>.
- Ousalem F, Singh S, Chesneau O, Hunt JF, Boël G. 2019. ABC-F proteins in mRNA translation and antibiotic resistance. *Res Microbiol* 170:435–447. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.09.005>.
- Wilson DN, Haurlyuk V, Atkinson GC, O'Neill AJ. 2020. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nat Rev Microbiol* <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z>.
- Murina V, Kasari M, Takada H, Hinnu M, Saha CK, Grimshaw JW, Seki T, Reith M, Putrinš M, Tenson T, Strahl H, Haurlyuk 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. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.013>.
- Jacquet E, Girard J-MM, Ramaen O, Pamard O, Lévaïque H, Betton J-MM, Dassa E, Chesneau O, Lévaïque H. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800418200>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.973-980.2005>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.00799-06>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.04468-14>.
- Murina V, Kasari M, Haurlyuk V, Atkinson GC. 2018. Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Res* 46:3753–3763. <https://doi.org/10.1093/nar/gky050>.
- Allignet J, Loncle V, el Sohl N. 1992. Sequence of a staphylococcal plasmid gene, vga, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene* 117:45–51. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90488-B](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90488-B).
- Qin X, Poon B, Kwong J, Niles D, Schmidt BZ, Rajagopal L, Gantt S. 2011. Two paediatric cases of skin and soft-tissue infections due to clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a plasmid-encoded vga(A) allelic variant for a putative efflux pump. *Int J Antimicrob Agents* 38:81–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.007>.
- Tessé S, Trueba F, Berthet N, Hot C, Chesneau O. 2013. Resistance genes underlying the LSA phenotype of staphylococcal isolates from France. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4543–4546. <https://doi.org/10.1128/AAC.00259-13>.
- Lozano C, Aspiroz C, Rezusta A, Gómez-Sanz E, Simon C, Gómez P, Ortega C, Revillo MJ, Zarazaga M, Torres C, José M. 2012. Identification of novel vga(A)-carrying plasmids and a Tn5406-like transposon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* of human and animal origin. *Int J Antimicrob Agents* 40:306–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.009>.
- Mendes RE, Smith TC, Deshpande L, Diekema DJ, Sader HS, Jones RN. 2011. Plasmid-borne vga(A)-encoding gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 recovered from swine and a swine farmer in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71:177–180. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.009>.
- Gentry DR, McCloskey L, Gwynn MN, Rittenhouse SF, Scangarella N, Shawar R, Holmes DJ. 2008. Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4507–4509. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-08>.
- Kadlec K, Pomba CF, Couto N, Schwarz S. 2010. Small plasmids carrying vga(A) or vga(C) genes mediate resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from swine. *J Antimicrob Chemother* 65:2692–2693. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq365>.
- Petrelli D, Repetto A, D'Ercole S, Rombini S, Ripa S, Prenna M, Vitali LA. 2008. Analysis of methicillin-susceptible and methicillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. *J Med Microbiol* 57:364–372. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47621-0>.
- Monecke S, Ehrlich R. 2005. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin Microbiol Infect* 11:825–833. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01243.x>.
- McNeil JC, Hulten KG, Kaplan SL, Mason EO. 2014. Decreased susceptibilities to retapamulin, mupirocin, and chlorhexidine among *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections in otherwise healthy children. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2878–2883. <https://doi.org/10.1128/AAC.02707-13>.
- Cavanagh JP, Hjerde E, Holden MTG, Kahlke T, Klingenberg C, Flaegstad T, Parkhill J, Bentley SD, Ericson Sollid JU, Flaegstad T, Parkhill J, Bentley SD, Sollid JUE. 2014. Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* in European hospitals. *J Antimicrob Chemother* 69:2920–2927. <https://doi.org/10.1093/jac/dku271>.
- Liu B, Sun H, Pan Y, Zhai Y, Cai T, Yuan X, Gao Y, He D, Liu J, Yuan L, Hu G. 2018. Prevalence, resistance pattern, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy animals and sick populations in Henan Province, China. *Gut Pathog* 10:31. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0254-9>.
- Fessler AT, Kadlec K, Hassel M, Hauschild T, Eidam C, Ehrlich R, Monecke S, Schwarz S. 2011. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl Environ Microbiol* 77:7151–7157. <https://doi.org/10.1128/AEM.00561-11>.
- Lopes E, Conceição T, Poirel L, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. 2019.

- Epidemiology and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates colonizing pigs with different exposure to antibiotics. *PLoS One* 14:e0225497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225497>.
26. Van Duijkeren E, Greko C, Pringle M, Baptiste KE, Catry B, Jukes H, Moreno MA, Pomba MCMF, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K. 2014. Pleuromutilins: use in food-producing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 69:2022–2031. <https://doi.org/10.1093/jac/dku123>.
 27. Crowe-McAuliffe C, Graf M, Huter P, Takada H, Abdelshahid M, Nováček J, Murina V, Atkinson GC, Hauryluk V, Wilson DN. 2018. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:8978–8983. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808535115>.
 28. Dar D, Shamir M, Mellin JR, Koutero M, Stern-Ginossar N, Cossart P, Sorek R. 2016. Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotic resistance in bacteria. *Science* 352:aad9822. <https://doi.org/10.1126/science.aad9822>.
 29. Pain M, Hjerde E, Klingenberg C, Cavanagh JP. 2019. Comparative genomic analysis of *Staphylococcus haemolyticus* reveals key to hospital adaptation and pathogenicity. *Front Microbiol* 10:2096. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02096>.
 30. Cavanagh JP, Pain M, Askarian F, Bruun JA, Urbarova I, Wai SN, Schmidt F, Johannessen M. 2019. Comparative exproteome profiling of an invasive and a commensal *Staphylococcus haemolyticus* isolate. *J Proteomics* 197:106–114. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.013>.
 31. Haroche J, Allignet J, Buchrieser C, El Solh N. 2000. Characterization of a variant of *vga(A)* conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2271–2275. <https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2271-2275.2000>.
 32. 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. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.5946-5954.2005>.
 33. Shcherbo D, Shemiakina II, Ryabova AV, Luker KE, Schmidt BT, Souslova EA, Gorodnicheva TV, Strukova L, Shidlovskiy KM, Britanova OV, Zaraisky AG, Lukyanov KA, Loschenov VB, Luker GD, Chudakov DM. 2010. Near-infrared fluorescent proteins. *Nat Methods* 7:827–829. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1501>.
 34. Bae T, Glass EM, Schneewind O, Missiakas D. 2008. Generating a collection of insertion mutations in the *Staphylococcus aureus* genome using bursa aurealis. *Methods Mol Biol* 416:103–116. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-321-9_7.
 35. 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx658>.
 36. Su W, Kumar V, Ding Y, Ero R, Serra A, Lee BST, Wong ASW, Shi J, Sze SK, Yang L, Gao Y-G. 2018. Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:5157–5162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803313115>.
 37. Vazquez-Laslop N, Thum C, Mankin AS. 2008. Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling. *Mol Cell* 30:190–202. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.026>.
 38. Wilson DN, Arenz S, Beckmann R. 2016. Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling. *Curr Opin Struct Biol* 37:123–133. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.01.008>.
 39. Koch M, Willi J, Pradere U, Hall J, Polacek N. 2017. Critical 23S rRNA interactions for macrolide-dependent ribosome stalling on the ErmCL nascent peptide chain. *Nucleic Acids Res* 45:6717–6728. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx195>.
 40. Lin J, Zhou D, Steitz TA, Polikanov YS, Gagnon MG. 2018. Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design. *Annu Rev Biochem* 87:451–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942>.
 41. Allen NE. 1977. Macrolide resistance in *Staphylococcus aureus*: inducers of macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 11:669–674. <https://doi.org/10.1128/aac.11.4.669>.
 42. Gupta P, Liu B, Klepacki D, Gupta V, Schulten K, Mankin AS, Vázquez-Laslop N. 2016. Nascent peptide assists the ribosome in recognizing chemically distinct small molecules. *Nat Chem Biol* 12:153–158. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1998>.
 43. Min YH, Jeong JH, Choi YJ, Yun HJ, Lee K, Shim MJ, Kwak JH, Choi EC. 2003. Heterogeneity of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3415–3420. <https://doi.org/10.1128/aac.47.11.3415-3420.2003>.
 44. Mayford M, Weisblum B. 1990. The *ermC* leader peptide: amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *J Bacteriol* 172:3772–3779. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3772-3779.1990>.
 45. 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. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00662-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00662-4).
 46. Duval M, Dar D, Carvalho F, Rocha EPC, Sorek R, Cossart P. 2018. HflXr, a homolog of a ribosome-splitting factor, mediates antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:13359–13364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810555115>.
 47. Reilman E, Mars RAT, Van Dijn JM, Denham EL. 2014. The multidrug ABC transporter BmrC/BmrD of *Bacillus subtilis* is regulated via a ribosome-mediated transcriptional attenuation mechanism. *Nucleic Acids Res* 42:11393–11407. <https://doi.org/10.1093/nar/gku832>.
 48. Kime L, Randall CP, Banda FI, Coll F, Wright J, Richardson J, Empel J, Parkhill J, O'Neill AJ. 2019. Transient silencing of antibiotic resistance by mutation represents a significant potential source of unanticipated therapeutic failure. *mBio* 10:e01755-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01755-19>.
 49. Fey PD, Endres JL, Yajjala VK, Widhelm TJ, Boissy RJ, Bose JL, Bayles KW. 2013. A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *mBio* 4:1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00537-12>.
 50. Monk IR, Tree JJ, Howden BP, Stinear TP, Foster TJ. 2015. Complete bypass of restriction systems for major *Staphylococcus aureus* lineages. *mBio* 6:e00308-15–e00315. <https://doi.org/10.1128/mBio.00308-15>.
 51. Zhang Y, Werling U, Edelmann W. 2012. SLICE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res* 40:e55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1288>.

Příloha 2: Predikce sekundárního uspořádání transkriptu *vgaALC*

A

```

GCTTCTACGAAAGATATTACTTAAATAAATTTAGATTATATGATAATCTAAATTTTCATCAAGTAATATAGTGGTTTGGCAAGCATTGGC
12  4  6  8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 91

TTTGCTAGCCACATACGTGGTAGCGACGCCCTGCTTGTGGGAATATCCCAAGCCCCTAGGATTTTTTCTCGCAAAAAAATAGTGTCT
92  95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 182

-35 (1) -10 (1) start (1) -35 (2) -10 (2)
AA TTGCTA GCCACTGTTT CATT AAGTAATA TAAATAAAT TAAAT AAATAAAT TTAGGTTGAACA TTGACA TTTATTTGCTATTT GTTAAATT
183 190 200 210 220 230 240 250 260 270 273

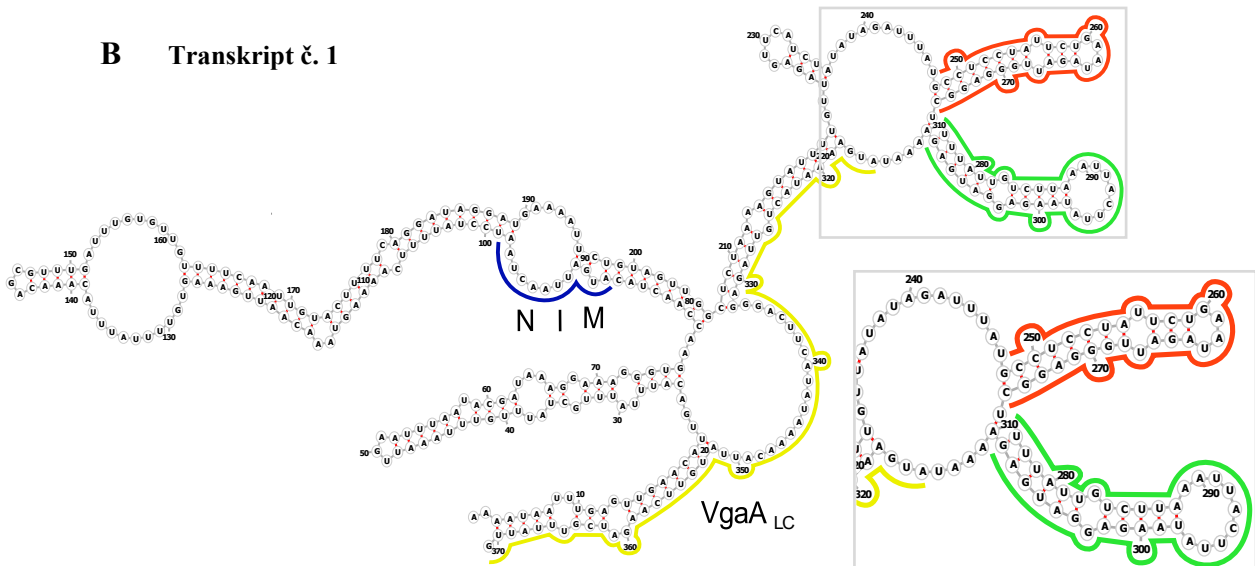
start (2) M I N *
GAATTT AATACGATAAAGGAAAGGGTGAACCAACTAC TTGATAAAGTAA TCCTATTTTCAAAGTAAACAATTGAAAGTGTTTTATTTACA
274 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 364

AACAGCGTTTGATTTGTTGTTTTC AATTGTACTTTTCAGGATAGGATGAAAATTCGTAGTTGGCTCTAAAAGTATTTTGTAGAGTTC
365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455

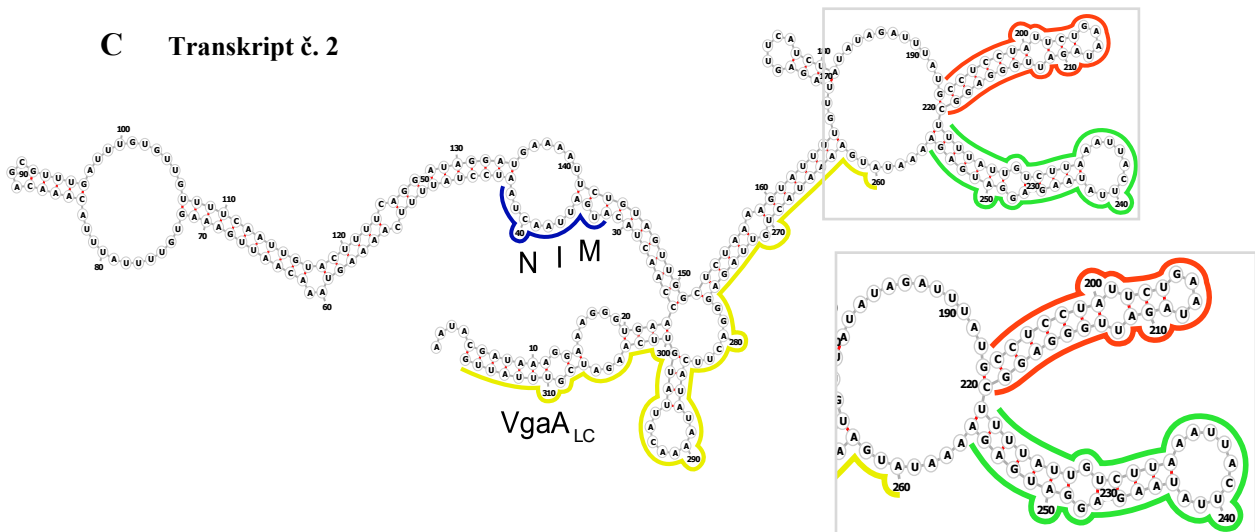
Predikovaný terminátor Predikovaná vlásenka maskující RBS
ATCTATATAGATTTAT GCCTCCTATTCTGAATAGATGGGAGGC TTTATTTGCTTAAATTAAGGATGAGA AAAT ATGAAAAT
456 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 546

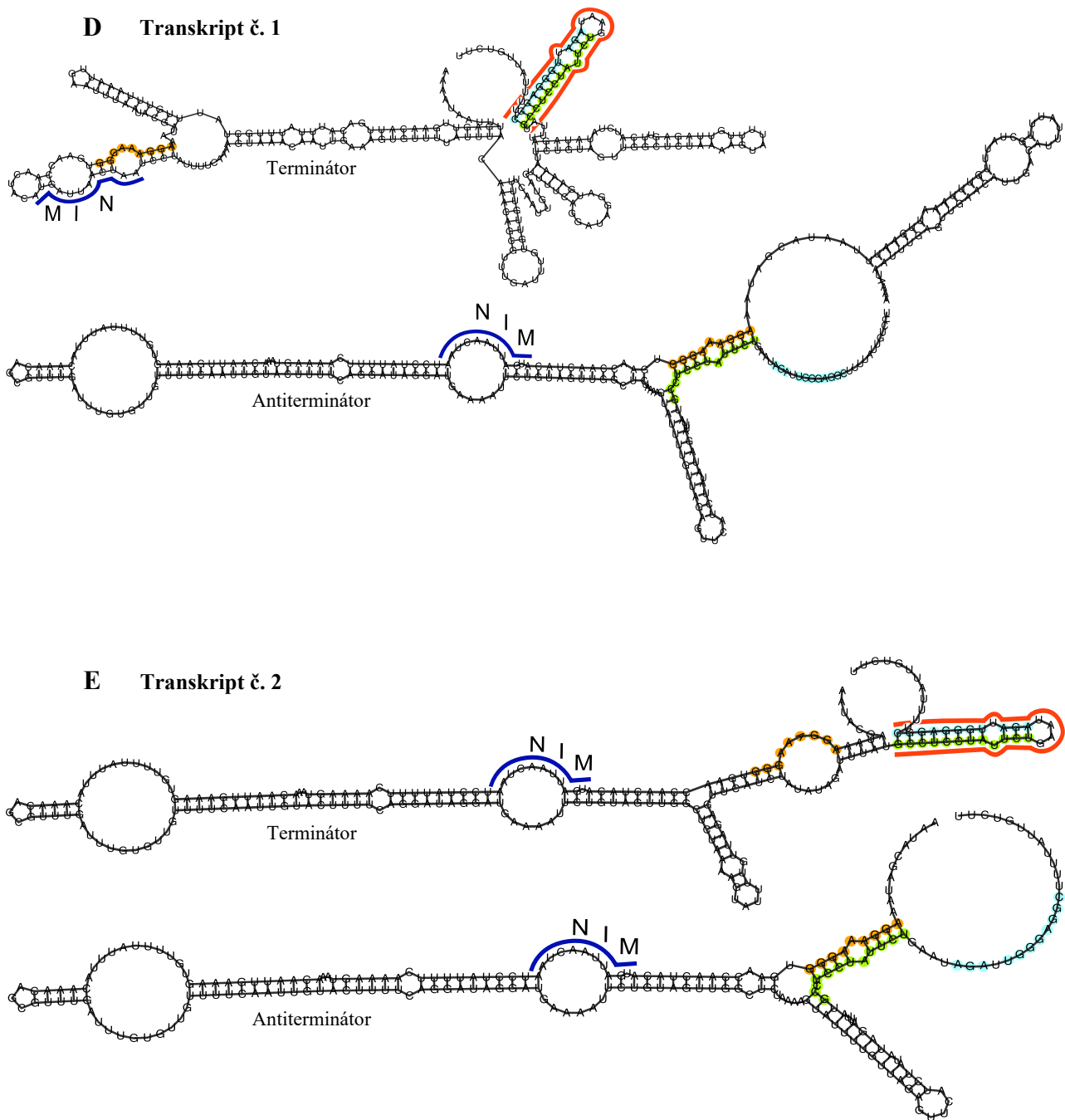
VgaALC
ACTGTTAGAGGGACTTCATATAAAACATTATGTTCAAGATCGTTTATTC
547 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595
    
```

B Transkript č. 1



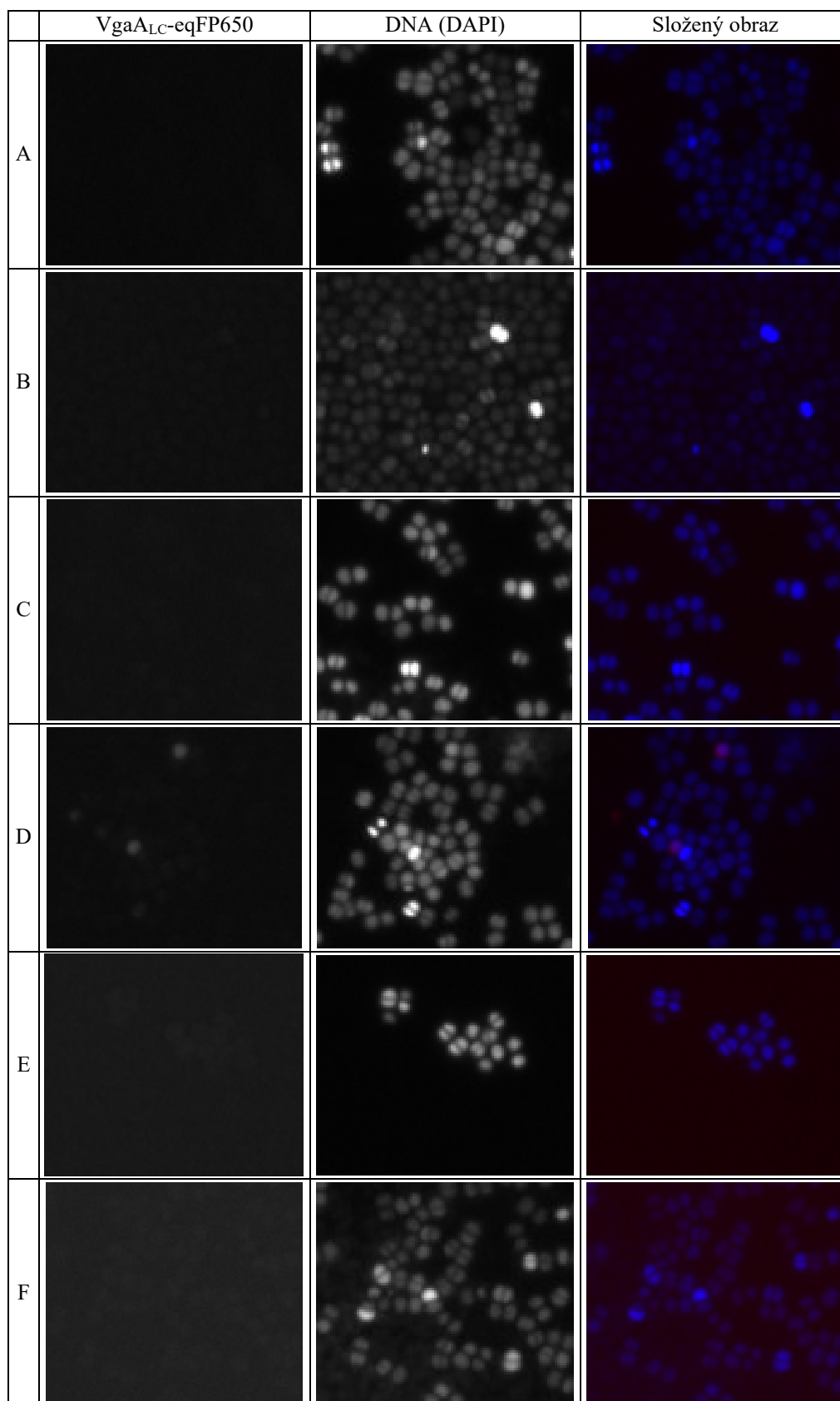
C Transkript č. 2

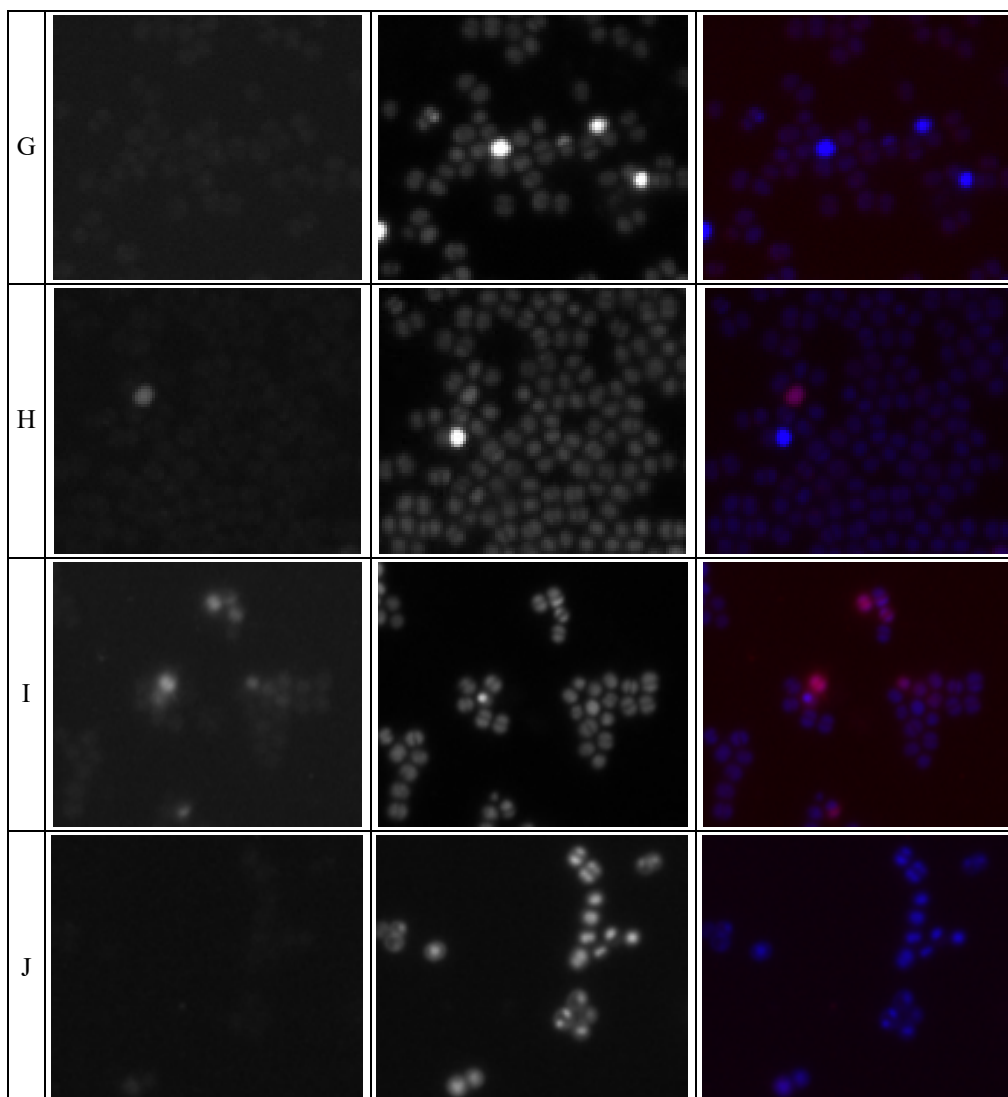




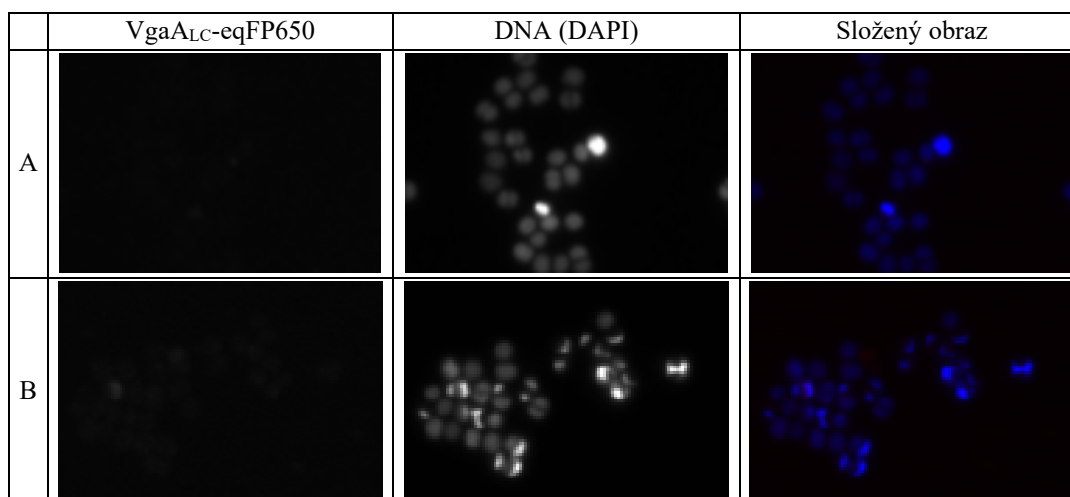
Obr. P-1: Predikce sekundárního uspořádání transkriptu *vgaALC*. (A) Anotovaná upstream oblast genu *vgaALC*. Predikované promotory 1 a 2 (Tab. 23 v odd. 5.1.2) a příslušné transkripční starty jsou označeny tmavě, resp. světle šedě; uORF o sekvenci MIN je označen modře, terminátor predikovaný nástrojem PASIFIC je označen červeně, vlásenka maskující RBS *vgaALC* predikovaná nástrojem RNAfold je označena zeleně a prvních devatenáct kodonů *vgaALC* je označeno žlutě. Barevné kódování je zachováno i v následujících obrázcích B-E. (B, C) Predikce sekundární struktury mRNA o nejnižší možné volné energii pomocí nástroje RNAfold (vizualizace pomocí nástroje *forna*). Terminátorová vlásenka a vlásenka maskující RBS *vgaALC* byla součástí predikce v případě zahrnutí kompletní sekvence *vgaALC*, částečné sekvence *vgaALC* (ukázáno na obrázku) i v případě, že ORF *vgaALC* zahrnut nebyl vůbec. (B) Predikce sekundární struktury transkriptu syntetizovaného z promotoru č. 1 (délka 5'UTR oblasti 314 nukleotidů). Minimální volná energie -93,8 kcal/mol. (C) Predikce sekundární struktury transkriptu syntetizovaného z promotoru č. 2 (délka 5'UTR oblasti 259 nukleotidů). Minimální volná energie -87,3 kcal/mol. (D, E) Predikce transkripčního atenuátoru pomocí nástroje PASIFIC. Predikce se skóre 0,5 a vyšší je brána jako spolehlivá. Terminátorová sekvence je vyznačena světle modře, antiterminátorová sekvence oranžově a sekvence schopná párovat s terminátorem i antiterminátorem je vyznačena světle zeleně. (D) Predikce sekundární struktury transkriptu syntetizovaného z promotoru č. 1 – skóre 0,43. (E) Predikce sekundární struktury transkriptu syntetizovaného z promotoru č. 2 – skóre 0,5.

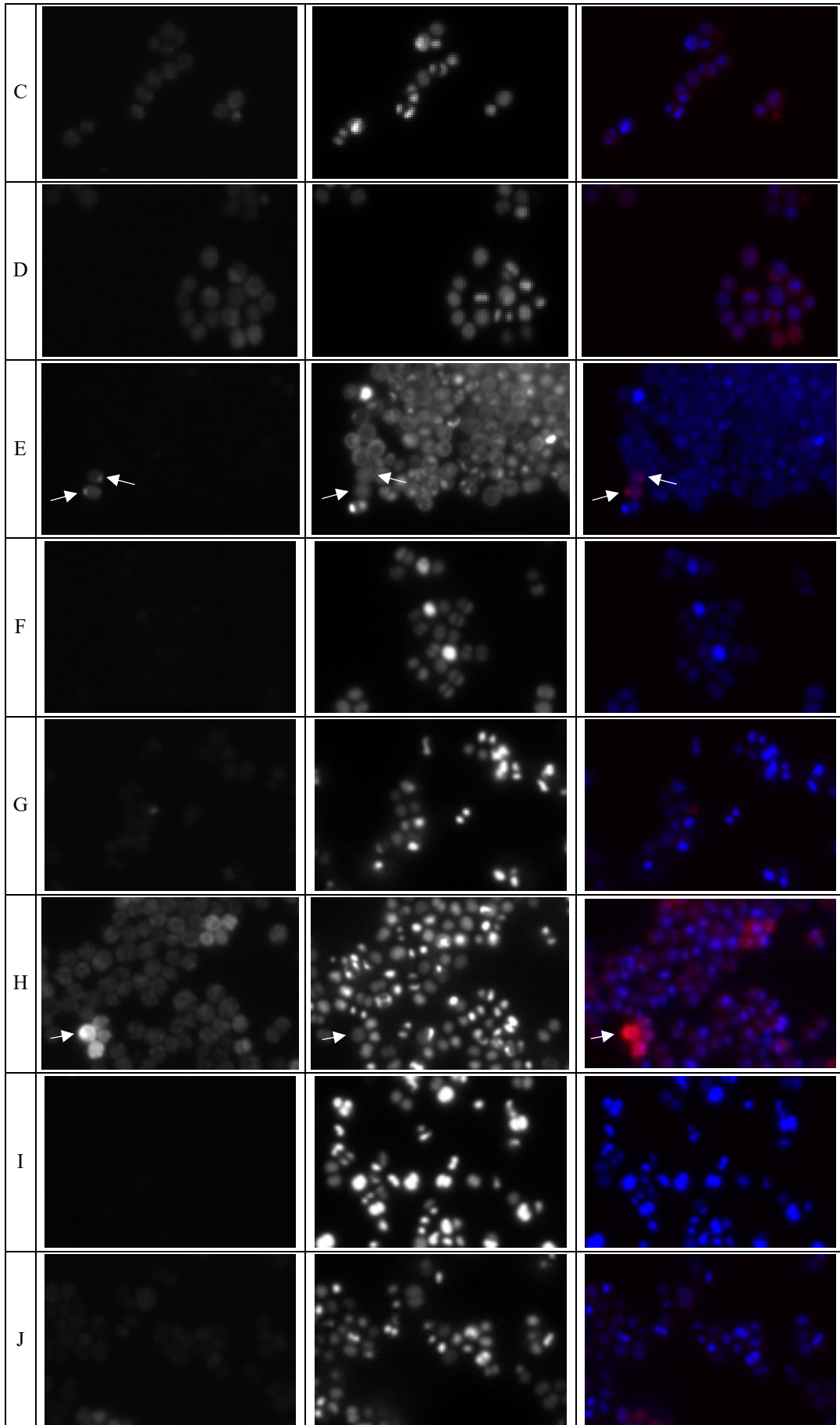
Příloha 3: Mikroskopie – rozložené kanály

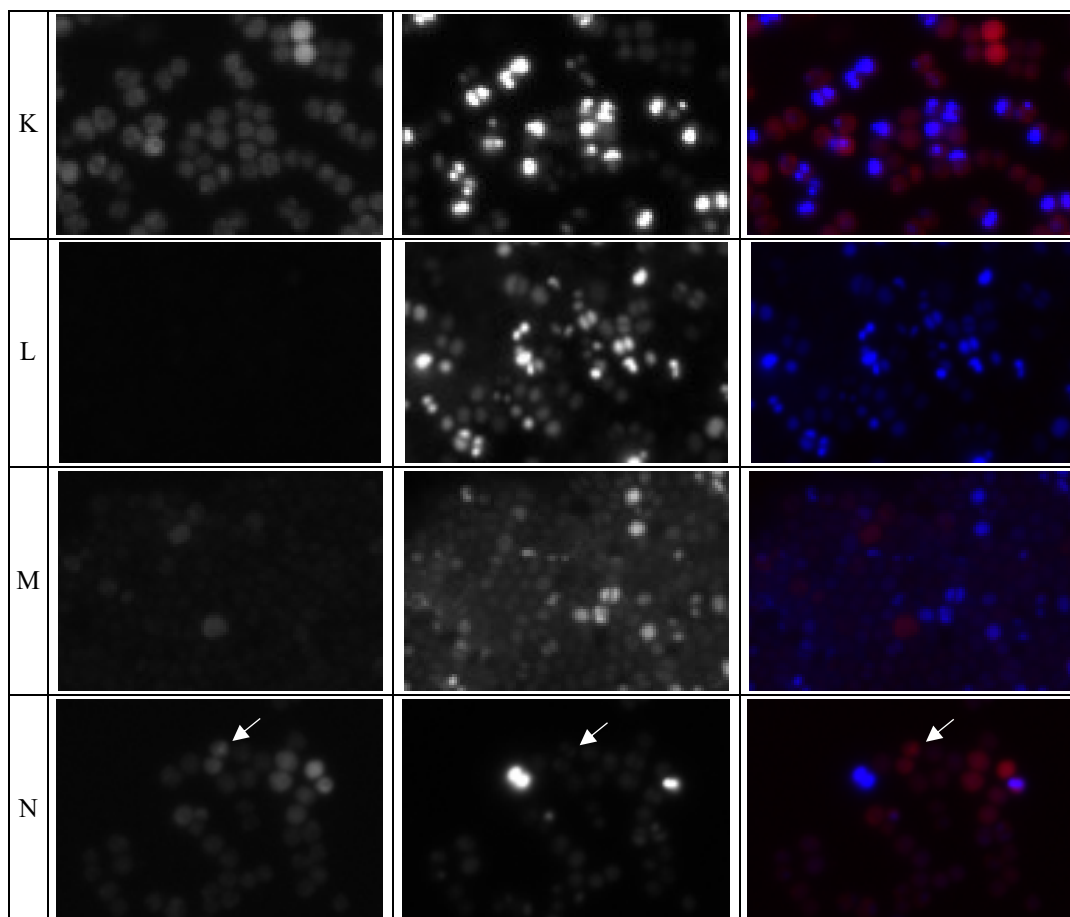




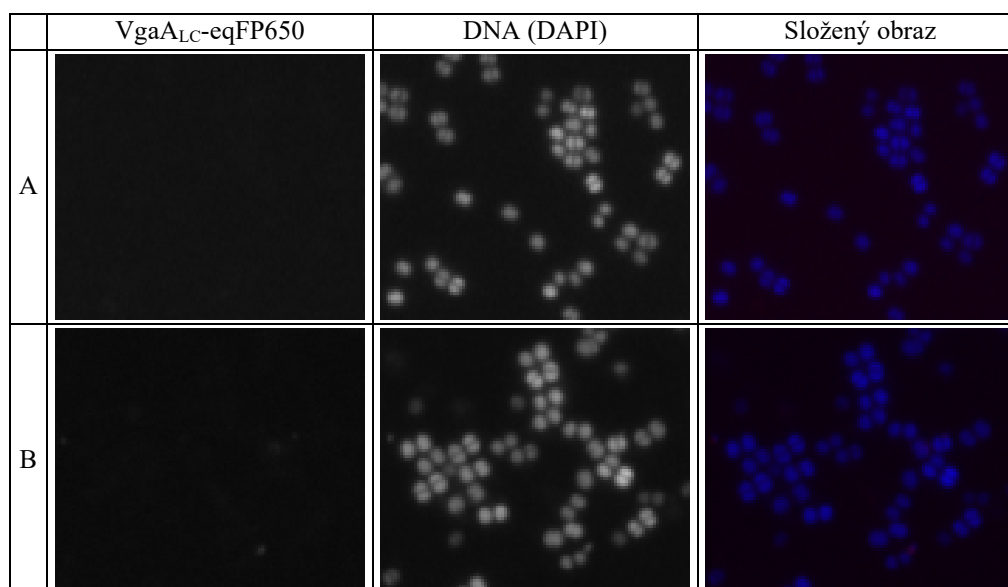
Obr. P-2: Rozložený červený (Vga_{ALC}-eqFP650) a modrý (DNA – DAPI) kanál mikroskopických obrázků A – J z Obr. 34 (odd. 5.5.2). Snímky jsou v černobílém provedení z důvodu lepšího kontrastu. Bílé šipky poukazují na umístění ohniska uvnitř buňky.

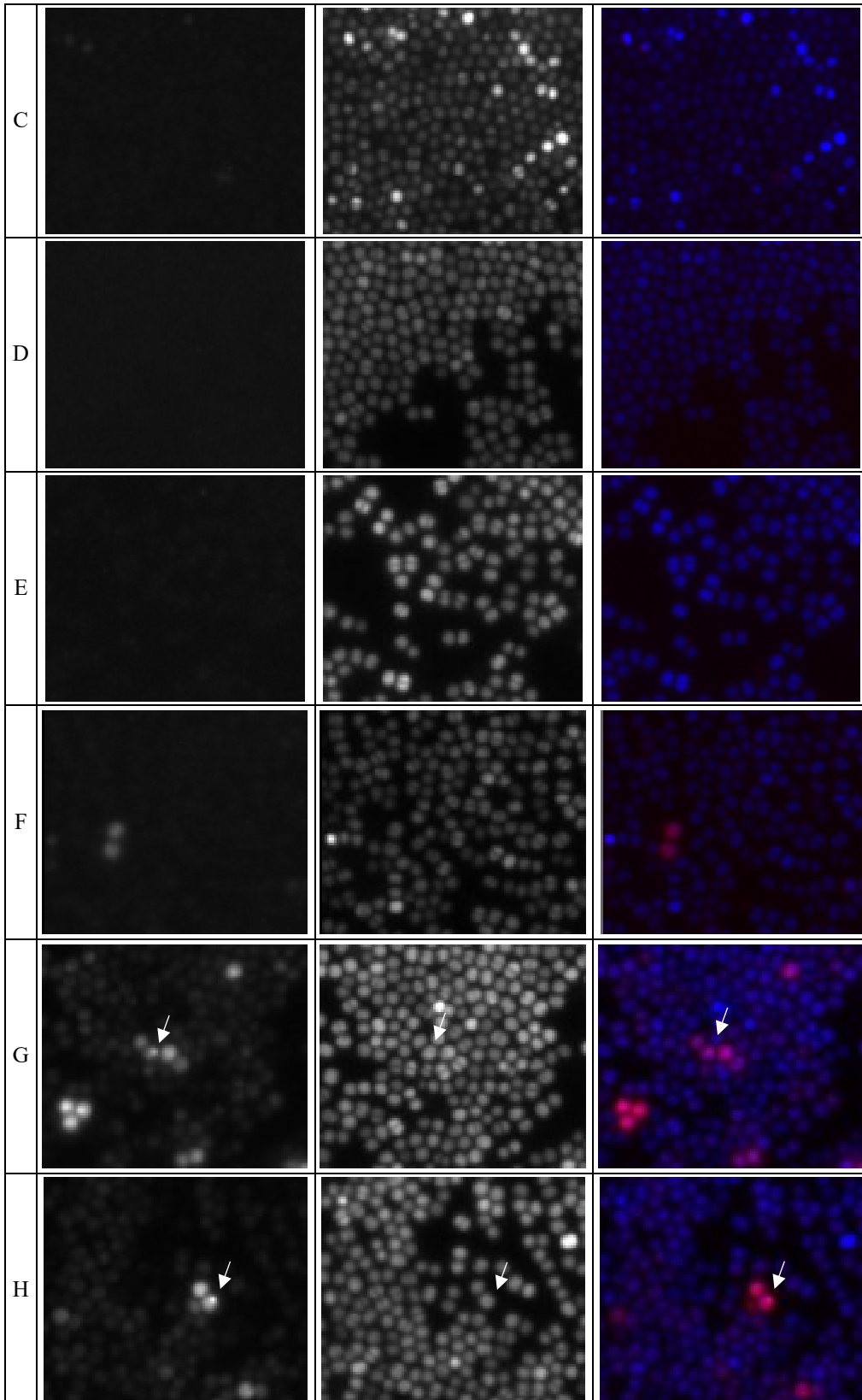


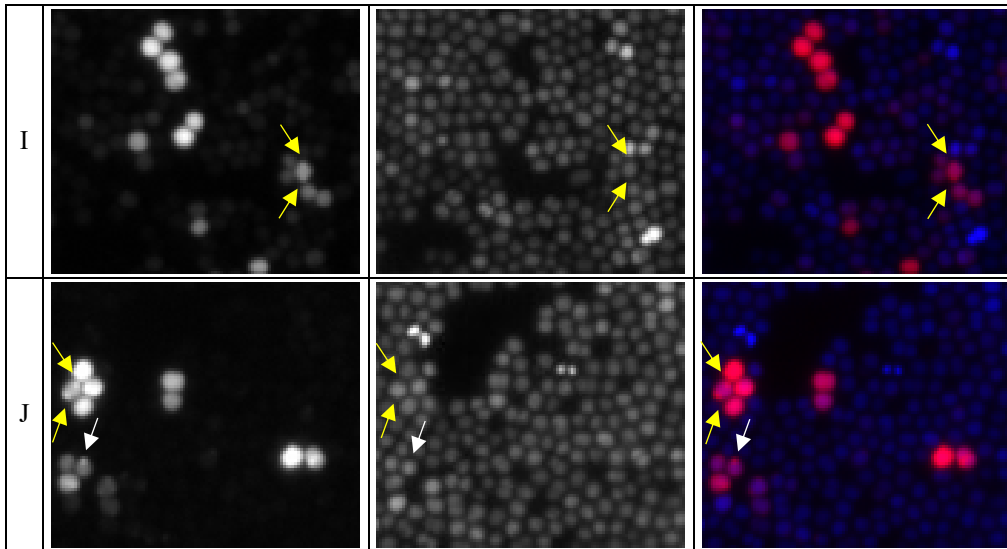




Obr. P-3: Rozložený červený (Vga_{LC}-eqFP650) a modrý (DNA – DAPI) kanál mikroskopických obrázků A – N z Obr. 35 (odd. 5.5.2). Snímky jsou v černobílém provedení z důvodu lepšího kontrastu. Bílé šipky poukazují na umístění ohniska uvnitř buňky.

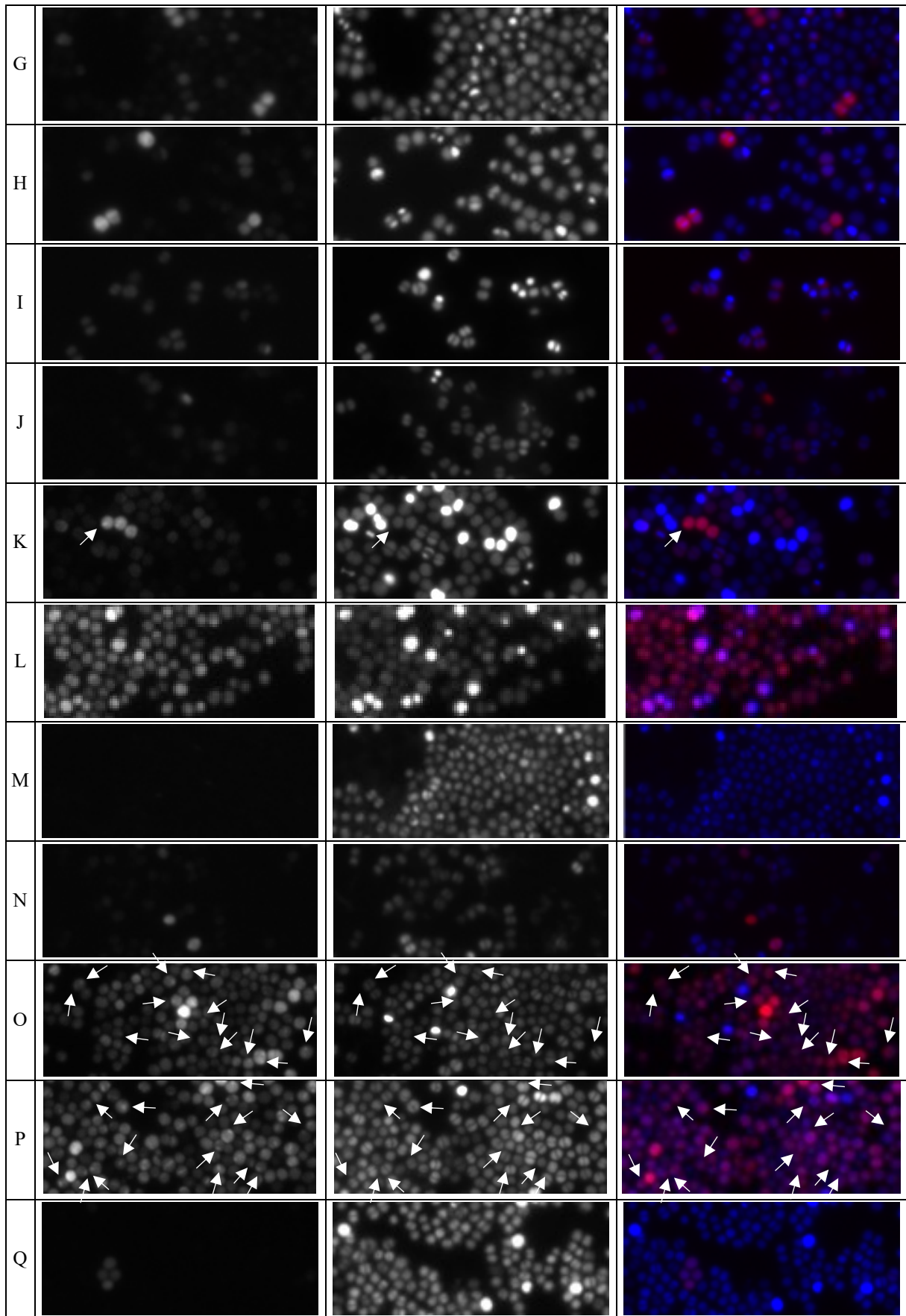


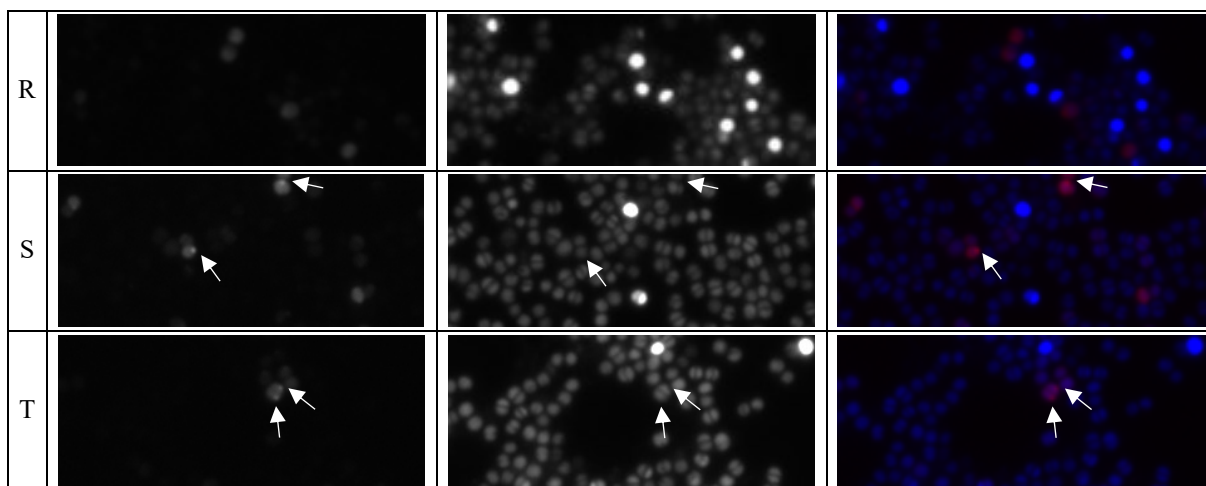




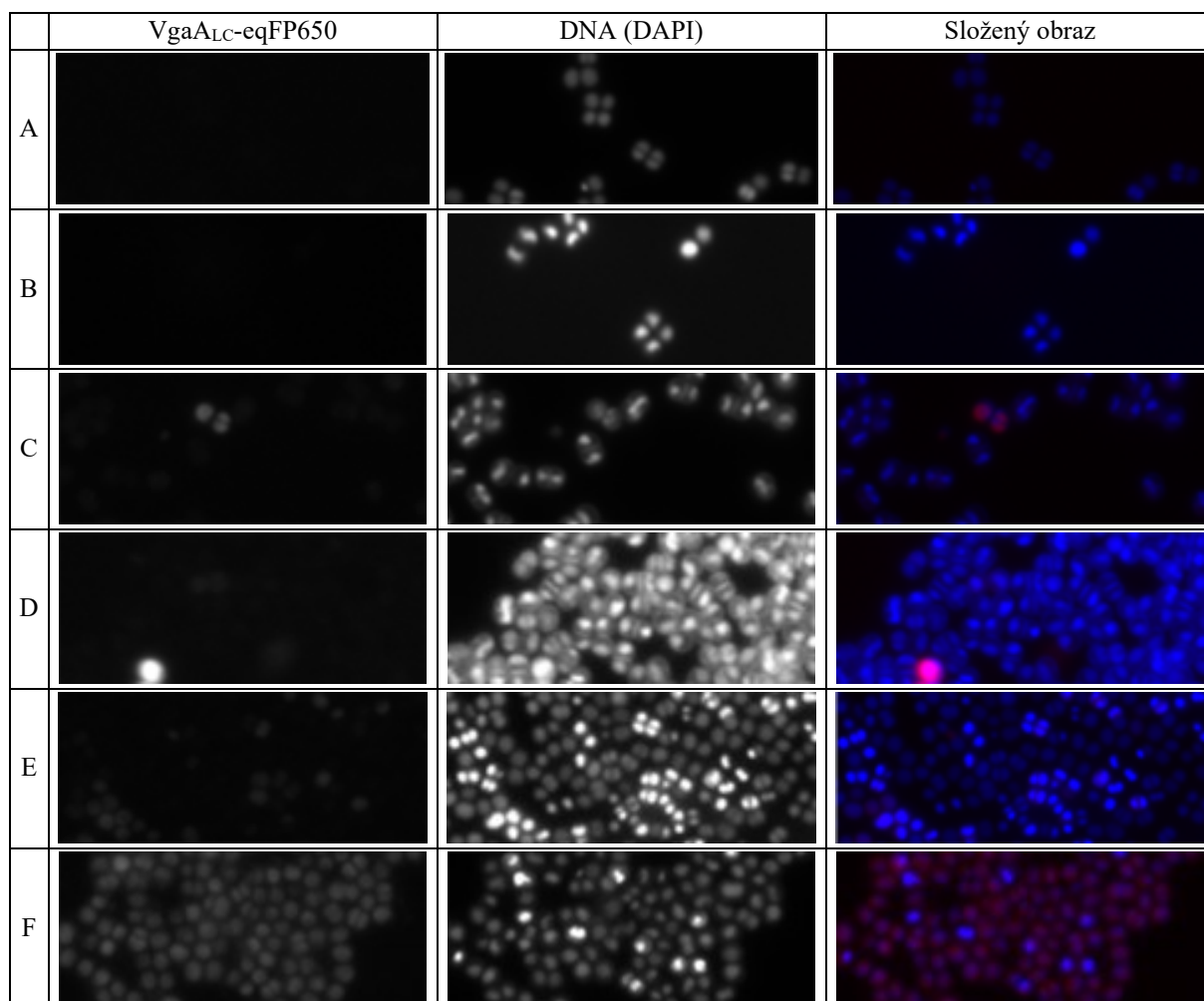
Obr. P-4: Rozložený červený (Vga_{ALC}-eqFP650) a modrý (DNA – DAPI) kanál mikroskopických obrázků A – J z Obr. 36 (odd. 5.5.2). Snímky jsou v černobílém provedení z důvodu lepšího kontrastu. Bílé šipky poukazují na ohniska v počtu jedno na buňku, žluté šipky poukazují na ohniska v počtu dvě na buňku.

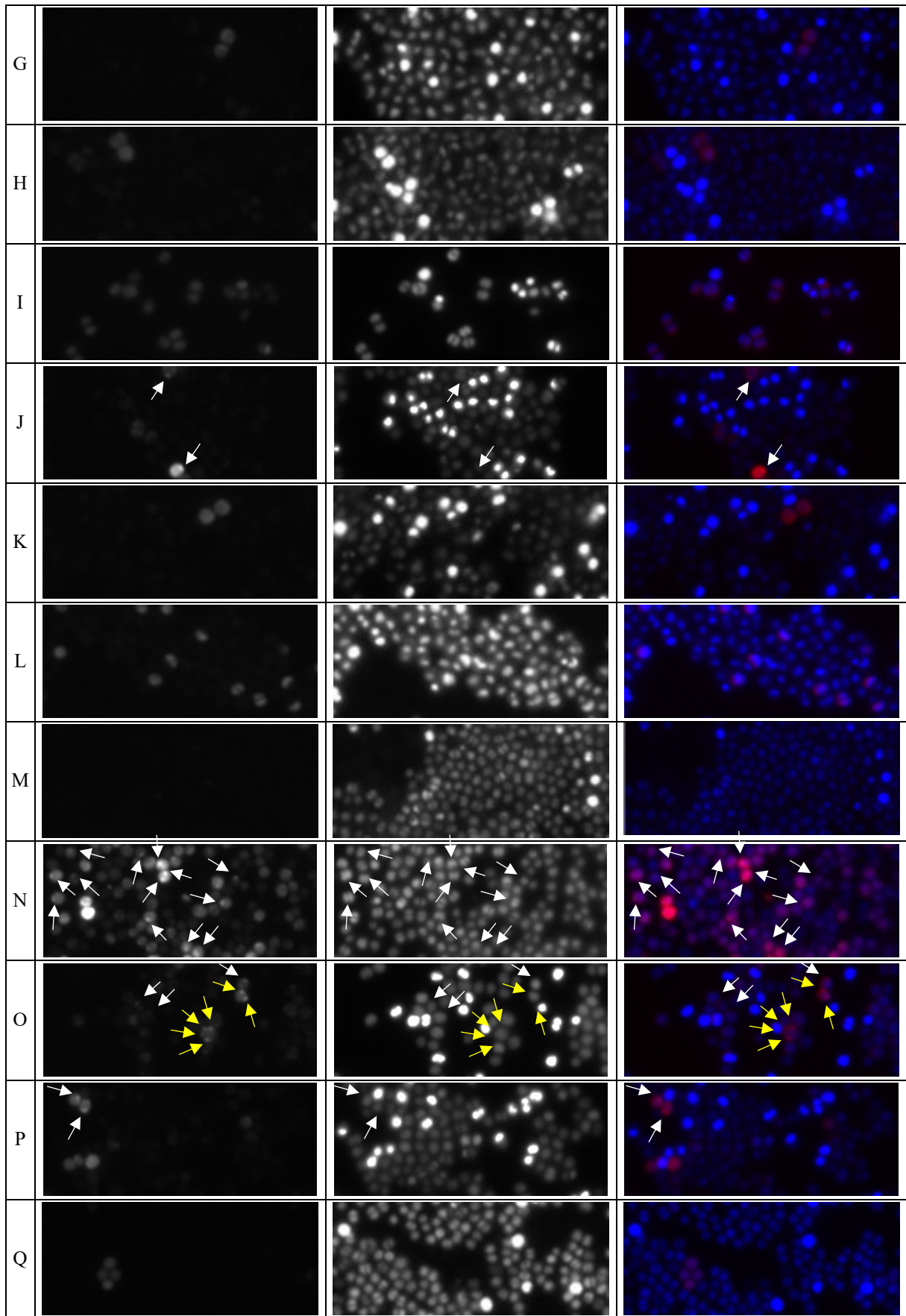
	Vga _{ALC} -eqFP650	DNA (DAPI)	Složený obraz
A			
B			
C			
D			
E			
F			

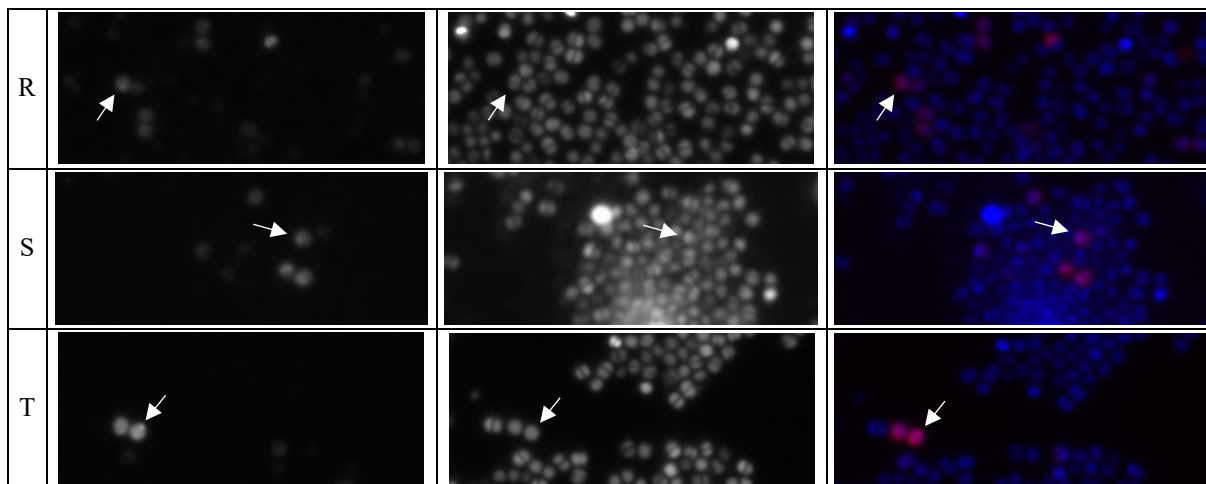




Obr. P-5: Rozložený červený (Vga_{ALC}-eqFP650) a modrý (DNA – DAPI) kanál mikroskopických obrázků A – T z Obr. 37 (odd. 5.5.2). Snímky jsou v černobílém provedení z důvodu lepšího kontrastu. Bílé šipky poukazují na umístění ohniska uvnitř buňky.







Obr. P-6: Rozložený červený (Vga_{ALC}-eqFP650) a modrý (DNA – DAPI) kanál mikroskopických obrázků A – J z Obr. 38 (odd. 5.5.2). Snímky jsou v černobílém provedení z důvodu lepšího kontrastu. Bílé šipky ukazují na ohniska v počtu jedno na buňku, žluté šipky ukazují na ohniska v počtu dvě na buňku.