

Dovoľujem k zapožičaniu svojej dizertačnej práce k študijným účelom a prosím aby bola vedená jej presná evidencia zápožičiek. Prevzaté údaje je zapožičiavateľ povinný riadne ocitovať.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Jakub Lenart

Kritické miesta určujúce rezistenčný fenotyp ABC proteínov z ARE podrodiny
a molekulárny mechanizmus ich funkcie

Critical sites determining the resistance phenotype of ABC proteins from the ARE
subfamily and the molecular mechanism of their function

Disertační práce

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

Praha, 2021

Prehlásenie:

Týmto prehlasujem, že som dizertačnú prácu s názvom „Kritické miesta určujúce rezistenčný fenotyp ABC proteínov z ARE podrodiny a molekulárny mechanizmus ich funkcie“ vypracoval samostatne a že som uviedol všetky informačné zdroje a literatúru, ktoré som riadne ocitoval. Táto práce ani jej časť nebola predložená k získaniu iného, alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe dňa 29.12.2021

.....

Mgr. Jakub Lenart

PodĎakovanie

Týmto by som rád poďakoval svojmu školiteľovi Mgr. Gabriele Balíkovej Novotnej, Ph.D. za odborné vedenie mojej dizertačnej práce, za jej cenné rady, pripomienky a komentáre. Jej láskavý prístup bol počas môjho štúdia samozrejmosťou. Taktiež jej ďakujem za všetky skúsenosti v oblasti vedy, ktoré mi predávala po celú dobu počas pôsobenia v Laboratóriu sekundárneho metabolizmu.

Ďakujem celému kolektívu Laboratória sekundárneho metabolizmu, za ich cenné pripomienky a rady, ktoré mi boli poskytované počas môjho pôsobenia v oblasti vedy. Špeciálne Mgr. Zdeňkovi Kameníkovi, Ph.D. a Mgr. Stanislavovi Kadlčíkovi, Ph.D. za ich čas, cenné rady a pomoc pri príprave [3H]-likomycínu. Poďakovanie patrí taktiež Ing. Jiřímu Janatovi, CSc; Mgr. Vladimírovi Vimbergovi, Ph.D. a Mgr. Jane Veselej za jeho odborné rady a postrehy počas môjho štúdia.

Ďakujem RNDr. Jiřímu Malinovi, CSc. (AeskuLab k.s.) za časový priestor, ktorý mi poskytol v novom zamestnaní na dopísanie mojej práce.

Ďakujem Nadácii Českému Literárnemu fondu a Nadácii „Nadání Josefa, Márie a Zdeňky Hlávkových“ za poskytnuté finančné prostriedky, ktoré boli použité k hradeniu cestovných nákladov spojených so zahraničnými konferenciami.

Záverom by som sa chcel poďakovať celej mojej rodine a najbližším, ktorí ma počas celej doby štúdia usilovne podporovali.

Zvláštne poďakovanie patrí mojej manželke, ktorá mi bola/je oporou počas písania dizertačnej práce. Bez jej pozitívneho myslenia a motivácie by som túto prácu asi nikdy nedopísal.

ĎAKUJEM!!!

Táto práca vznikla v rokoch 2012 – 2022 v Mikrobiologickom ústave Akadémie vied Českej republiky a Biotechnologickom a biomedicínskom centre BIOCEV vo Vestci v Laboratóriu sekundárneho metabolizmu a je založená na publikáciách, ktoré tvoria prílohu tejto práce. Čiastočné výsledky práce boli prezentované na nižšie uvedených konferenciách, sympóziách a kongresoch.

Prehľad absolvovaných konferencií, sympózií a kongresov:

Central European Symposium on Antimicrobial and Resistance, 2012, Primošten – Chorvátsko

54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, Washington – USA

Central European Symposium on Antimicrobial and Resistance, 2015, Šibenik – Chorvátsko

27. Kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej, 2016, Praha – Česká republika

6th Clinical Microbiology Conference 2016, Rím – Taliansko

Abstrakt

Vga(A) a Msr(A) rezistenčné proteíny patriace do ARE podrodiny ABC-F proteínov udeľujú rezistenciu na antimikróbne látky tzv. inhibítory peptidyltransferázového centra. V minulosti sa predpokladalo, že ich mechanizmus rezistencie je založený na interakcii s transmembranovým partnerom za vytvorenia funkčného transportéra. Pomocou kryoelektronovej mikroskopii a ich mutant neschných hydrolyzy ATP bolo popísané ich pôsobenie na ribozóme. Aj keď bola popísaná ich lokalizácia, presný mechanizmus nie je do dnešného dňa známy.

Prípravou mutovaných proteínov kombinujúcich štyri aminokyselinové zvyšky Vga(A) a Vga(A)_{LC} v špičke linkeru, sme ako prvý popísali vplyv substrátovej špecificity jednotlivých mutant. Aminokyselinová pozícia 212 a 220 je dôležitá pre rezistenciu k linkozamidom a pleuromutilínom, zatiaľ čo pozícia 219 k streptogramínom A. Povaha jednotlivých aminokyselín zohráva zásadnú rolu v udeľovaní antibiotickej špecificity, čo potvrdzuje fakt, že aminokyselinová zámena v pozícii K218T na pozadí Vga(A) proteínu spôsobila posun rezistencie od streptogramínov k linkozamidom a pleuromutilínom.

Mechanizmus rezistencie u buniek exprimujúcich *vga(A)* spočíva v ribozomálnej ochrane. Tomu nasvedčuje fakt, že miera akumulácie [3H]-linkomycínu u Vga(A) je veľmi podobná s kmeňom exprimujúcim *erm(C)*. Zároveň sme túto hypotézu potvrdili *in vivo* experimentom u ktorého sme ako prvý detegovali nemutovaný Vga(A)_{LC} na 50S podjednotke bakteriálneho ribozómu.

Aj keď Vga(A) a Msr(A) patria do rovnakej skupiny, ich interakcia s inými rezistenčnými mechanizmami môže byť rozdielna. Zatiaľ čo ko-expresia Vga(A) a Erm(C) spôsobuje zníženie MIC a rastové defekty, u Msr(A) a Erm(C) bolo pozorované zvýšenie MIC.

V tejto problematike mechanizmu rezistencie ARE ABC-F proteínov bolo publikovaných za posledné roky množstvo kvalitných odborných článkov, tak molekulárna podstata tohto mechanizmu nie je úplne pochopená.

Kľúčové slová

Vga(A), Msr(A), ARE ABC-F proteíny, *Staphylococcus*, linkomycín, erytromycín, ribozómy

Abstract

Vga(A) and Msr(A) are resistance proteins belonging to the ARE subfamily of ABC -F proteins. They confer resistance to inhibitors of the peptidyltransferase center. It has been proposed that the mechanism of resistance is based on interaction with a transmembrane partner that forms the functional transporter. Their ribosomal function has been described by cryoelectron microscopy of ribosome complexes with ABCF mutants unable to hydrolyze ATP. However, the exact mechanism of resistance is not yet known.

We have produced the mutant proteins combining the four amino acid residues in Vga(A) and Vga(A)_{LC} at the linker tip, and we were the first to describe the effects of substrate specificity of the single mutants. Amino acid positions 212 and 220 are important for resistance to lincosamides and pleuromutilins, respectively, while position 219 is responsible for resistance to streptogramin A. Each amino acid property plays a critical role in conferring antibiotic specificity, as confirmed by the fact that amino acid substitution at position K218T in the Vga(A) protein causes the shift in resistance from streptogramins to lincosamides and pleuromutilins.

The mechanism of resistance conferred by Vga(A) is ribosomal protection. This is supported by the fact that the rate of [3H]-lincomycin accumulation in the Vga(A)-expressing strain is very similar to that of the erm(C)-expressing strain. At the same time, we confirmed this hypothesis in an in vivo experiment in which we were the first to detect an unmutated Vga(A)_{LC} on the 50S and 70S subunits of the bacterial ribosome.

Although Vga(A) and Msr(A) belong to the same ARE subfamily, their interaction with other resistance mechanisms might differ. While co-expression of Vga(A) and Erm(C) leads to a decrease in MIC and growth defects, an increase in MIC was observed in the case of Msr(A) and Erm(C). Although several high-quality scientific articles have been published in recent years on the mechanism of resistance of ARE ABC-F proteins, the molecular nature of this mechanism is not yet fully understood.

Key words

Vga(A), Msr(A), ARE ABC-F proteins, *Staphylococcus*, lincomycin, erythromycin, ribosomes

Obsah

1. Úvod	14
2. Literárny prehľad	16
2.1. Bakteriálna proteosyntéza	16
2.1.1. Priebeh bakteriálnej translácie.....	18
2.2. Antimikróbne látky inhibujúce proteosyntézu – PTC inhibítory	22
2.2.1 Makrolidové antibiotika	23
2.2.2. Ketolidy.....	24
2.2.3 Linkozamidy	25
2.2.4. Streptogramíny.....	26
2.2.5. Pleuromutilíny	28
2.2.6. Oxazolíny	29
2.2.7. Amfenikoly.....	30
2.3. Mechanizmy rezistencie antimikróbných látok inhibujúcich proteosyntézu u stafylokokov.	31
2.3.1. Modifikácia cieľového miesta.....	31
2.3.2. Efluxný mechanizmus.....	33
2.3.3. Enzymatická inaktivácia.....	34
2.3.4. Ochrana bakteriálneho ribozómu pomocou ABC-F rezistenčných proteínov.....	34
2.4. ABC proteíny.....	36
2.4.1. Štruktúra NBD diméru	37
2.4.2. ABC-F podrodina ABC proteínov	38
2.4.2.1. ABC-F proteíny udeľujúce rezistenciu k antiinfekčným liečivám viažucich sa do 50S ribozomálnej podjednotky.	39
2.4.2.1.1. Rezistenčné proteíny udeľujúce rezistenciu k linkozamidom, streptogramínom A a pleuromutilínom (LS _{AP} fenotyp rezistencie)	39
2.4.2.1.2. Msr(A) a iné varianty Msr proteínov (MS _B fenotyp rezistencie)	43
2.4.2.1.3. ABC-F proteíny udeľujúce rezistenciu k fenikolom a oxazilidónom	45
2.4.2. Zhrnutie problematiky ABC-F proteínov	46
3. Ciele práce	49
4. Materiál a metódy	51
4.1 Materiál	51
4.1.1 Chemikálie	51
4.1.2. Bakteriálne kmene.....	52
4.1.3. Vektory	53
4.1.4. Primery	54
4.1.5. Kultivačné a uchovávacie média	56

4.1.6. Roztoky a pufry.....	58
4.1.7. Enzýmy	64
4.1.8. Protilátky	64
4.1.9. Antibiotiká	65
4.1.10. Komerčne dodávané súpravy	65
4.1.11. Software a internetové aplikácie	66
4.2. Metódy	66
4.2.1. Kultivácia a uchovávanie kompetentných buniek.....	66
4.2.1.1. Kultivácia a uchovávanie buniek kmeňa <i>Escherichia coli</i>	66
4.2.1.2. Kultivácia a uchovávanie kmeňa <i>Staphylococcus aureus</i>	67
4.2.2. Príprava a transformácia kompetentných buniek.....	67
4.2.2.1. Príprava kompetentných buniek <i>E. coli</i> pre transformáciu teplotným šokom	67
4.2.2.1.1. Transformácia kompetentných buniek <i>E. coli</i> teplotným šokom.....	68
4.2.2.1.2. Príprava kompetentných buniek <i>S. aureus</i> pre transformáciu elektroporáciou.....	69
4.2.2.2.1. Transformácia kompetentných buniek <i>S. aureus</i> elektroporáciou	69
4.2.3. Miestne špecifická mutagenéza pomocou QuikChange™ (Promega).....	70
4.2.4.Štiepenie fragmentov pomocou restričných endonukleáz	71
4.2.5. Defosforylácia pomocou alkalickéj fosfatázy (CIP).....	72
4.2.6. Ligácia restričných fragmentov DNA do vektrov pRB374, pRMC2 a pET42	73
4.2.7. Polymerázová reťazová reakcia.....	73
4.2.8. Elektroforetické separačné metódy	76
4.2.9. Imunoanalýza proteínov.....	78
4.2.10. Stanovenie citlivosti na antimikróbne látky	81
4.2.10.1. Stanovenie citlivosti na antimikróbne látky mikrodilúčnou metódou.	81
4.2.11. Heterológna expresia a purifikácia LmbJ proteínu.....	82
4.2.11.1. Heterológna expresia LmbJ proteínu	82
4.2.11.2. Príprava buniek na purifikáciu LmbJ proteínu.....	83
4.2.11.3. Purifikácia LmbJ proteínu	83
4.2.11.4. Dialýza a zakoncentrovanie proteínu	84
4.2.12. Heterológna expresia a purifikácia Vga(A) _{LC} proteínu.....	84
4.2.12.1. Heterológna expresia Vga(A) _{LC} proteínu	84
4.2.12.2. Príprava buniek na purifikáciu Vga(A) _{LC} proteínu.....	85
4.2.12.3. Purifikácia Vga(A) _{LC} proteínu	85
4.2.12.4. Zakoncentrovanie a odsolenie proteínu pomocou PD-10 odsolovacej kolóny.....	85
4.2.13. Enzymatická syntéza linkomycínu	86
4.2.13.1. Priprava linkomycínu – reakcia s neznačeným SAM	86

4.2.13.2. Príprava [3H]-linkomycínu.....	86
4.2.13.3. Odstranenie vstupných produktov reakcie	87
4.2.13.4. Stanovenie miery rádioaktivity v analyzovanom vzorku.....	87
4.2.13.5. Tenkovrstvová chromatografia	88
4.2.14. Meranie akumulácie [3H]-linkomycínu u klinických izolátoch.....	88
4.2.15. Práca s bakteriálnymi ribozómami	89
4.2.15.1. Príprava bakteriálnej kultúry <i>S. aureus</i> na prácu s ribozómami.....	89
4.2.15.2. Príprava bakteriálnych kultúr kmeňa <i>S. haemolyticus</i>	90
4.2.15.3. Príprava bakteriálneho lyzátu pomocou Emulsiflex C3 (Avestin)	90
4.2.15.4. Príprava bakteriálneho lyzátu pomocou FastPrep-24™ (MP Biomedicals).....	90
4.2.15.5. Príprava sacharózového gradientu.....	91
4.2.15.6. Ribozómalne profilovanie v sacharózovom gradiente	92
4.2.15.7. Kopurifikácia Vga(A) _{LC} proteínu s bakteriálnymi ribozómami pomocou ionexovej chromatografie.....	93
5. Výsledky.....	95
5.1. Vplyv sekvencie VgaA linkeru na špecificitu rezistencie	95
5.1.1. Príprava mutovaných variant Vga(A) a Vga(A) _{LC}	96
5.1.2. Špecificita rezistencie udeľovaná pripravenými variantami Vga(A)	98
5.3. Akumulácia antibiotika v bunkách v dôsledku zmeny väzby na ribozóm	101
5.2.1. Príprava rádioaktívne značeného linkomycínu	101
5.2.1.2. Optimalizácia značiacej reakcie a samotné značenie katalyzované LmbJ.....	103
5.2.1.3. Prečistenie [3H]-linkomycínu od substrátov reakcie.....	104
5.2.2. Sledovanie akumulácie [3H]-linkomycínu u <i>S. haemolyticus</i> exprimujúceho <i>vga(A)_{LC}</i> alebo <i>erm(C)</i>	105
5.3. Interakcia ABC-F proteínov s ribozómom <i>in vivo</i>	107
5.3.1. Príprava špecifickej anti-Vga(A) _{LC} polyklonálnej protilátky	107
5.3.1.1. Príprava konštruktu pET42b.vga(A) _{LC} -6HIS	107
5.3.1.2. Purifikácia Vga(A) _{LC} proteínu	108
5.3.1.3. Testovanie polyklonálnej anti-Vga(A) protilátky	109
5.3.2. Príprava VgaA _{LC} mutanty neschopnej hydrolýzy ATP a jej vplyv na rast.....	111
5.3.3. Interakcie Vga(A) _{LC} s bakteriálnym ribozómom <i>in vivo</i>	113
5.3.3.1. Profilovanie ribozómov v sacharózovom gradiente a western blot analýza.....	113
5.3.3.2. Kopurifikácia Vga(A) _{LC} proteínu a bakteriálnych ribozómov a ich imunodetekcia.....	117
5.3.3.2.1. Kopurifikácia rôznych variant Vga(A) proteínu a bakteriálnych ribozómov a ich imunodetekcia.....	120
5.3.3.2.2. Kopurifikácia Lmr(C) proteínu s bakteriálnymi ribozómami a ich imunodetekcia.....	121
5.4. Štúdium interakcie rezistenčných mechanizmov pôsobiacích na ribozóm.....	124

5.4.1. Stanovenie minimálnych inhibičných koncentracii a analýza rastových vlastností <i>Staphylococcus haemolyticus</i> s rôznymi rezistenčnými mechanizmami.....	124
5.4.2. Stanovenie minimálnych inhibičných koncentracii a analýza rastových vlastností <i>Staphylococcus aureus</i> JE2 s rôznymi rezistenčnými mechanizmami.....	127
6. Diskusia.....	130
7. Súhrn	137
8. Zoznam literatúry	138
9. Prílohy.....	148

Abecedný zoznam skratiek

30S	malá ribozomálna podjednotka
50S	veľká ribozomálna podjednotka
6His	histidínová kotva
A	absorbancia
ADP	adonozíndifosfát
APS	peroxidisíran amónny
ATP	adenozíntrifosfát
BGC	biosyntetický génový klaster
CLI	klindamycín
CM	chloramfenykol
CV	objem kolóny
dH ₂ O	destilovaná voda
dNTP	zmes deoxynukleotidtrifosfátov
DTT	dithiotreitol
EDTA	etyldiaminoaoctová kyselina
EF-G	elongačný faktor G
EF-Tu	elongačný faktor Tu
ERY	erytromycín
g	tiahové zrýchlenie
GDP	guanozíndifosfát
GTP	guanozíntrifosfát
IF 1,2,3	iniciačný faktor 1,2,3
IPTG	Izopropyl β-D-1-tiogalaktopyranozid
LIN	linkomycín
LSaP	linkozamidy, streptogramíny A, pleuromutilíny
mRNA	mediatorová ribonukleová kyselina
MRSA	methicilín rezistentný <i>S. aureus</i>
MSb	makrolidy, streptogramíny B
NBD	nukleotid viažúca doména
NDL	N-demetyllinkomycínu
OD	optická denzita
OD ₆₀₀	optická denzita pri vlnovej dĺžke 600nm
OP	oxazolíny, pleuromutilíny
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PEG	polyetylénglykol
PIIA	pristinamicín IIA
ppGpp	guanozintetrafosfát
PTC	peptidyl transferázové centrum
PVDF	polyvinyliden difluorid
RF 1,2,3	"release" faktor 1,2,3
RRF	ribozómálny recyklačný faktor
SAM	S-adenozyl L-metionínu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová elektroforéza

TCA	trichlóroctová kyselina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametylendiamín
TIA	tiamulín
TLC	tenkovrstvová chromatografia
TMD	transmemránová doména
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometán
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
WB	Western Blot

1. Úvod

Antibiotická rezistencia predstavuje závažný celosvetový problém, ktorý je často preberaný na medzinárodných konferenciách a dlhodobo na neho upozorňuje WHO. Po objavení penicilínu Flemingom a zavedení do klinickej praxe v 40. rokoch 20 storočia, došlo k zníženiu mortality na ochorenia spôsobené baktériami. Avšak baktérie disponujú „vrodenými“ a získanými mechanizmami rezistencie, ktoré sú zodpovedné, že liečba bakteriálnych ochorení sa stáva neúčinnou. Ďalším vážnym problémom je ich časté a nerozumné nadužívanie či už v humánnej, alebo veterinárnej medicíne. Výsledkom je výrazne šírenie rezistencie a objavovanie stále viac vysoko rezistentných bakteriálnych kmeňov. V dnešnej dobe je časť mechanizmov rezistencie dobre charakterizovaná, avšak existujú mechanizmy, ktoré nie sú úplne objasnené. Ich detailnejšie pochopenie nám umožní modifikáciu liečiv, alebo objavenie nových účinnejších látok.

Antimikróbne látky interagujú z rôznymi cieľovými molekulami, na základe ktorých ich vieme rozdeliť podľa mechanizmu účinku. Jednou skupinou antibiotík sú látky, ktoré interagujú s 50S ribozomálnou podjednotkou, konkrétne v peptidyltransferázovom centre (PTC). Tieto látky patria medzi tzv. inhibítory PTC. Výsledkom pôsobenia je inhibícia proteosyntézy, deja esenciálneho pre bakteriálnu bunku.

Skupinu s neúplne pochopeným mechanizmom rezistencie predstavujú ABC-F proteíny patriace do superrodiny ABC proteínov, ktoré sa vyskytujú naprieč celým spektrom živých organizmov. Na rozdiel od klasických ABC transportérov sú tieto proteíny charakteristické prítomnosťou nukleotid viažucej domény (NBD) a absenciou transmembránovej domény (TMD) (Licht & Schneider, 2011). ABC-F proteíny sa zúčastňujú regulácie translácie, alebo ochrany ribozómu pred účinkom antibiotík. Avšak dlho sa predpokladalo, že sú tieto proteíny transportéry a ich pôsobenie na ribozóme bolo popísané nedávno. Ich ribozomálna funkcia bola dlhodobo prehliadaná z toho dôvodu, že boli automaticky radené medzi transportéry (Chesneau et al., 2005; Jeremy I. Ross et al., 1996). Predpokladalo sa, že tieto proteíny interagujú s neidentifikovaným transmembránovým partnerom a vytvárajú tak funkčný transportér (Chesneau et al., 2005). Vďaka kryoelektronovej mikroskopii bolo preukázané, že ABC-F proteíny interagujú s ribozómom. V roku 2015 bol biochemicky a štruktúrne charakterizovaný prvý ABC-F proteín, translačný faktor EttA, v komplexe s ribozómom (Chen

et al., 2014). Na základe tejto práce bol navrhnutý rezistenčný mechanizmus ABC-F proteínov, ktorý predpokladal odstránenie antibiotika z ribozómu (Lenart et al., 2015). Ribozomálna funkcia rezistenčných proteínov Vga(A) a Lsa bola v roku 2016 preukázaná biochemicky (Sharkey et al., 2016). Neskôr boli publikované aj štruktúry komplexov ABC-F proteínov udeľujúcich rezistenciu k antibiotikám, avšak vo všetkých prípadoch sa jednalo o komplex ribozómu s mutovaným ABC-F proteínom neschopným hydrolýzu ATP (Crowe-McAuliffe et al., 2021; Crowe McAuliffe et al., 2021; Su et al., 2018). Mnoho detailov molekulárneho mechanizmu nie je dnešného dňa známy.

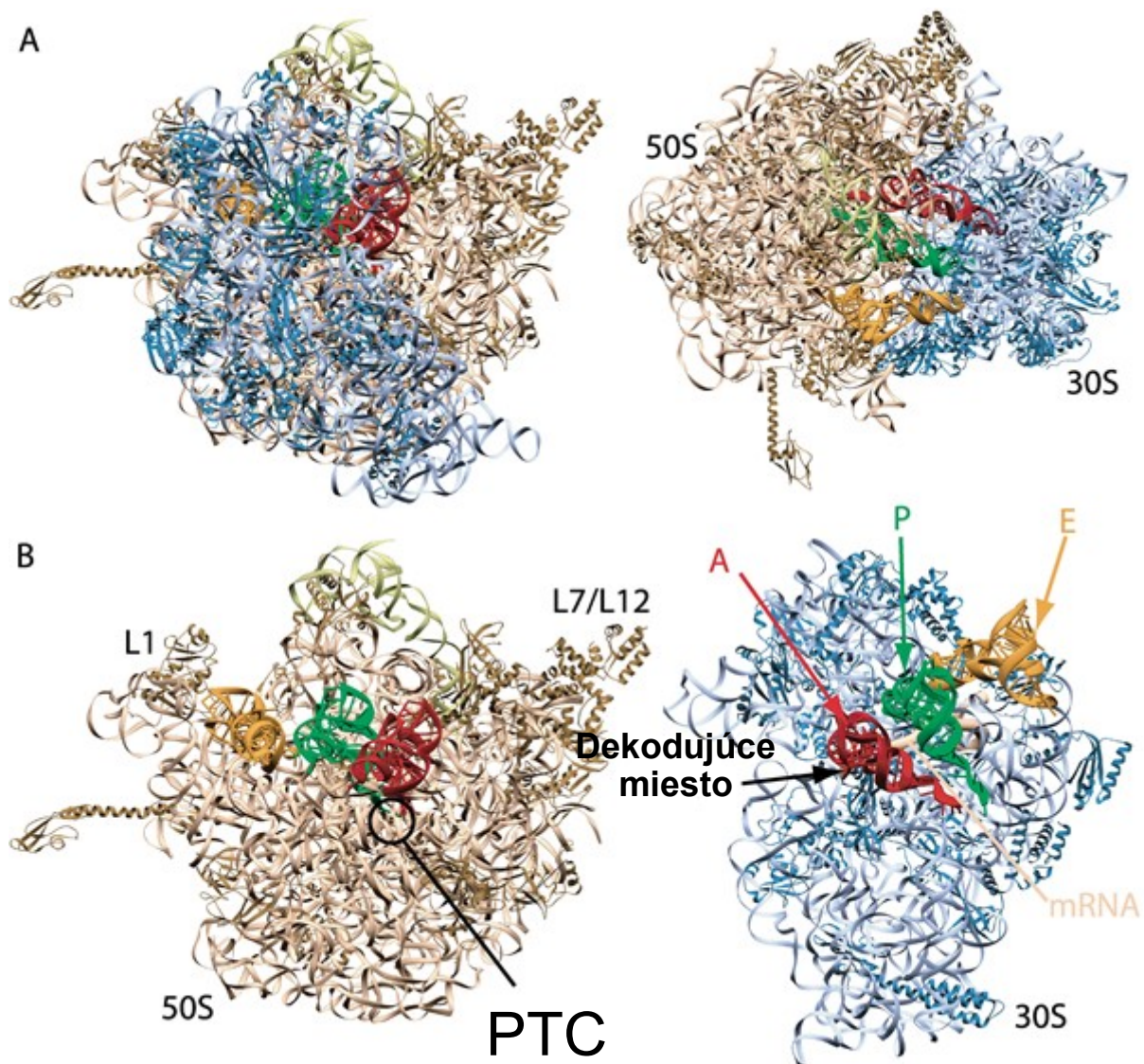
V tejto dizertačnej práci som sa zamerlal na štúdium fungovania ARE ABC-F proteínov *in vivo* a na vzájomnú interakciu rezistenčných mechanizmov pôsobiacich na ribozóme.

2. Literárny prehľad

2.1. Bakteriálna proteosyntéza

Bakteriálna proteosyntéza, je komplikovaný proces, pri ktorom sa využívajú makromolekulárne riboproteínové komplexy, nazývane ribozómy (Laursen et al., 2005). Ribozómy katalyzujú enzymatické reakcie, ktoré sú zodpovedné za vytvorenie väzby medzi narastajúcim polypeptidovým reťazcom a novo pripojenou aminokyselinou. Poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci je dané poradím jednotlivých nukleotidov nasledujúcich za sebou v sekvencii mRNA (Steitz & Moore, 2003).

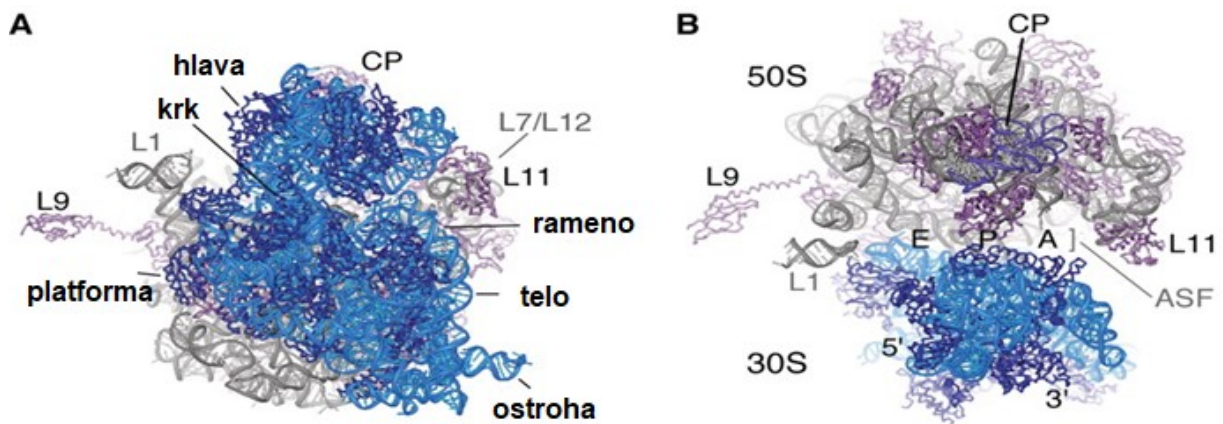
Bakteriálny ribozóm má relatívny sedimentačný koeficient 70S, čo odpovedá molekulovej hmotnosti 2,4 MDa. Je tvorený veľkou (50S) a malou (30S) ribozomálnou podjednotkou (obr. 1). Veľká bakteriálna podjednotka tvorí katalytické centrum (peptidyltransferázové centrum, PTC), ktoré zabezpečuje formáciu peptidovej väzby a výstupný kanál, ktorým vystupuje nascentný peptid z ribozómu. PTC obsahuje 3 miesta, A miesto, ktoré tvorí akceptor aminoacyl-tRNA, P miesto, kam sa viaže aminoacyl-tRNA s nascentným peptidom a E-miesto, pre väzbu deacylovanej tRNA (Steitz & Moore, 2003; Wimberly et al., 2000; Yonath, 2005). 50S ribozomálna podjednotka je tvorená 34 ribozomálnymi proteínmi, označovanými ako L1-L34, a dvoma rRNA, 5S s veľkosťou 120 nukleotidov a 23S s veľkosťou 2900 nukleotidov (Steitz & Moore, 2003). Úlohou 30S podjednotky je špecifická interakcia s mRNA v iniciačnom kroku translácie. Malá ribozomálna podjednotka obsahuje tzv. dekodovacie centrum, kde tripletové kodóny sú párované antikodónmi na tRNA (Green and & Noller, 1997). Malá bakteriálna podjednotka je tvorená z 21 proteínov s celkovou molekulárnou hmotnosťou 0,8 MDa a 16S rRNA o veľkosti 1542 nukleotidov (Wimberly et al., 2000).



Obrázok 1. – Kryštalická štruktúra bakteriálneho ribozómu. Modrou farbou je znázornená malá bakteriálna podjednotka (30S), hnedou je znázornená veľká bakteriálna podjednotka (50S), tRNA znázornené červenou, zelenou a žltou farbou. **A. – pohľad na ribozóm zhora, B.- Pohľad na rozložený ribozóm, jeho 50S a 30S podjednotku.** (Ramakrishnan, 2002) – prevzaté a upravené.

Na základe kryštalickej štruktúry intaktného ribozómu kmeňa *Escherichia coli* rozlišujeme u 30S bakteriálnej podjednotky hlavu, krk, platformu, telo, rameno a ostrohu (obr.2). 50S bakteriálna podjednotka zahŕňa centrálny výčnelok, L1 rameno (tvorené L1 proteínom a jeho 23S rRNA väzobným miestom), ASF (A-site finger), RNA helix a oblasť blízko L7 a L12 proteínom, ktoré zahŕňa L11 rameno (tvorené proteínom L11 a jeho 23S rRNA väzobným miestom) (Schuwirth et al., 2005). Práve tieto dve ramená L1 a L11 menia svoju pozíciu pri elongácii translácie. L1 rameno je zodpovedné za posun tRNA z A do E miesta, zatiaľ

čo L11 rameno prispieva k aktivite v iniciácii, elongácii translácie a „release“ faktorov (RF) (Frank, 2003; Schuwirth et al., 2005).

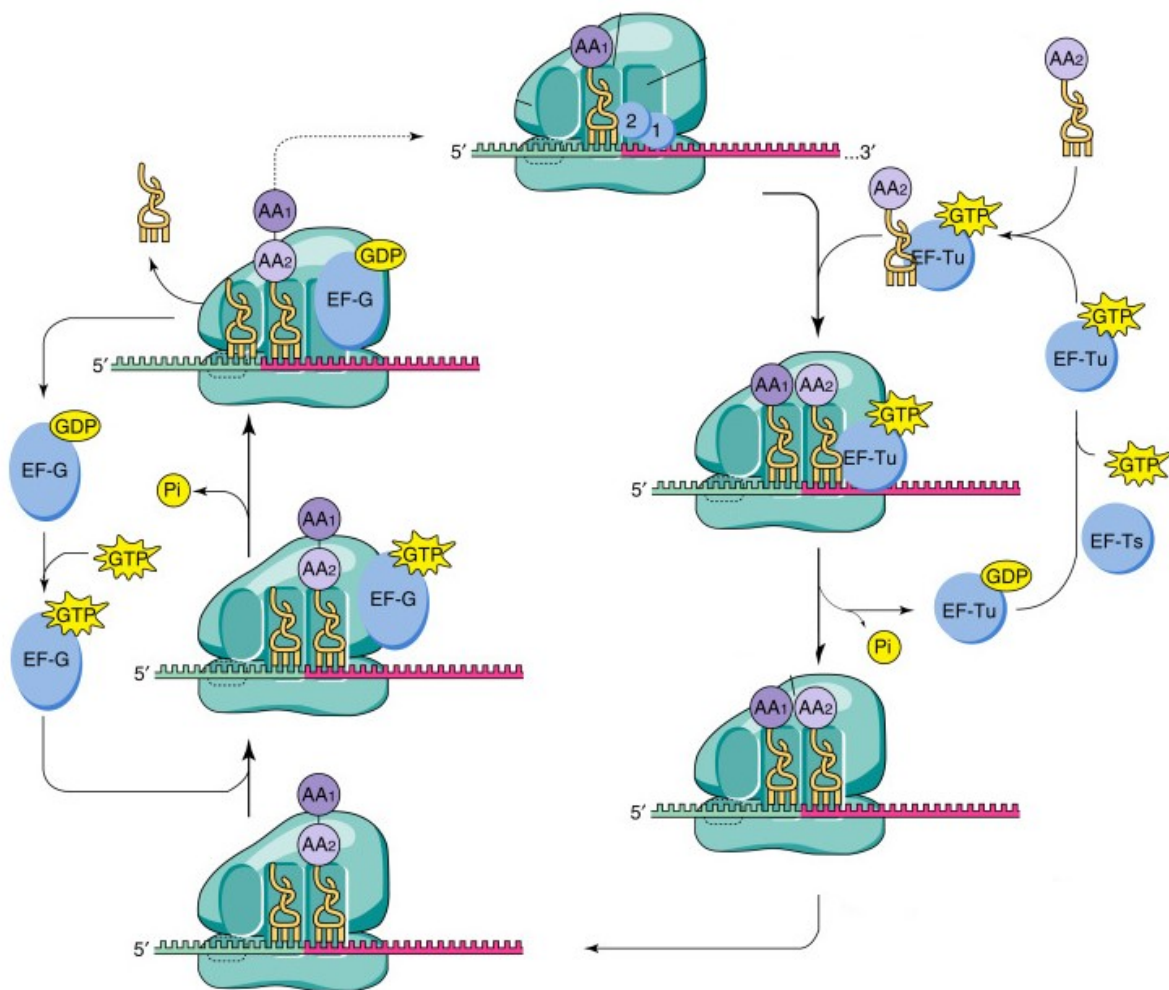


Obrázok 2. – Kryštalická štruktúra intaktného 70S bakteriálneho ribozómu *Escherichia coli*. A. Pohľad na ribozóm z vrchnej strany. rRNA a proteíny 30S sú znázornené svetlo- a tmavomodrou farbou. 23S rRNA a proteíny 50S podjednotky sú znázornené sivou a purpurovou farbou. B. Pohľad na otočený ribozóm o 90 stupňov. (Schuwirth et al., 2005) – prevzaté a upravené.

2.1.1. Priebeh bakteriálnej translácie

Translácia mRNA je zahájená tzv. iniciačnou fázou , ktorá je najviac regulovaným krokom celej proteosyntézy. Do iniciačnej fázy sú zapojené iniciatorová aminoacylovaná a formylovaná Met tRNA (fMet-tRNA^{fMet}), iniciačné faktory IF1, IF2, IF3 a taktiež samotná mRNA (Laursen et al., 2005). Iniciačia začína naviazaním IF3 na 30S ribozomálnu podjednotku, ktorej výsledkom je disociácia 70S ribozómu na jeho podjednotky (Petrelli et al., 2001). IF1 sa viaže do A miesta a je zodpovedný za jeho obsadenie a správne navedenie iniciatorovej tRNA do P-miesta. Aktivita IF3 je stimulovaná IF1, čo zabezpečuje disociáciu oboch podjednotiek (Dahlquist & Puglisi, 2000). Zároveň dochádza k naviazaniu mRNA a IF2. Shine-Dalgarno sekvencia interaguje s anti-Shine-Dalgarno sekvenciou na 16S rRNA, čo umožní správnu orientáciu fMet-tRNA-fMet v P-mieste (La Teana et al., 1995). 30S preiniciačný komplex tak obsahuje naviazané všetky tri iniciačné faktory, mRNA a v správnej polohe orientovaný fMet-tRNA-fMet. Následne dochádza k uvoľneniu IF1 a IF3, zatiaľ čo IF2 stimuluje asociáciu s 50S ribozomálnou podjednotkou za vytvorenia 70S iniciačného komplexu. Následne dochádza k hydrolýze GTP naviazanom na IF2 na GDP a Pi a celý proces prechádza do elongácie (Green and Noller, 1997; Ramakrishnan, 2002; Steitz & Moore, 2003).

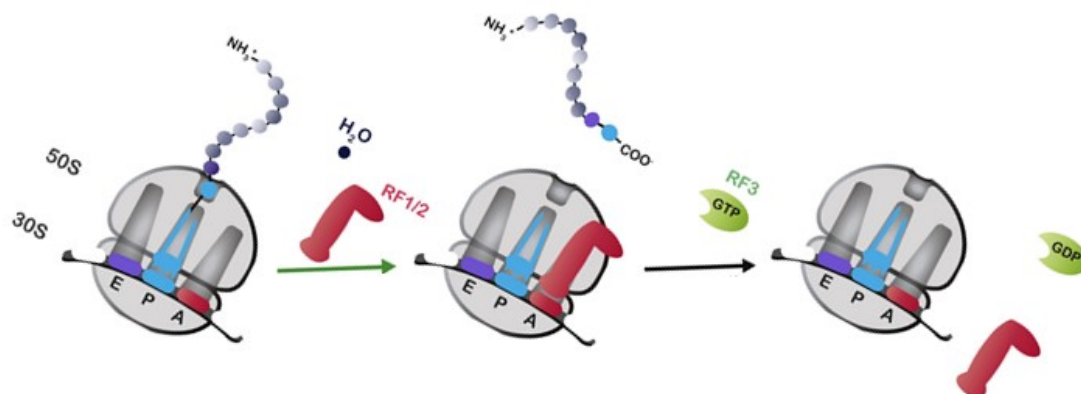
Prázdne A miesto umožní naviazanie ďalšej aminoacyl-tRNA spolu s EF-Tu s naviazaným GTP. V prípade správnej komplementarity kodón-antikodón dôjde ku konformačnej zmene, ktorá stabilizuje väzbu tRNA a zároveň EF-Tu hydrolyzuje GTP (Savir & Tlusty, 2013). To spôsobí umiestnenie aminoacylového konca tRNA do A miesta s peptidyltransferázovou aktivitou v 50S podjednotke. Vytvorenie väzby zahŕňa deacyláciu tRNA v mieste P a prenos peptidového reťazca na tRNA v mieste A. Peptidová väzba medzi nascentným peptidom a novo pripojenou aminokyselinou vzniká veľmi rýchlo a spontánne (G. Dinos et al., 2005; Pape et al., 1998). Výsledkom je ribozóm, ktorý obsahuje vo svojom E mieste deacylovanú tRNA, v P mieste peptidyl tRNA a prázdne A miesto, ktoré je pripravené na ďalšie naviazanie aminoacyl tRNA komplementárnej k príslušnému kodónu na mRNA. Na translakáciu mRNA a tRNA je potrebná energia vo forme hydrolýzy GTP pomocou EF-G (G. Dinos et al., 2005; Ramakrishnan, 2002). Schematické znázornenie translácie je uvedené v obrázku 3.



Obrázok 3. – Schematické znázornenie translácie (Doherty & Guo, 2016) – prevzaté a upravené

Translácia je ukončená v momente kedy v A mieste dôjde k prezentácii STOP kodónu na mRNA. Za termináciu translácie sú zodpovedné tzv. "release" faktory (RF), ktoré rozdeľujeme do dvoch tried. Prvú triedu tvoria RF1 a RF2. RF1 rozpoznáva UAA a UAG stop kodóny, zatiaľ čo RF2 rozpoznáva UAA a UGA. Druhú triedu tvorí RF3, ktorý sa vyznačuje GTPázovou aktivitou. Tento faktor sa viaže na komplex RF1 alebo RF2 s ribozómom. Naviazanie RF1 alebo RF2 na ribozóm s príslušným antikodónom v A mieste spôsobí, že RF1 a RF2 hydrolyzuje a uvoľňuje polypeptidový reťazec z tRNA v P mieste ribozómu (Ramakrishnan, 2002). RF3 zohráva úlohu pri recyklácii ribozómu (Zaher & Green, 2011).

Novšie štúdie poukazujú, že RF3 nemusí striktne viazať len GTP/GDP. Do rovnakého miesta sa taktiež viaže ppGpp, čo naznačuje že GDP a ppGpp sú fyziologický dôležitý ligand RF3. Okrem tejto funkcie ppGpp môže negatívne regulovať RF1 a to spomalením jeho recyklácie (obr. 4) (Kihira et al., 2012).



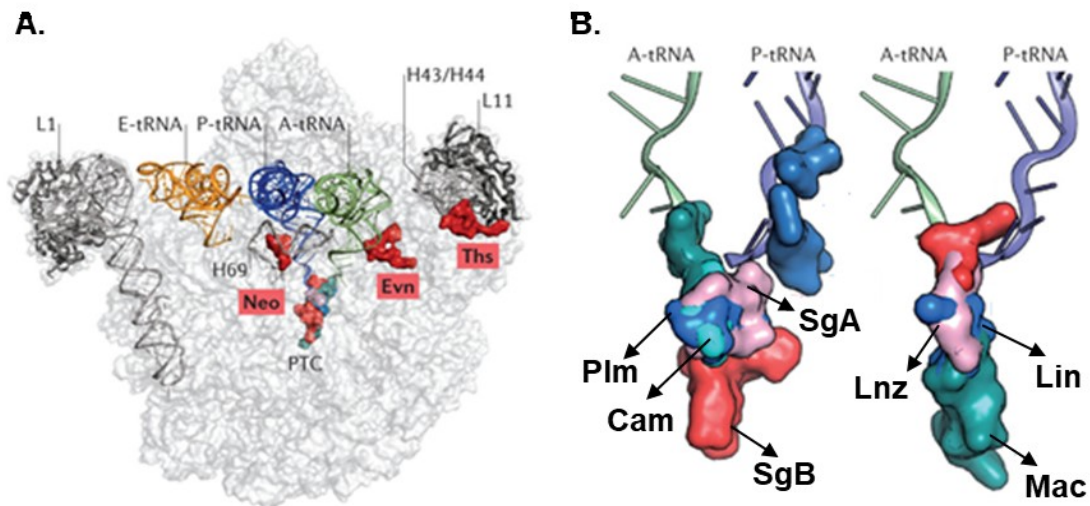
Obrázok 4. – Úloha RF faktorov v terminácii translácie. V prvom kroku dochádza k uvoľneniu polypeptidového reťazca z ribozómu (P-miesto). V druhom kroku, pomocou RF3 dôjde k uvoľneniu RF1/2 z A-miesta. (Zaher & Green, 2011) – prevzaté a upravené.

Po uvoľnení polypeptidového reťazca z P miesta, ostáva intaktný ribozóm spolu s naviazanou mRNA. Na to aby bol ribozóm pripravený na nové kolo syntézy polypeptidov je nutný vstup do jeho poslednej fázy a to recyklácie ribozómu. Aby došlo k disociácii ribozómu a uvoľneniu mRNA je nutné naviazanie ribozomálneho recyklačného faktora (RRF) spolu s EF-G. Hydrolyzou GTP v komplexe ribozóm-RRF-EF-G dochádza k uvoľneniu mRNA, tRNA a intaktného ribozómu. Následne je ribozóm pripravený vstúpiť do ďalšieho cyklu proteosyntézy

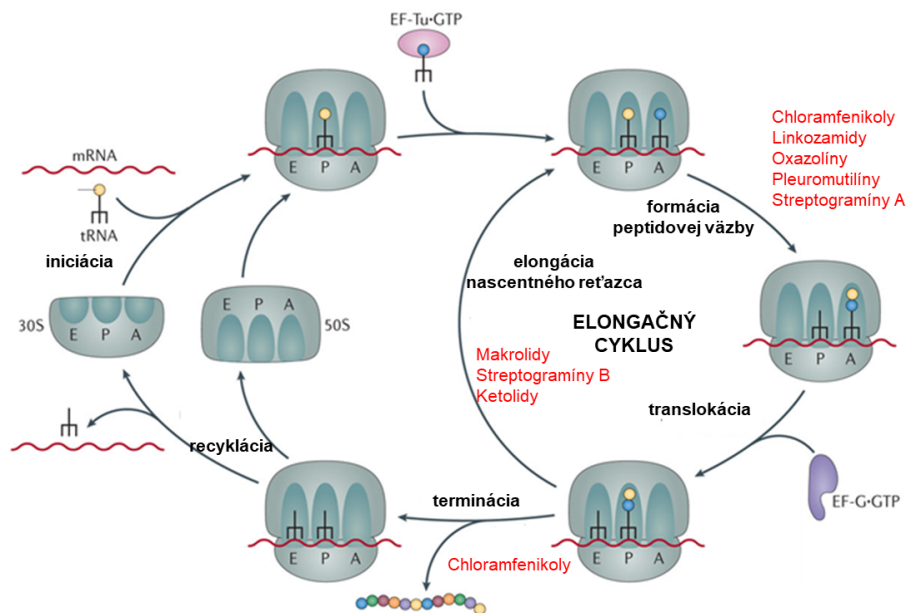
naviazaním IF3 na 30S podjednotku, kedy dôjde opäť k disociácii 30S a 50S ribozomálnej podjednotky. Rýchlosť akou translácia prebieha závisí okrem iného aj na špecifickosti každej mRNA (Kaji et al., 2001; Ramakrishnan, 2002).

2.2. Antimikróbne látky inhibujúce proteosyntézu – PTC inhibítory

Látky inhibujúce transláciu väzbou na 50S ribozomálnu podjednotku sú znázornené na obrázku 5 a 6.



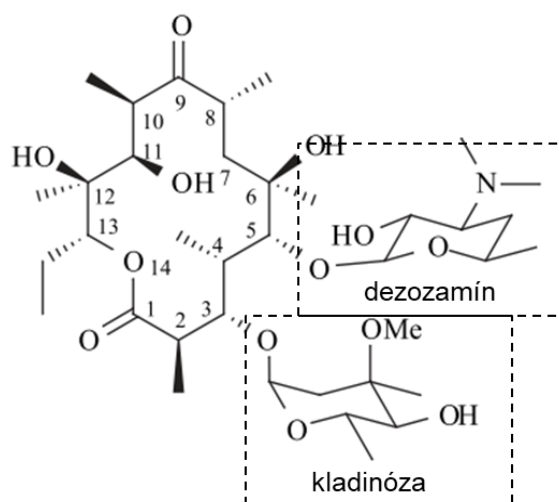
Obrázok 5. – Väzobné miesta antibiotík na 50S ribozomálnej podjednotke. A. 50S ribozomálna podjednotka s vyznačeným PTC. B. Väzba antibiotík v blízkosti PTC (Plm-pleuromutilín, Cam-chloramfenikol, SgA-streptogramín A, SgB-streptogramín B, Lnz-linezolid, Lin-linkomycín, Mac-makrolidy). (Wilson, 2014) – prevzaté a upravené.



Obrázok 6. – Schématické znázornenie antibiotík viažucich sa do 50S podjednotky bakteriálneho ribozómu a ich mechanizmus inhibičnej funkcie (Wilson, 2014) – prevzaté a upravené.

2.2.1 Makrolidové antibiotika

Makrolidové antibiotika sa v praxi využívajú od roku 1950. Typickým prototypom týchto antibiotík je 14-členný makrolid izolovaný z producenta *Streptomyces erythreus* – erytromycín (Washington & Wilson, 1985a, 1985b). Chemická štruktúra makrolidových antibiotík pozostáva z makrocyclického laktonového kruhu, na ktorom sú pripojené dve cukornaté skupiny - dezozamín a kladinóza (obr. 7). Medzi ďalšie prírodné 14-členné analógy makrolidov patrí oleandomycín, spiramycín a josamycín. Medzi semisyntetické analógy patrí 14-členný klaritromycín a 15-členný azitromycín, ktorý obsahuje atóm dusíka inkorporovaný do laktonového kruhu. Výhodou týchto semisyntetických derivátov je širšie antimikróbne spektrum a menej nežiadúcich účinkov v porovnaní s erytromycínom (Gaynor & Mankin, 2005).

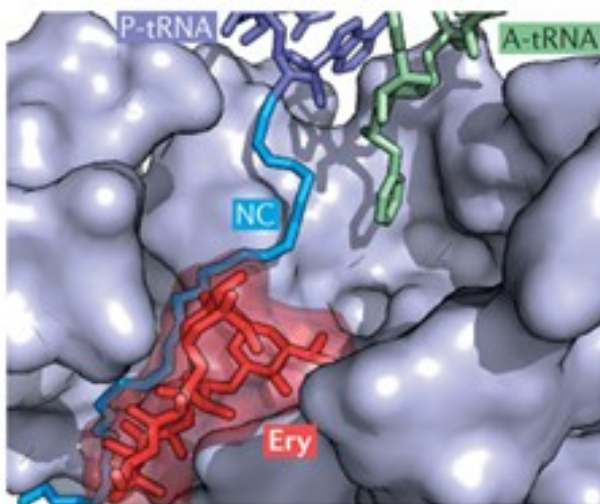


Obrázok 7. – Chemická štruktúra erytromycínu A s vyznačenými cukornatými zložkami dezozamínom a kladinózou (Gaynor & Mankin, 2005) – prevzaté a upravené.

Makrolidy sú pomerne širokospektrálne antibiotika, ktoré zahŕňajú antimikróbnu aktivitu ku gram-pozitívnym a niektorým gram-negatívnym baktériám, mykoplazmam, chlamýdiám, treponemám a riketsiam (Schentag & Ballow, 1991; Williams & Sefton, 1993).

Mechanizmus účinku spočíva v reverzibilnej väzbe do 23S rRNA v 50S ribozomálnej podjednotke. Lokalizácia väzby makrolidov je v oblasti vznikajúceho nascentného peptidu distálne od peptidyltransferázového miesta vo výstupnom tunely pre polypeptidový reťazec

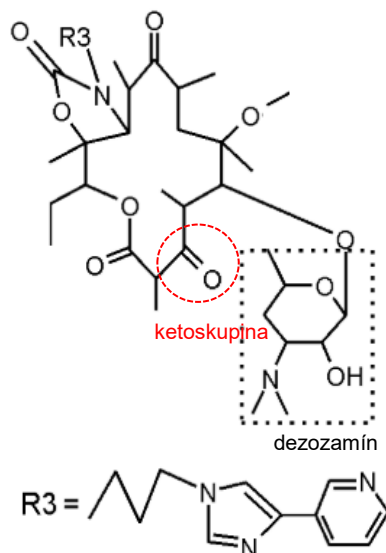
(obr. 8). Výstupný tunel pre polypeptidový reťazec je pomerne široký (15 Å). Výnimku tvorí oblasť zúženia, ktorá je spôsobená L4 a L22 ribozómalnými proteínmi. V minulosti sa predpokladalo, že práve väzba makrolidov v tejto oblasti, spôsobí výrazne zúženie čo sa prejaví blokovaním výstupu polypeptidového reťazca (Gaynor & Mankin, 2005). Novšie štúdie poukazujú na to, že inhibícia závisí aj od druhu peptidu ktorý je momentálne translatovaný (napr. povaha aminokyseliny) (Kannan et al., 2014)



Obrázok 8. – Väzba erytromycínu (červený) do výstupného tunelu pre polypeptidový reťazec v 50S ribozómalnej podjednotke, ktorej výsledkom je blokovanie výstupu nascentného polypeptidového reťazca (modrý) (Wilson, 2014) – prevzaté a upravené.

2.2.2. Ketolidy

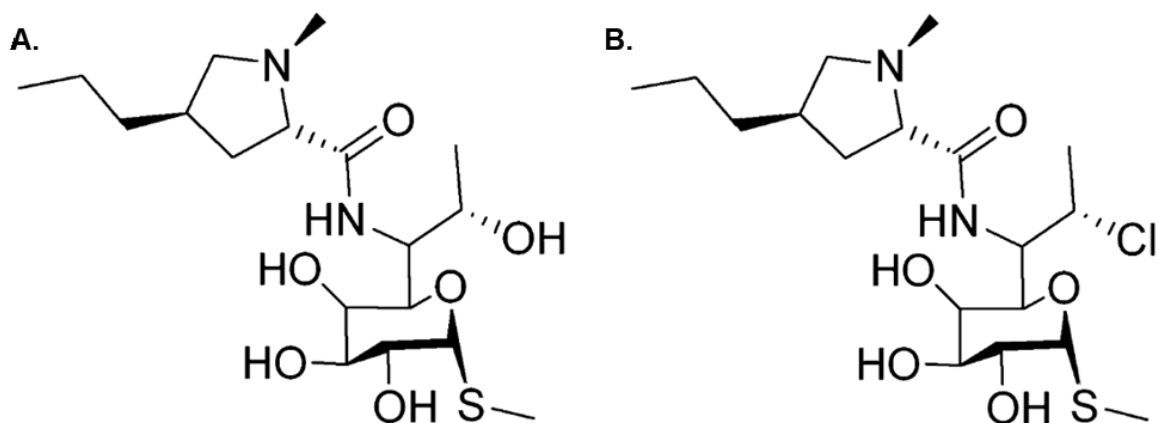
Ketolidy patria medzi semisyntetické deriváty erytromycínu A, ktoré obsahujú namiesto L-kladinózy ketoskupinu (obr. 9). Práve táto zámena spôsobila zvýšenie stability a účinku liečiva voči gram-pozitívnym kokom (Ackermann & Rodloff, 2003). Ketolidy sa vyznačujú neschopnosťou indukcie MLS_B fenotypu spôsobenou Erm metylázami. Avšak konštitutívny fenotyp MLS_B rezistencie nie je ketolidmi ovplyvnený. Mutácia v L4 alebo L22 proteíne, môže viesť k rezistencii na ketolidy. (Ackermann & Rodloff, 2003; Hisanaga et al., 2005).



Obrázok 9. - Chemická štruktúra telitromycínu s vyznačenou ketoskupinou a deozamínom. (Vimberg et al., 2004) – prevzaté a upravené.

2.2.3 Linkozamidy

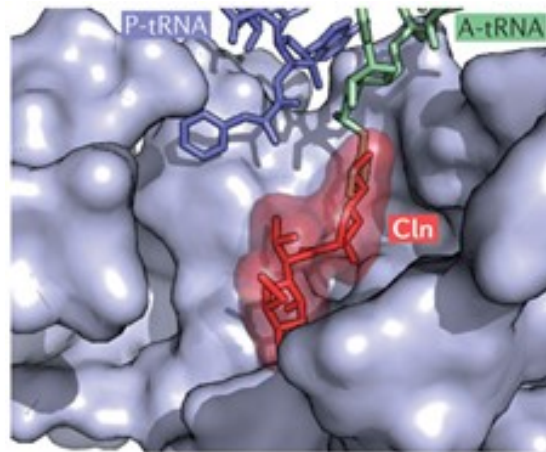
Medzi linkozamidové antibiotiká patria linkomycín a klindamycín (obr. 10). Linkozamidy sú tvorené cukornou zložkou metyltiolinkozamidu a aminokyselinového derivátu propylprolínu. Linkomycín bol prvotne vyizolovaný zo *Streptomyces lincolnensis*, zatiaľ čo klindamycín predstavuje jeho chemicky modifikovaný semisyntetický derivát, ktorý je pripravovaný chloráciou linkomycínu. Práve molekula chlóru v klindamycíne je zodpovedná za zvýšenie účinnosti antibiotika (McGehee et al., 1968; Morar et al., 2009).



Obrázok 10. - Chemická štruktúra linkomycínu (A) a klindamycínu (B) (Morar et al., 2009) – prevzaté a upravené.

Linkozamidy zahŕňajú široké spektrum gram-pozitívnych kokov a anaeróbných baktérii. V závislosti od koncentrácie liečiva a bakteriálneho druhu môže byť ich mechanizmus pôsobenia baktericídny alebo bakteriostatický (klindamycín). (Leclercq, 2002; McGehee et al., 1968).

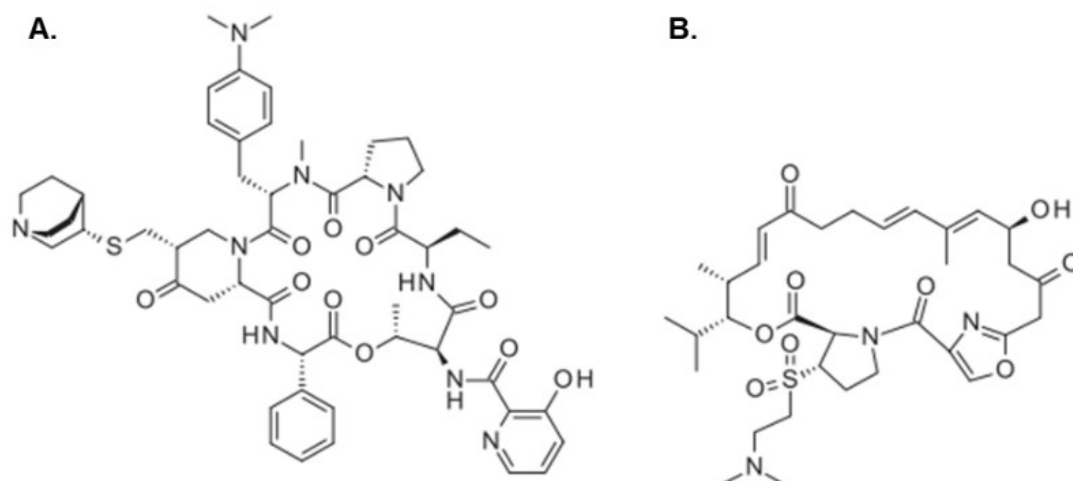
Linkozamidy sa taktiež viažu do 23S rRNA 50S ribozomálnej podjednotky. Pôsobia v PTC a ovplyvňujú proces iniciácie tvorby polypeptidového reťazca. Zároveň môžu stimulovať disociáciu peptidyl-tRNA z ribozómov (obr. 11). Napríklad u klindamycínu je výsledná dĺžka disociovej peptidyl-tRNA v rozsahu 2-4 aminokyselinových zbytkov (Rezanka et al., 2007; Tenson et al., 2003).



Obrázok 11. - Väzba klindamycínu do 50S ribozomálnej podjednotky (Wilson, 2014) – prevzaté a upravené.

2.2.4. Streptogramíny

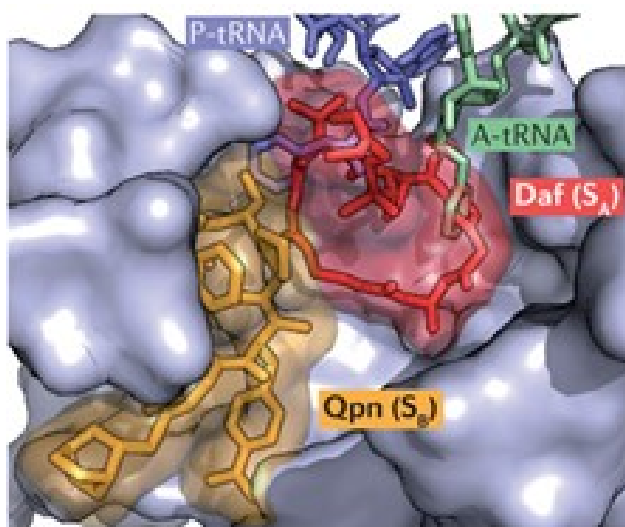
Streptogramíny sú prírodné cyklické peptidy, produkované rodom *Streptomyces*. Charakteristikou týchto liečiv je kombinácia streptogramínov skupiny A a B, ktoré majú synergistický účinok. Streptogramíny A sú polynasaturované cyklické makrolaktóny, napr. pristinamycín IIA, pristinamycín IIB, virginamycín M. Streptogramíny B sú cyklické hexadepsipeptidy, napr. pristinamycín IA, pristinamycín IC, virginamycín S. Ako prvé streptogramínové liečivo bolo v USA do klinickej praxe zavedené quinupristín-dalfopristín (Synercid) v pomere 30:70, čo sú deriváty pristinamycínu IA a pristinamycínu IIA (obr. 12) (Cocito et al., 1997; Hancock, 2005; Pechere, 1999).



Obrázok 12. - Chemická štruktúra quinupristínu (A.) a dalfopristínu (B.) (Alihodzic et al., 2018)-
upravené a prevzaté.

Streptogramíny sú účinné voči gram-pozitívnym baktériám, avšak u gram-negatívnych a anaeróbných baktérií je ich účinok výrazne nižší (Bockstael & Van Aerschot, 2009).

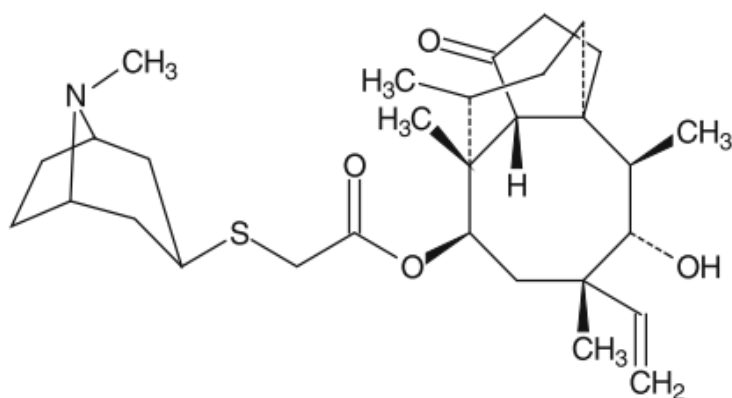
Mechanizmus účinku spočíva v ireverzibilnej väzbe streptogramínov do 50S bakteriálnej podjednotky. Oba skupiny streptogramínov sa vzájomne líšia v mechanizmu účinku. Mechanizmus streptogramínov A spočíva v zabránení vytvorenia peptidovej väzby v elongačnej fáze translácie. Streptogramíny B spôsobujú uvoľnenie neúplných polypeptidových reťazcov z 50S ribozomálnej podjednotky (obr. 13). Synergistický účinok spočíva v pôsobení streptogramínov A, ktoré vytvoria konformačné zmeny v ribozóme čím dôjde k zvýšeniu afinity k streptogramínom B (Bockstael & Van Aerschot, 2009; Johnston et al., 2005; Vannuffel & Cocito, 1996).



Obrázok 13. - Väzba dalfopristínu (červene) a quinupristínu (žlte) do 50S ribozomálnej podjednotky a ich inhibícia väzby tRNA do A a P miesta (Wilson, 2014) – upravené a prevzaté.

2.2.5. Pleuromutilíny

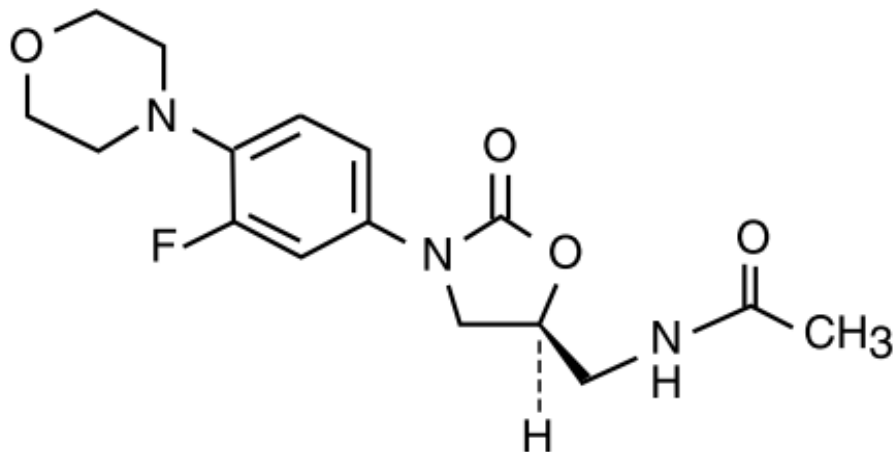
Retapamulín (obr. 14), tiamulín a lefamulín sú syntetické deriváty. Sú účinné voči kmeňom *Staphylococcus aureus* (vrátane MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* a viridujúcim streptokokom už v nízkych koncentráciách, ale taktiež aj u izolátoch rezistentných k beta-laktámovým liečivám (Scangarella-Oman et al., 2009; Yang & Keam, 2008). Mechanizmus účinku spočíva vo väzbe do 50S bakteriálnej podjednotky a jej inhibícii elongačnej fázy bakteriálnej proteosyntézy zabránením tvorbe peptidovej väzby (Yan et al., 2006).



Obrázok 14. - Chemická štruktúra retapamulínu (Yang & Keam, 2008) – upravené a prevzaté.

2.2.6. Oxazolíny

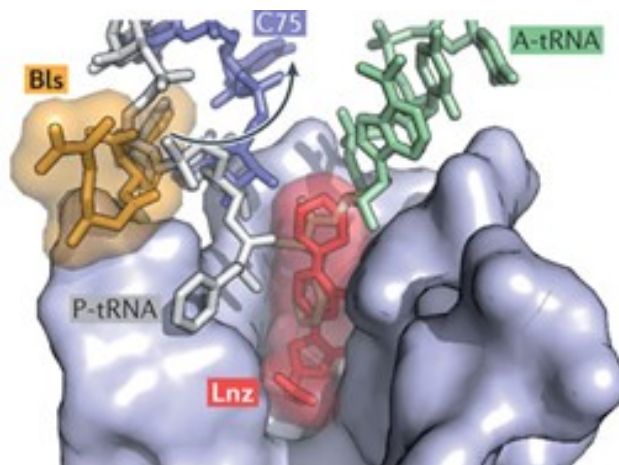
Oxazolíny sú syntetické antimikrobiálne látky objavené v roku 1970 (Das et al., 2009). K linezolidu (obr. 15), ktorý bol dlho ako jediný využívaný v klinickej praxi, pribudol tedizolid, ktorý sa využíva prevažne k liečbe akútnych bakteriálnych infekcií kože a jej štruktúr. V klinických a predklinických štúdiách sú testované aj iné analógy oxazolínov (Das et al., 2009; Marchese & Schito, 2001).



Obrázok 15. - Chemická štruktúra linezolidu (Marchese & Schito, 2001) – upravené a prevzaté.

Oxazolíny sa využívajú pri liečbe bakteriálnych ochorení spôsobených gram-pozitívnymi kokmi a mykobakteriami. Linezolid sa využíva pri liečbe ochorení spôsobenými stafylokokmi (vrátane MRSA), streptokokmi a enterokokmi (vrátane MDR enterokokov) (Clemett & Markham, 2000; Livermore, 2003).

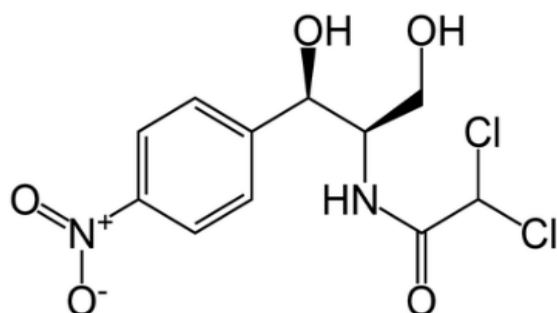
Podľa novších štúdií mechanizmus účinku spočíva v inhibícii bakteriálnej proteosyntézy, v kontexte dependentného inhibítora translácie, podobne ako u makrolidov, kedy k inhibícii dochádza v prípade, že sa v polypeptidovom reťazci objaví alanín (obr. 16) (Choi et al., 2020).



Obrázok 16. - Linezolid (červene) a jeho väzba v A mieste bakteriálneho ribozómu (Wilson, 2014) – upravené a prevzaté

2.2.7. Amfenikoly

Chloramfenikol je nitrobenzénové cyklické antibiotikum izolované zo *Streptomyces venezuelae*. Disponuje širokospektrálnym antimikróbnyim účinkom u vážne chorých pacientov. Napr. v USA je jeho použitie v klinickej praxi zriedkavé z dôvodu jeho toxicity. Vo svojej molekule obsahuje atómy chlóru (obr. 17) (Pilehvar et al., 2012; Sood, 2016). Nové štúdie poukazujú na presnejší mechanizmus rezistencie, ktorý obsahuje podobné rysy ako u linezolidov. Prítomnosť alanínu, treonínu a serínu v polypeptidovom reťazci vedie k inhibícii proteosyntézy. Navyše bočné reťazce týchto aminokyselín zvyšujú afinitu ribozómu a chloramfenikolu (Syroegin et al., 2021).



Obrázok 17. - Chemická štruktúra chloramfenikolu (Pilehvar et al., 2012) – upravené a prevzaté.

2.3. Mechanizmy rezistencie antimikróbnych látok inhibujúcich proteosyntézu u stafylokokov.

Schopnosť baktérii prežívať v prostredí závisí nielen od jej faktorov virulencie a patogenity, ale aj od mechanizmov rezistencie na antimikróbne látky. Práve gény zodpovedné za rezistenciu na antimikróbne látky, sú zodpovedné za to, že sa vďaka rezistencii stáva liečba neúčinná. To umožňuje ich prežívanie a šírenie v prostredí, hlavne v nemocničnom, čo značne komplikuje iné invazívne lekárske zákroky.

Baktérie disponujú širokým spektrom mechanizmov rezistencie voči antimikróbnyh látkam pôsobiacich na 50S ribozomálnej podjednotke. Medzi základné rozdelenie mechanizmov rezistencie patrí: modifikácia cieľového miesta, efluxný mechanizmus, enzymatická inaktivácia a ochrana bakteriálneho ribozómu.

2.3.1. Modifikácia cieľového miesta

Modifikácia cieľového miesta vedie k strate schopnosti väzby na ribozóm. Táto modifikácia zahŕňa bodové mutácie, delécie alebo metylácie (modifikácie) ribozómov.

a) bodové mutácie a delécie

Mutácie v 23S rRNA môžu viesť k zvýšenej rezistencii k makrolidom, linkozamidom, streptogramínom B a taktiež k linezolidom u gram-pozitívnych a gram-negatívnych baktérií. Najčastejší výskyt mutácií sa nachádza v L4 a L22 proteíne. Pre druh *Staphylococcus aureus* je najčastejší výskyt v L22 (Roberts, 2008). Mutácie v proteíne L4 a L22 sú pravdepodobne zodpovedné za rozšírenie výstupného kanálu, cez ktorý môže polypeptidový reťazec obchádzať miesto zúženia, alebo môže brániť väzbe erytromycínu (Gabashvili et al., 2001).

Veľmi vysoký výskyt mutácií sa nachádza v 23S rRNA doméne V s mutáciami v pozíciách A2058 a A2059 (číslovanie podľa *Escherichia coli*). Mutácie v iných pozíciách sú spojené so zvýšenou rezistenciou k linezolidom (Roberts, 2008). Typickým príkladom bodovej mutácie je rezistencia na linezolid. Pri tomto type rezistencie dochádza k bodovej mutácii G2576U (číslovanie podľa *Escherichia coli*) v 23S rRNA. Ďalším typom rezistencie na oxazolíny bol popísaný u kmeňa *Streptococcus pneumoniae*. Jedná sa o deléciu 6 bp v géne, ktorý kóduje L4 ribozómálny proteín (Marshall et al., 2002; Roberts, 2008).

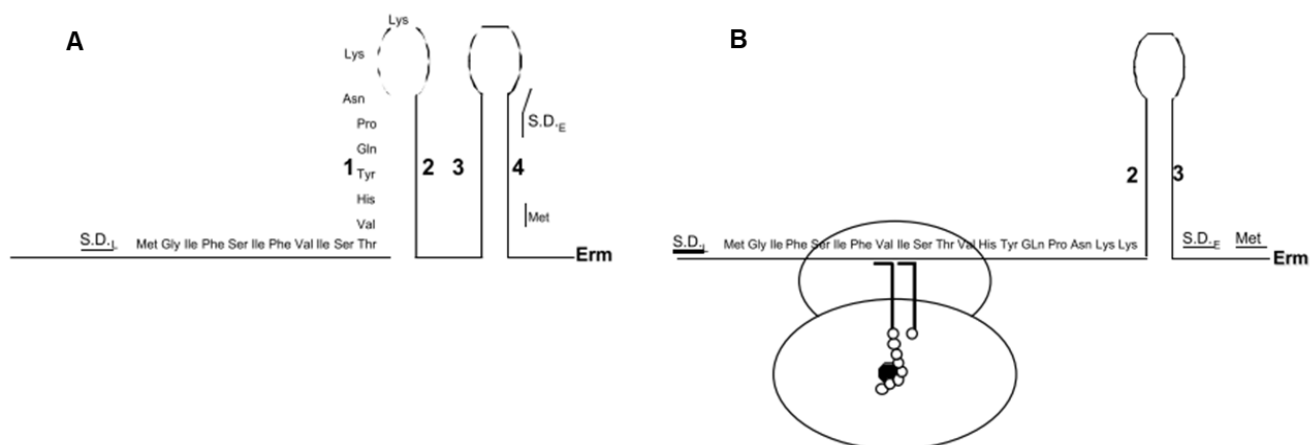
b) metylácia v 23S rRNA oblasti

Ribozomálna metylácia patrí medzi najznámejšie mechanizmy rezistencie k makrolidovým, linkozamidovým a streptogramínovým antibiotikám. U stafylokokov sú najznámejšie vyskytujúce sa gény zodpovedné za ribozomálnu metyláciu *erm* a *cfr*.

Metylácia ribozomálneho cieľového miesta vedie ku skříženej rezistencii k makrolidom, linkozamidom a streptogramínom B, označovaný ako MLS_B fenotyp (Leclercq, 2002). Za tento mechanizmus sú zodpovedné *erm* gény kódujúce Erm metylázy, ktoré sú zodpovedné za metyláciu (mono-, di-) bakteriálnej 23S rRNA v V. doméne v pozícii A2058. Dimetylácia v pozícii A2058 drasticky znižuje afinitu voči makrolidom, linkozamidom a streptogramínom B. Samotná metylácia bráni väzbe makrolidu na ribozóm, presnejšie neschopnosti naviazania sa dezozamínu cez molekulu vody na väzobné miesto ribozómu (Svetlov et al., 2021). Preto baktérie obsahujúce Erm dimetylázy udeľujú rozsiahlejšiu rezistenciu k MLS_B antibiotikám v porovnaní s monometylázami. Monometylázy udeľujú rezistenciu len k linkozamidom, zatiaľ čo makrolidy ostávajú citlivé. Plne zostavený ribozóm nie je substrátom pre Erm metylázy, z toho dôvodu, že A2058 sa nachádza hlboko vo vnútri veľkej ribozomálnej podjednotky, ktorá nie je prístupná pre metylázu. Expresia *erm* génov môže byť konštitutívna, alebo indukibilná. (Bockstael & Van Aerschot, 2009; Gaynor & Mankin, 2005; Munita & Arias, 2016).

U patogénnych baktérii boli detegované 4 triedy Erm metyláz: gény *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* a *erm(F)*. *erm(A)* a *erm(C)* sú typické pre stafylokoky, *erm(B)* pre streptokoky a enterokoky, zatiaľ čo u rodu *Bacterioides* sa vyskytujú prevažne *erm(F)* (Roberts et al., 1999).

U expresie *erm* génov rozlišujeme indukibilný a konštitutívny typ rezistencie. U stafylokokov v prípade indukibilnej rezistencie sú induktorom 14- a 15-členné makrolidy, zatiaľ čo 16-členné makrolidy, linkozamidy a streptogramíny B nemajú charakter induktora. Celý mechanizmus je regulovaný pomocou atenuácie translácie (Leclercq, 2002). V prítomnosti erytromycínu dôjde k vytvoreniu v ORF v oblasti 8.-9. kodónu k tzv. leader peptidu, kde dôjde k pozastaveniu ribozómu, čo má za následok zmenu konformácie na mRNA (obr. 18). Zmenou konformácie dôjde k otvoreniu RBS miesta a aktivácii translácie Erm metylázy (Gaynor & Mankin, 2005).



Obrázok 18. – Inducibilný typ Erm rezistencie. Sekundárna štruktúra veducej oblasti mRNA kodujúca vedúci peptid a Erm metyltransferázu. A. neindukovaná konformácia, B. indukovaná konformácia (Gaynor & Mankin, 2005) – prevzaté a upravené.

Ďalším typom metylázy je Cfr metyláza. Cfr gén bol povodne objavený v izolátoch *Staphylococcus spp.* živočíšneho pôvodu. Cfr gény kódujú metyltransferázy, ktoré sú zodpovedné za metyláciu A2503 v pozícii C-8. Tento typ rezistencie sa označuje aj ako PhLOPS_A (Fenikoly, Linkozamidy, Oxazolíny, Pleuromutilíny a Streptogramíny A) (Giessing et al., 2009; Long et al., 2006).

2.3.2. Efluxný mechanizmus

K antibiotikám pôsobiacim vo vnútri bakteriálnej bunky, si baktérie počas evolúcie vyvinuli mechanizmy pomocou, ktorých môžu úspešne transportovať antibiotikum von z bakteriálnej bunky. Výsledkom je ďalšie prežívanie a schopnosť baktérii prispôbiť sa pre nich nehostinnému prostrediu. Majoritná väčšina týchto transportérov sa nachádza na vnútornej strane membrány a na transport antimikróbných látok využívajú protón motívnu silu (Bockstael & Van Aerschot, 2009; Munita & Arias, 2016). Efluxné pumpy exportujúci antibiotika spadajú do 5 rodín: MFS (M-major F-facilitator S-superfamily), SMR (S-small M-multidrug R-resistance family), RND (R-resistance N-nodulation cell D-division family), ABC (A-ATP B-binding C-cassette family), MATE (M-multidrug A-and T-toxic compound E-extrusion family) (Munita & Arias, 2016).

Druhý najčastejší mechanizmus rezistencie u makrolidov predstavujú efluxné pumpy, ktoré sú kódované *mef* génmi u gram-pozitívnych baktérii a Arc-AB-TolC u *Haemophilus influenzae* a *Escherichia coli*. Arc-AB-TolC efluxné pumpy udeľujú vrodenu rezistenciu. Tento

typ rezistencie je označovaný aj ako M fenotyp udeľujúci rezistenciu k makrolidom. Najčastejšou determinantou je *mef(A)* izolovaná z kmeňa *Streptococcus pneumoniae* a *mef(E)* izolovaný z kmeňa *Streptococcus pyogenes* (Del Grosso et al., 2002; Zhong & Shortridge, 2000). Ďalším príkladom je MDR efluxna pumpa zodpovedná za rezistenciu k chloramfenikolom. Prvý gén *cmIA* kódujúci efluxnu pumpu bol objavený v transpozóme Tn1696 (Bissonnette et al., 1991). *FloSt* gén kódujúci ďalší typ MDR efluxnej pumpy zodpovedný za rezistenciu k chloramfenikolu u kmeňa *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium DT104 (Bolton et al., 1999).

2.3.3. Enzymatická inaktivácia

Baktérie môžu disponovať génmi, ktoré sú zodpovedné za produkciu enzýmov, ktoré interagujú s antimikróbnym liečivom, ktorých cieľom je modifikácia antibiotika a prevedenie jeho formy z aktívnej na neaktívnu (Bockstael & Van Aerschot, 2009).

Dodnes bolo objavených mnoho enzýmov, ktoré pôsobia na antibiotika viažuce sa do 50S ribozomálnej podjednotky. Medzi enzýmy inaktivujúce makrolidy patria: esterázy kódované *ereA* a *ereB* génmi, ktoré štiepia makrocyclický ester (Morar et al., 2012), fosforylázy kódované *mphA* a *mphB* (*Escherichia coli*) a *mphC* (*Staphylococcus aureus*) génmi, kedy fosforylujú hydroxylové skupiny na cukornatej zložke antibiotika (Chesneau et al., 2007; Matsuoka et al., 2003) a glykozylázy kódované *mtg* génmi (Roberts, 2008; Wright, 2005). Streptogramín A acetyltransferázy sú zodpovedné za acetyláciu streptogramínov A, ktoré sú kódované génmi *vat(A-E)*. Špecifická rezistencia k streptogramínom B je sprostredkovaná pomocou lyáz, ktorá je kódovaná génmi *vgb(A)* a *vgb(B)* (Soltani et al., 2000; Woodford, 2005). *Lnu(A)* kóduje nukleotidyltransferázu, ktorá je zodpovedná za enzymatickú inaktiváciu linkomycínu, tým že modifikuje hydroxylové skupiny antibiotika (Leclercq, 2002; Woodford, 2005). Acetyltransferázy, ktoré predstavujú najčastejší typ rezistencie k fenikolom kódovaná génmi *catA-D* (*Staphylococcus aureus*) (Fitton & Shaw, 1979; Wright, 2005).

2.3.4. Ochrana bakteriálneho ribozómu pomocou ABC-F rezistenčných proteínov.

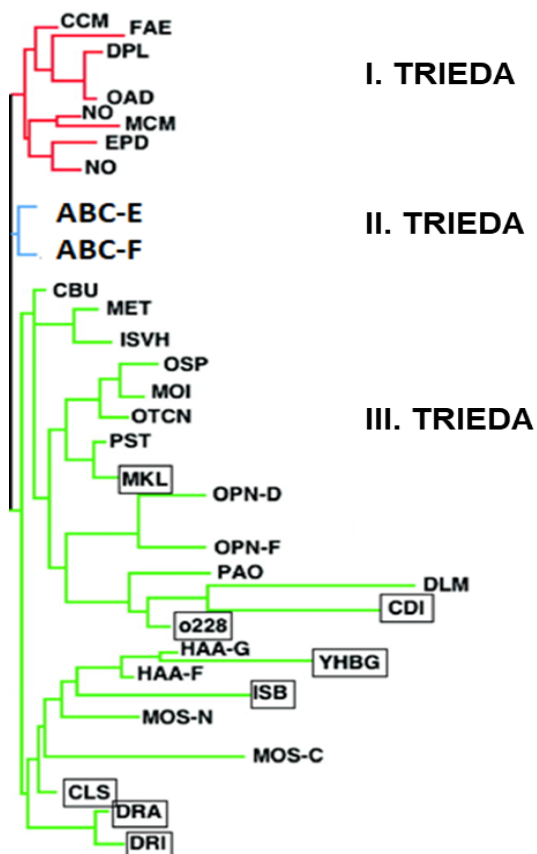
ABC-F proteíny udeľujúce rezistenciu k antibiotikám sa líšia svojou antibiotickou špecificitou. Podľa rezistenčného fenotypu je možné rozlíšiť ABC-F proteíny udeľujúce

rezistenciu k LS_AP (linkozamidom, streptogramínom A, pleuromutilínom), MS_B (makrolidom, streptogramínom B) a OP (oxazolín a pleuromutilín) antibiotikám. Vga(A), Lsa, SalA, Vlm(R) proteíny sa vyznačujú LS_AP fenotypom udeľujúcim rezistenciu k linkozamidom, streptogramínom A a pleuromutilínom (Chowdhury et al., 2009; Hot et al., 2014; Lenart et al., 2015; G. Novotna & Janata, 2006). Msr proteíny udeľujú rezistenciu k makrolidom a streptogramínom B a vyznačujú sa MS_B fenotypom (G. P. Dinos, 2017). OprtA a PoxTA proteíny sú zodpovedné za rozvoj OP fenotypu a jeho antibiotická špecificita je charakteristická k oxazolínom a pleuromutilínom (Wang et al., 2015).

Skutočný mechanizmus rezistencie spočívajúci v ochrane ribozómov, udeľovaný ABC-F proteínmi bol popísaný len nedávno (Boel et al., 2014; Chen et al., 2014; Crowe-McAuliffe et al., 2021; Crowe McAuliffe et al., 2021; Su et al., 2018). V minulosti sa o tomto mechanizme uvažovalo ako o transporte antibiotika (Chesneau et al., 2005). Rezistenčná funkcia týchto proteínov je podrobne popísaná v nasledujúcich kapitolách.

2.4. ABC proteíny

ABC proteíny tvoria najrozšírenejšiu nadrodinu proteínov, ktoré sú charakteristické svojou ATP-dependentnou aktivitou. Energiu vo forme hydrolýzy ATP využívajú na konformačné zmeny spojené s transportnými, regulačnými, alebo ochrannými funkciami (Vasiliou et al., 2009). Sú rozšírené naprieč všetkými organizmami. Zohrávajú dôležitú funkciu v udržaní intracelulárnej rovnováhy, transporte, ale aj v regulačných procesoch v bunkách. Napríklad u kmeňa *Escherichia coli* K-12 tvoria približne 10% genómu membranovo-väzobné proteíny a solubilné proteíny, ktoré zohrávajú úlohu v transportných procesoch (Wilkins, 2015). Z funkčného hľadiska môžeme ABC proteíny rozdeliť do troch tried na importéry, regulačné proteíny a exportéry (obr. 19). Podľa novej charakterizácie ABC proteínov boli na základe fylogenetickej analýzy 4505 genómov rozdelené tieto proteíny do ôsmich podrodín označovaných A-H (Dean et al., 2001). 2. trieda ABC proteínov je dnes označovaná ako ABC-E a ABC-F. ABC-F proteíny sa vyskytujú v širokom rozmedzí od eukaryot až po baktérie. Je známe,



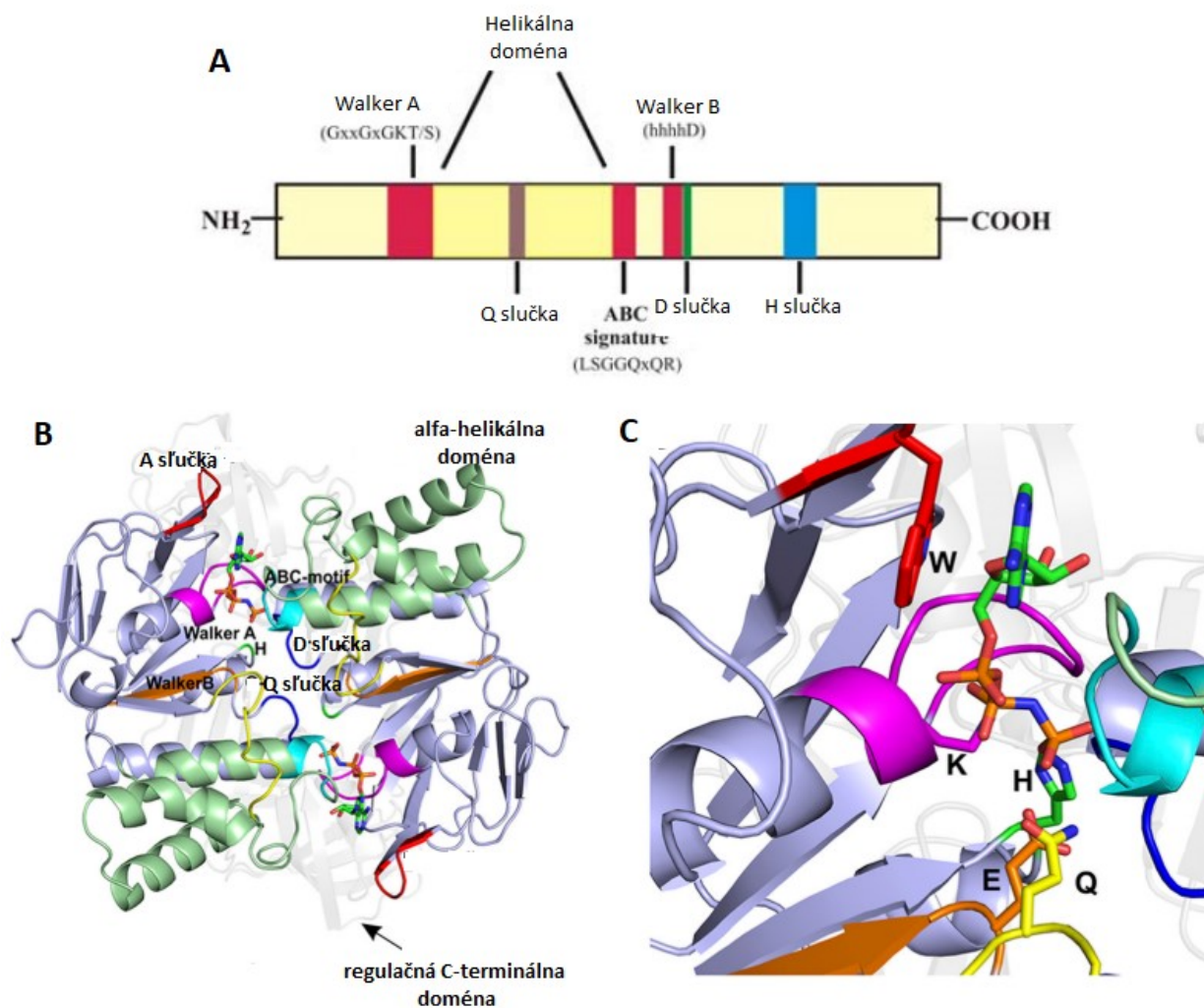
že na rozdiel od ABC-F sú ABC-E proteíny úzko späté s eukaryotickými organizmami (Sharkey et al., 2016).

Obrázok 19. – Fylogenetická klasifikácia troch základných tried ABC proteínov. 1. trieda tvorená importérmi, 2. trieda tvorená proteínmi, ktoré majú regulačnú funkciu a proteíny zohrávajúce úlohu v rezistencii, 3. trieda tvorená exportérmi. (Davidson et al., 2008) – prevzaté a upravené.

2.4.1. Štruktúra NBD diméru

Základom ABC proteínov je nukleotid väzobná doména (NBD) (obr. 20) označovaná aj ako ATP-väzobná doména je vo svojej štruktúre vysoko konzervovaná. Je zodpovedná za väzbu ATP a jeho následnú hydrolýzu na ADP a Pi. Uvoľnená energia je využitá na konformačnú zmenu proteínu, ktorá je esenciálna pri transporte látok (Wilkens, 2015). NBDs vo forme diméru, často nazývané ako sendvič, môžu zaujať dve konformačné zmeny, uzavretú a otvorenú. Uzavretá konformácia vzniká naviazaním dvoch molekúl ATP do NBDs. Po hydrolýze ATP dochádza k uvoľneniu ADP a Pi, ktoré je sprevádzané zmenou konformácie. Pri otvorenej konformácii sú NBDs čiastočne disociované. Čiastočná disociácia NBDs umožní ďalšie naviazanie ATP, ktoré je pripravené na jeho hydrolýzu a celý proces sa opäť opakuje.

Podrobnou analýzou bolo zistené, že NBD obsahuje P-slučku, alebo Walker A motív, ktorý je zodpovedný za väzbu fosfátu. Súčasťou NBDs je alfa-helikálna štruktúra LSGGQ, ktorá sa podieľa na hydrolýze fosfátu a je označovaná ako C-slučka (Wilkens, 2015). Okrem Walker A motívu je súčasťou domény aj Walker B motív, ktorý vo svojej sekvencii obsahuje štyri za sebou nasledujúce hydrofóbne aminokyseliny (XXXXDE, X-hydrofóbna aminokyselina), ktoré tvoria jeho základnú časť. Walker B motív pomocou aspartátového zvyšku napomáha koordinácii Mg^{2+} (Ter Beek et al., 2014). H-slučka je charakteristickou prítomnosťou vysoko konzervovaných histidínových zvyškov. D-slučka je naopak tvorená aminokyselinovou sekvenciou SALD, ktorá je lokalizovaná C-terminálne od Walker B motívu (Davidson et al., 2008). Kryštálovou štruktúrou maltozového transportéru MalFGK2 o vysokom rozlíšení sa ukázalo, že hydrolýza ATP je katalyzovaná pomocou glutamátového zvyšku na konci Walker B motívu. Walker B motív za účasti ďalších zvyškov v konzervovaných motívoch (D-, Q-, H- slučka) pomocou molekuly vody atakuje γ -fosfát na molekule ATP (Oldham & Chen, 2011). Q-slučka sa nachádza v mieste kontaktu medzi NBDs a TMDs (Licht & Schneider, 2011). Pomocou kryštalografických a spektrometrických experimentov bolo dokázane, že práve Q-slučka je zodpovedná za prenos hybnej sily z NBD na TMD (Orelle et al., 2010; Wilkens, 2015).



Obrázok 20. - Schematické znázornenie nukleotid väzobných domien. A - Lineárne znázornenie NBD s funkčnými miestami (Licht a Schneider, 2011 – prevzaté a upravené). B - Štruktúrne znázornenie NBD MalEFGK2 transportéra. Transmembránová doména nie je znázornená. C - Podrobný pohľad na nukleotid väzobné miesto (Beek, 2014) – prevzaté a upravené.

2.4.2. ABC-F podrodina ABC proteínov

Pre ABC-F proteíny je charakteristická ribozomálna funkcia. Do tejto podrodiny patria rezistenčné proteíny, ktoré rozdeľujeme na ARE1 až ARE7. Bolo dokázané, že sa zúčastňujú rozmanitých biologických procesov, od opravy poškodenej DNA, cez regulačné procesy v bunke (eEF3 u *Sacharomyces cerevisiae*) a v nemalej miere sú charakteristické schopnosťou udeľovať rezistenciu na antiinfekčné liečiva. Do nedávna nebol mechanizmus rezistencie úplne pochopený. Prvá hypotéza predpokladala, že sa tieto proteíny zúčastňujú exportu antibiotika (Chesneau et al., 2005; Reynolds et al., 2003). Druhá hypotéza predpokladala, že tieto proteíny odstraňujú antibiotikum z ribozómu, resp. ochraňujú ribozóm pred jeho väzbou. V posledných

rokoch sa stáva táto problematika viac objasnená, keďže *in vitro* experimenty poukazujú na to, že ich pôsobenie je asociované s ribozómom. Na základe poznatkov získaných v článku o EttA proteíne (Boel et al., 2014; Chen et al., 2014) bol navrhnutý aj pravdepodobný mechanizmus rezistencie u ABC-F proteínov, ktorý spočíval v ribozomálnej ochrane (Lenart et al., 2015). Biochemicky bol tento mechanizmus potvrdený pomocou *in vitro* transkripčnej/translačnej assay, u ktorej bola zachovaná aktivita v prítomnosti virginamycínu M a Vga(A). Naopak v prípade absencie Vga(A) došlo k inhibícii aktivity (Sharkey et al., 2016). Prvá štruktúra ABC-F proteínu na ribozóme bola detekovaná u Msr(E) proteínu (Su et al., 2018).

2.4.2.1. ABC-F proteíny udeľujúce rezistenciu k antiinfekčným liečivám viažucich sa do 50S ribozomálnej podjednotky.

ABC-F proteíny zabezpečujú ochranu pred makrolidmi, linkozamidmi, streptogramínmi A a B, pleuromutilínmi, ketolidmi, oxazolidinónmi a fenykolmi (Sharkey & O'Neill, 2018). Tieto rezistenčné proteíny sa vyskytujú ako u producentov antibiotík, napríklad linkomycínu, oleandromycínu, virginamycínu u streptomycét, tak aj u patogénnych baktérii prevažne u stafylokokov, streptokokov a enterokokov (Sharkey et al., 2016). Na základe ich rezistencie voči určitým skupinám antibiotík rozlišujeme nasledujúce rezistenčné fenotypy.

2.4.2.1.1. Rezistenčné proteíny udeľujúce rezistenciu k linkozamidom, streptogramínom A a pleuromutilínom (LS_AP fenotyp rezistencie)

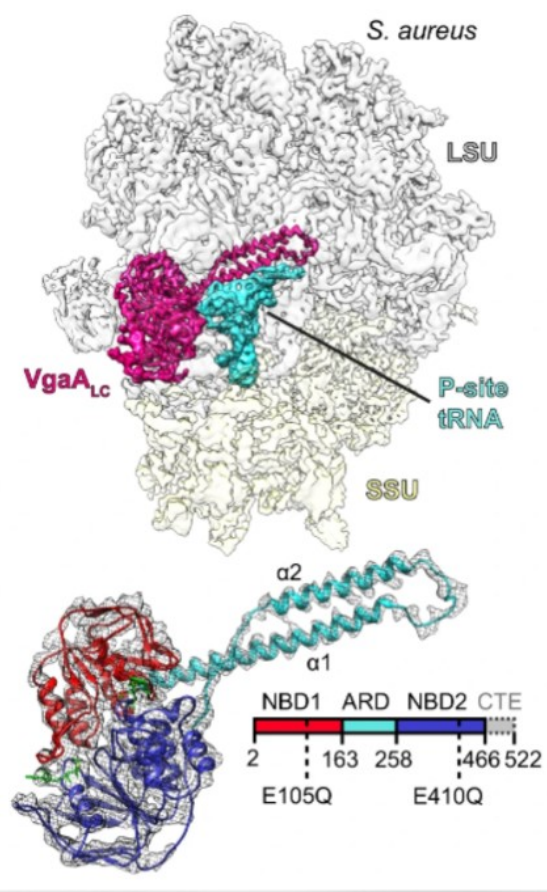
Do tejto skupiny rezistenčných proteínov udeľujúcich rezistenciu voči vyššie spomínaným antibiotikám patria Vga(A) a jeho varianty, SrpA, VlrM, LsaA a Sala.

Vga rezistenčný proteín bol po prvý krát objavený v kmeni *Staphylococcus aureus*, ktorý patrí do ARE1 podrodiny ABC-F proteínov. Gén *vga(A)*, ktorý udeľuje rezistenciu k LS_AP antibiotikám kóduje proteín tvorený 522 aminokyselinami a veľkosťou 60115 Da (Allignet et al., 1992)

Vga proteíny môžu byť kódované na plazmidoch alebo transpozónoch. Vga(A), Vga(A)v, Vga(B) boli prvotne popísané ako determinanty udeľujúce rezistenciu k streptogramínom A. V tejto práci boli testované dva stafylokokové kmene, *Staphylococcus aureus* RN4220 a *Staphylococcus epidermidis* BM3302 nesúce príbuzne *vga(A)* gény. Expresiou *vga(A)* a *vga(A)v* (identita 83,2%) sa zistilo, že tieto gény udeľujú rezistenciu nielen

k streptogramínom A ale aj k linkomycínu patriaceho medzi linkozamidy (Vga(A) – MIC_{LIN}=4mg/l, Vga(A)_v – MIC_{LIN}=8mg/l) (Chesneau et al., 2005). Ďalšou prácou bolo demonštrované, že Vga(A) proteíny môžu udeľovať rezistenciu taktiež k pleuromutilínom (Gentry et al., 2008).

V laboratóriu dr. Balíkovej Novotnej v roku 2006 boli v súbore klinických izolátoch koaguláza-negatívnych stafylokokov rezistentných voči metecilínu objavené kmene, ktoré vykazovali rezistenčný fenotyp nielen k streptogramínom A, ale taktiež aj k obom linkozamidom – linkomycínu a klindamycínu. Táto nová varianta bola označená ako Vga(A)_{LC} (G. Novotna et al., 2005; G. Novotna & Janata, 2006). Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteíny sa od seba líšia iba v siedmich aminokyselinových zvyškoch. Prvé substitúcie medzi Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteínom M4L a N9H sú lokalizované v N-terminálnej oblasti proteínu. Zvyšných päť aminokyselinových substitúcií L212S, G219V, A220T, G226S a S247R sú lokalizované v oblasti linkeru, ktorý sa nachádza medzi dvoma NBD (G. Novotna & Janata, 2006). Zároveň v tom istom roku dr. Balíková Novotná demonštrovala experiment, u ktorého poukázala na to, že bunky kmeňa *Staphylococcus haemolyticus* exprimujúceho *vga(A)_{LC}* akumulovali výrazne menšie množstvo rádioaktívne značeného linkomycínu ako bunky citlivého kmeňa. Týmto poukázala na to, že mechanizmus je rovnaký ako u Msr(A) (G. Novotna & Janata, 2006). Tak ako u väčšiny rezistenčných génov je ich expresia indukovaná prítomnosťou antibiotík. V prípade *vga(A)* a aj ostatných rezistenčných génov kodujúcich ABC-F proteíny sa jedná o mechanizmus atenuácie transkripcie (Sharkey et al., 2016; Vimberg et al., 2020). Napríklad u kmeňa *S. haemolyticus* exprimujúceho *vga(A)_{LC}*, klindamycín, ktorý udeľuje 4-krát nižšiu minimálnu inhibičnú koncentráciu ako linkomycín, pôsobí na tejto úrovni ako účinnejší induktor (Vimberg et al., 2020). Pomocou kryoelektronovej mikroskopie Vga(A)_{LC} mutant neschopných hydrolýzy ATP (E105Q, E410Q) bola detegovaná interakcia Vga(A)_{LC} proteínu s ribozómom. Štruktúra komplexu Vga(A)-EQ mutanty so 70S ribozómom ukázala, že proteín sa viaže do prázdneho E- miesta na 50S podjednotke. Linker, ktorý vyčnieva z NBD diméru siaha až do miesta väzby antibiotík (obr. 21). Zároveň bolo zistené, že linker Vga(A)_{LC} proteínu interaguje s P-miestom a čiastočne odkláňa v ňom sa nachádzajúcu tRNA. To či odstraňuje antibiotikum z ribozómu priamo, alebo sprostredkovane, tým, že mení konformáciu väzobného miesta nie je do dnes objasnené. S najväčšou pravdepodobnosťou sa jedná o kombináciu oboch mechanizmov. (Crowe McAuliffe et al., 2021).



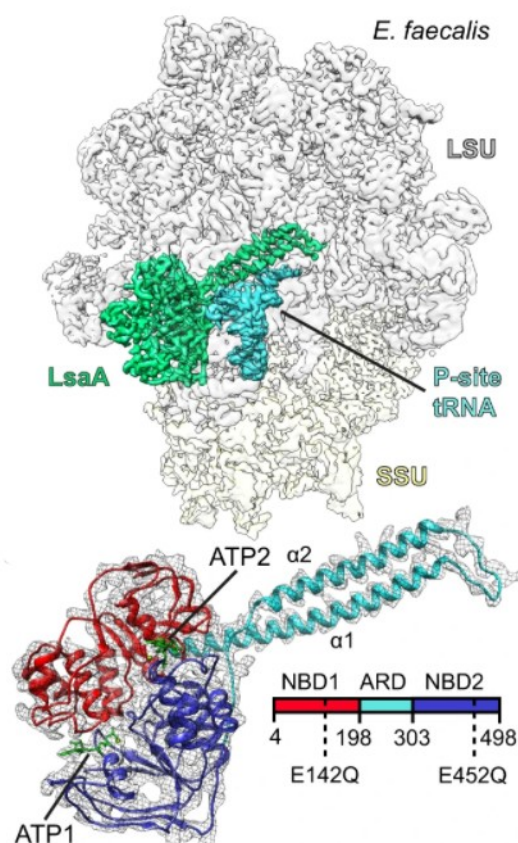
Obrázok 21. – Kryoelektronová mikroskopia- štruktúra Vga(A)_{LC} proteínu v komplexe s ribozómom. Rúžová – Vga(A)_{LC} proteín, modrá – P-miesto v 50S podjednotke ribozómu kmeňa *S. aureus* (Crowe-McAuliffe et al., 2021 – prevzaté a upravené).

SrpA proteín udeľuje rovnaký fenotyp rezistencie ako Vga(A) proteíny. Po prvý krát bol objavený u kmeňa *Streptococcus suis*. Okrem streptokokov udeľuje rezistenciu aj v kmeni *Staphylococcus aureus*. Aminokyselinová identita SrpA proteínu v porovnaní s Vga(E) proteínom je 36%. Podobne ako Vga(A) disponuje SrpA linkrom, ktorý je zodpovedný za substrátovú špecificitu. Práve skrátenie linkru malo vplyv na antibiotickú špecificitu (Zhang et al., 2021).

VmlR rezistenčný proteín, bol izolovaný z kmeňa *Bacillus subtilis* a je zodpovedný za zníženie rezistencie k linkomycínu, virginamycínu M a pleuromutilínu. Práve pomocou EQ mutanty VmlR proteínu bola popísaná interakcia s ribozómom v jeho E-mieste. Jeho doména zodpovedná za antibiotickú rezistenciu siaha do PTC a alostericky disociuje liečivo z jeho väzobného miesta (Crowe-McAuliffe et al., 2018).

Pomocou qRT-PCR bol objavený *salA* gén, zodpovedný za LS_A rezistenčný fenotyp. Expresiou tohto génu došlo k 8-násobnému zvýšeniu rezistencie k linkomycínu a u pristinamycínu IIA bolo preukázané zvýšenie rezistencie až 64-násobne. Podľa popísaného experimentu autori zistili, že *sal(A)* gén sa zdá byť autoregulovaný prítomnosťou linkozamidov alebo streptogramínov v kultivačnom médiu (Hot et al., 2014).

Rezistenčná determinanta kódovaná *lsa(A)* génom bola po prvý krát detegovaná u kmeňa *Enterococcus faecalis* (Chowdhury et al., 2009). Charakteristikou tejto determinanty je rezistencia k linkozamidom a streptogramínom A. V prípade inaktivácie *lsa* génu došlo k zníženiu rezistencie ku dalfopristínu a klindamycínu. Komplementáciou s rekombinantným plazmidom obsahujúcim *lsa* rezistenčný gén došlo k zníženiu citlivosti k vyššie spomínaným antibiotikám (Singh et al., 2002). U stafylokokov bol popísaný prenos *lsa* pomocou mobilných genetických elementov. U klinických izolátov boli popísané kmene nesúce plazmidy obsahujúce gény *lsa(B)* a *lsa(E)* (Lozano et al., 2012). Pomocou kryoelektronovej mikroskopie Lsa(A) mutant neschopných hydrolýzy ATP (E142Q, E425Q) bola detegovaná interakcia Lsa(A) proteínu s ribozómom. Zároveň bolo zistené, že linker Lsa(A) proteín interaguje s P-miestom v 50S podjednotke bakteriálneho ribozómu (obr. 22) (Crowe McAuliffe et al., 2021).



Obrázok 22. – Štruktúra Lsa(A) proteínu v komplexe s ribozómom získaná pomocou kryoelektrónovej mikroskopie Zelená – LsaA proteín, modrá – P-miesto v 50S podjednotke ribozómu kmeňa *E. faecalis* (Crowe-McAuliffe et al., 2021 – prevzaté a upravené).

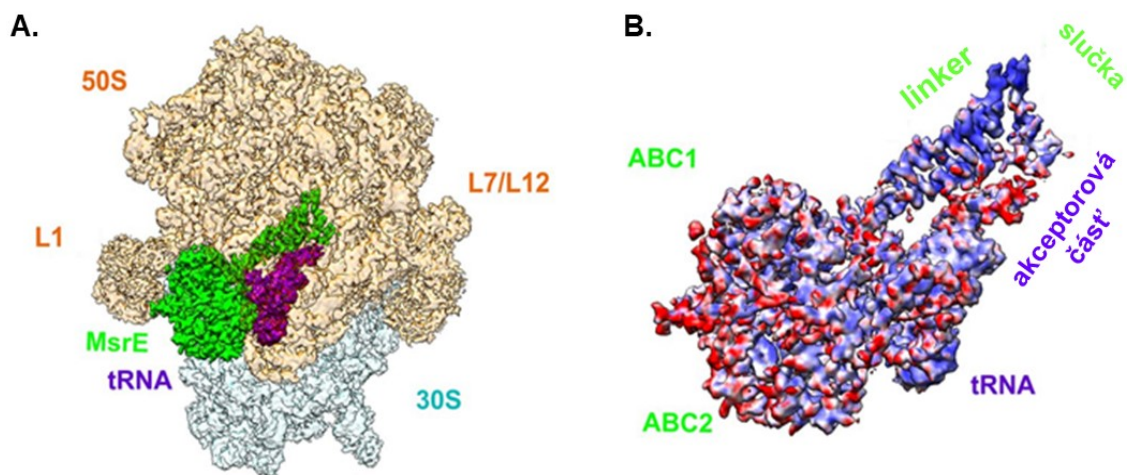
2.4.2.1.2. Msr(A) a iné varianty Msr proteínov (MS_B fenotyp rezistencie)

Msr(A) rezistenčná determinanta bola po prvý krát popísaná u kmeňa *Staphylococcus aureus* (Janosi & Ban, 1982). Pár rokov neskôr bola táto rezistenčná determinanta objavená aj u koaguláza negatívnych stafylokokov (Jenssen et al., 1987). V dnešnej dobe sú rozšírené v celom spektre baktérii, ktoré zahŕňa enterokoky, pseudomonády, ale aj napríklad korynebaktérie (G. P. Dinos, 2017). U kmeňa *S. haemolyticus* sa jedná o najčastejšiu erytromycín rezistentnú determinantu (G. Novotna & Janata, 2006).

ABC-F proteíny udeľujúce rezistenciu k MS_B antibiotikám z podrodiny ARE1 sú označované MsrA-E. Charakteristikou týchto rezistenčných determinant je udeľovanie rezistencie k 14- a 15-členným makrolidom a streptogramínom B. Ako induktor pre zvýšenie expresie je erytromycín a iné 14- a 15-členné makrolidy (J. I. Ross et al., 1990). Podľa novších

štúdiu je expresia regulovaná mechanizmom atenuácie transkripcie, na rozdiel od *erm* génov, u ktorých je expresia regulovaná na úrovni translácie (Fostier et al., 2021).

Na základe experimentu s rádioaktívne značeným erytromycínom došlo u kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 exprimujúceho *msr(A)* k zníženiu akumulácie erytromycínu v porovnaní s citlivým kmeňom. Tento experiment predikoval, že Msr proteíny sa podieľajú na aktívnom efluxe (J. I. Ross et al., 1990). Avšak Reynolds túto hypotézu spochybnil experimentom, v ktorom sledoval akumuláciu rádioaktívne značeného erytromycínu v prítomnosti, resp. absencii virginamycínu S u citlivých buniek *S. aureus* RN4220. Na základe pozorovania došiel k záveru, že pokles erytromycínu je spôsobený virginamycínom S, ktorý sa kompetenciou viaže na ribozómy. Na základe kompetencie dochádza k uvoľneniu erytromycínu z ribozómu a jeho pasívnou difúziou z bunky. Na základe týchto poznatkov vyslovil hypotézu, že Msr(A) proteín je zodpovedný skôr za ochranu ribozómu, než za jeho transportnú funkciu (Reynolds et al., 2003). Kryoelektrónová mikroskopia ukázala, že EQ mutanta Msr(E) proteínu interaguje so 70S ribozómom (obr. 23) (Su et al., 2018).

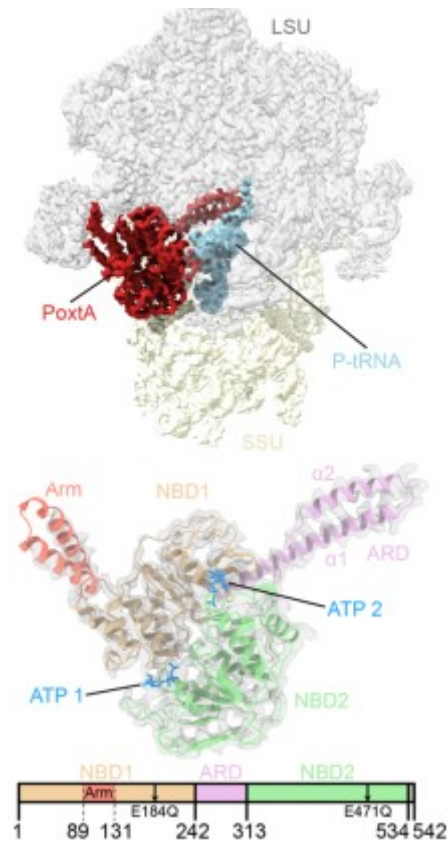


Obrázok 23. – A. Väzba Msr(E) na ribozóm. Béžovo označená 50S podjednotka ribozómu, modro 30S podjednotka ribozómu, zelene Msr(E), fialovo tRNA. **B. Zobrazenie Msr(E) proteínu a tRNA v rovnakej orientácii ako v obrázku A.** (Su et al., 2018) – prevzaté a upravené.

2.4.2.1.3. ABC-F proteíny udeľujúce rezistenciu k fenikolom a oxazolidónom

Rezistenčná determinanta kódovaná *oprA*, patriaca medzi ABC-F proteíny, udeľuje rezistenciu k oxazolínom a chloramfenikolom. OprA bol detegovaný nielen v kmeňoch *Enterococcus spp.* ale taktiež aj v kmeni *S. aureus*. *In vitro* experimentami boli detegované transformanty a transkonjuganty, ktoré stabilne udržiavali plazmid nesúci *oprA* gén. To naznačuje na možnosť *in vivo* prenosu plazmidov nesúcich *oprA* medzi enterokokmi. Prevalencia Oprt(A) je vyššia u *Enterococcus spp.* zo zvierat (26%) než od ľudí (4,8%). Avšak zatiaľ nebol popísaný medzidruhový prenos OprtA pozitívnych izolátov (Wang et al., 2015).

U metycilín rezistentného kmeňa *Staphylococcus aureus* bol objavený nový rezistečný proteín označovaný ako PoxA. Jeho identita v porovnaní s OprtA proteínom je 32%. Tento proteín udeľuje rezistenciu okrem oxazolínov a fenikolom aj na tetracyklíny. Práve jeho gén je blízko asociovaný s mobilnými elementami (IS1216), čo vo výsledku môže prispieť k jeho horizontálnemu prenosu (Antonelli et al., 2018). Pomocou kryoelektronovej mikroskopie sa podarilo lokalizovať PoxA proteín na ribozóme (obr. 24). Dôležité u tohto proteínu je, že linker (ARD) nie je v tomto prípade predĺžený tak výrazne ako u Vga(A), Vlm(R), alebo Msr(E) (Crowe-McAuliffe et al., 2021)



Obrázok 24. – Kryoelektrónová mikroskopia - štruktúra PoxA(A) proteínu v komplexe s ribozómom. Červene – PoxA proteín, modrá – P-miesto v 50S podjednotke ribozómu kmeňa *E. faecium* (Crowe-McAuliffe et al., 2021 – prevzaté a upravené).

2.4.2. Zhrnutie problematiky ABC-F proteínov

V minulosti dôkazy nasvedčovali hypotéze, že ABC-F rezistenčné proteíny môžu fungovať ako transportéry a podieľať sa na aktívnom effluxe antibiotika z bakteriálnej bunky. Tejto hypotéze nasvedčovali aj experimenty s radioaktívne značenými antibiotikmi, pomocou ktorých sa sledovala akumulácia v bakteriálnych bunkách. V experimentoch bola pozorovaná znížená akumulácia [3H]-linkomycínu u kmeňa *Staphylococcus haemolyticus* exprimujúceho *vga(A)_{LC}*, znížená akumulácia [14C]-erytromycínu u kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 exprimujúceho *msr(A)*, v porovnaní s citlivými kmeňmi (G. Novotna & Janata, 2006; J. I. Ross et al., 1990). Zároveň Chesneau detekoval Vga(A) protein v membranovej frakcii. Týmto experimentom, sa ďalej utvrdzoval fakt, že ABC-F prtoeíny sa podieľajú na transportných procesoch v bunke (Chesneau et al., 2005; G. Novotna & Janata, 2006; J. I. Ross et al., 1990).

Prvé zpochybnenie hypotézy o aktívnom transporte vyslovil Reynolds, ktorý sledoval akumuláciu [14C]-erytromycínu u citlivého kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 po pridaní ďalšieho antibiotika virginamycínu S. Pri tomto experimente zistil, že u [14C]-erytromycínu došlo k zníženiu akumulácie v bunkách. Jeho vysvetlenie spočívalo v pasívnej difúzii antibiotika z bunky (Reynolds et al., 2003).

Ďalšie hlbšie štúdium ABC-F proteínov poukazuje na to, že skutočnou funkciou je interakcia týchto proteínov s ribozómami. Prvý presvedčivý dôkaz demonštroval Boël s prokaryotickým EttA proteínom patriacim medzi ABC-F proteíny. EttA proteín je zodpovedný za reguláciu 70S iniciačného komplexu vstupujúceho do translácie. Regulácia spočíva v detegovaní hladín intracelulárneho ATP a ADP. Na základe nízkeho pomeru medzi ATP a ADP dôjde k väzbe EttA do ribozómu, ktorý vedie k inhibícii proteosyntézy. Zvýšenie pomeru ATP/ADP je zodpovedné za uvoľnenie EttA z ribozómu, jeho stabilizácii a vstup do elongačného cyklu translácie (Boel et al., 2014). Pomocou kryoelektronovej mikroskopie bola detekovaná väzba ATP dependentnej mutanty EttA proteínu s ATP na ribozóm v oblasti výstupného miesta ribozomálnej tRNA. Práve väzba ATP na ATP dependentnú EttA mutantu spôsobí zablokovanie tohto proteínu. (Chen et al., 2014). Sharkey demonštroval experiment, pri ktorom pomocou translačnej-transkripčnej (T/T) assay potvrdil, že Vga(A) a Lsa proteíny fungujú na ribozománe úrovni. Dokázal, že v prípade prítomnosti virginamycínu M došlo k inhibícii translácie. Avšak pridaním purifikovaného Vga(A) alebo Lsa proteínu došlo k ochrane ribozómu pred antibiotikom a jeho translácii. V tomto experimente použil taktiež ATP dependentnú EQ mutantu Vga(A) proteínu. Mutanta neschopná hydrolýzy ATP obsahovala zmenu kyseliny glutamovej za glutamín v 105. aminokyselinovej pozícii. Takto ATP deficientný Vga(A) proteín nebol schopný ochrany ribozómu pred virginamycínom M a výsledkom bola inhibícia translácie (Sharkey et al., 2016). Msr(E) proteín patriaci medzi ABC-F proteíny bol prvý ARE proteín, u ktorého sa demonštrovala interakcia s ribozómom pomocou kryoelektronovej mikroskopie (Su et al., 2018). Značne množstvo vedeckých pracovníkov sa inšpirovalo experimentom o EttA ATP dependentnej mutante od Boëla a pomocou kryoelektronovej mikroskopie detegovali interakciu rezistenčných proteínov ako Vga(A)_{LC}, Lsa(A), VIm(R) spolu s 50S ribozomálnou bakteriálnou podjednotkou v oblasti PTC (Crowe-McAuliffe et al., 2018; Crowe McAuliffe et al., 2021; Su et al., 2018). Práve tieto nové poznatky potvrdili fakt, že hlavnou funkciou ARE proteínov je ochrana bakteriálneho ribozómu pred

väzbou antibiotika. Avšak presný funkčný mechanizmus nie je do dnešného dňa známy.

ABC-F proteíny už nepatria iba medzi rezistenčné ale objavujú sa dôkazy, že majú hlavne regulačnú funkciu. V minulosti sa predpokladalo, že Lmr(C) proteín u rodu *Streptomyces* ako producenta linkomycínu zohráva úlohu v rezistencii voči linkomycínu. Avšak posledné dôkazy nasvedčujú faktu, že tato funkcia už nie je rezistenčná. Expresia Lmr(C) je riadenia pomocou mechanizmus atenuácie transkripcie. Vo výsledku Lmr(C) zohráva úlohu v syntéze linkomycínu cez ovplyvnenie Lmb(U) (Koberska et al., 2021).

3. Ciele práce

Táto dizertačná práca cieľi na objasnenie funkcie Vga(A) proteínu patriaceho medzi ABC-F rezistenčné proteíny. Cieľom je taktiež prvé *in vivo* potvrdenie, že mechanizmus WT Vga(A) proteínu spočíva v interakcii s ribozómom. Okrem iného sleduje interakciu Vga(A) a Msr(A) spolu s Erm(C), ktorého miesto pôsobenia je lokalizované rovnako v 50S podjednotke bakteriálneho ribozómu. Dielčie ciele boli stanovené nasledovne:

1. Vplyv sekvencie *vga(A)* linkru na špecifitu rezistencie

- príprava mutovaných variant *vga(A)* a *vga(A)_{LC}*
- stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií u pripravených mutovaných génov a ich charakterizácia

2. Akumulácie linkomycínu v bakteriálnych bunkách

- enzymatická príprava [3H]-linkomycínu
- sledovanie akumulácie [3H]-linkomycínu v klinických izolátoch *S. haemolyticus*

3. *In vivo* interakcia *Vga(A)_{LC}* s bakteriálnym ribozómom

- príprava špecifických polyklonálnych protilátok
- príprava Vga(A) varianty neschopnej hydrolýzy ATP a jej vplyv na schopnosť udeľovať rezistenčný fenotyp
- *in vivo* experiment dokazujúci interakciu bakteriálneho ribozómu s nemutovaným *Vga(A)_{LC}* pomocou profilovania v sacharózovom gradiente
- *in vivo* experiment dokazujúci interakciu bakteriálneho ribozómu s nemutovaným *Vga(A)_{LC}* kopurifikáciou pomocou aniónovej chromatografie
- *in vivo* experiment dokazujúci interakciu bakteriálneho ribozómu s *Lmr(C)_{EQ}* kopurifikáciou pomocou aniónovej chromatografie

4. Interferencia medzi Vga(A) a Msr(A) a ich vplyv na Erm a naopak

- sledovanie rastu u klinických izolátoch kmeňa *S. haemolyticus* exprimujúceho *vga(A)*, *msr(A)* a *erm(C)*
- sledovanie rastu u kmeňa exprimujúceho ARE1 rezistenčné gény *vga(A)_{LC}* a *msr(A)* spolu s *erm(B)*

4. Materiál a metódy

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Adenosin trifosfát (ATP)	Ferementas
Adenosine-5'-fosfosulfát (APS)	Sigma-Aldrich
Agar	Oxoid
Blotting Grade Blocker	Bio-Rad
Brain-heart infusion	Oxoid
Brómfenolová modrá	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma-Aldrich
Ethyldiaminotetraoctová kyselina disodná soľ dihydrát (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glukóza	Lach-ner
Glycerol	Lachema
Glycín	VWR Chemicals
Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Chlorid amonný (NH_4Cl)	Penta
Chlorid horečnatý hexahydrát ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Chlorid sodný (NaCl)	Lach-ner
1,3-diazoacyklopenta-2,4-diene (imidazol)	Sigma-Aldrich
Kvasničný extrakt	Oxoid
Kyselina chlorovodíková (HCl)	VWR Chemicals
Kyselina octová (CH_3COOH)	Lachema
Kyselina trichloroctová (TCA)	Merck
Merkaptoetanol	Serva
Metanol	Biosolve
Mueller- Hinton Broth	Oxoid
PBS (Phosphate Buffer Saline) DulbeccoA	Oxoid
Pefabloc-SC	Roche
Polyetylén glykol (PEG)	Sigma-Aldrich
Sacharóza	Lach-ner
Síran horečnatý heptahydrát ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Síran nikelnatý heptahydrát ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Triton-X100	Sigma-Aldrich
Tryptón	BD DifcoTM
Tryptón Soya Broth	Oxoid

4.1.2. Bakteriálne kmene

XL1-Blue kompetentné bunky (Aligent)

Bunky boli používané na transformáciu plazmidov po miestne špecifickej mutagenéze. Bola využívaná ich schopnosť cirkularizácie lineárneho plazmidu využitím RecA rekombinázy kódovanej kompetentnými bunkami.

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

***Escherichia coli* JM109 (Promega)**

Tento kmeň bol použitý na klonovanie a pomnoženie plazmidov.

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

***Escherichia coli* GM2929**

Tento kmeň slúžil ako akceptorový kmeň pre transformáciu plazmidov pRB374. Vyznačuje sa prítomnosťou dam- a dcm-. Práve táto vlastnosť bola využitá pri produkcii nemetylovanej plazmidovej DNA, ktorá bola používaná na transformáciu do *S. aureus* RN4220 a na štiepenie restriktívnymi endonukleázami citlivými k dam a dcm metylácii.

dam-13:Tn9 dcm-6 hsdR2 recF143 mcrA0 mcrB9999 galk2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 supE44 leuB6 rfbD fhuA13.

***Escherichia coli* BL-21 (DE3) (SigmaAldrich)**

Tento kmeň sa využíva pre transformáciu expresných vektorov pET. Využívajú sa vlastnosti kmeňa obsahujúceho gén DE3 pre T7 RNA polymerázu, ktorá je pod kontrolou lacUV5 promótoru, indukovaná pomocou IPTG.

F-ompT [lon] hsdSB (rB - mB -) gal dcm

***Staphylococcus aureus* RN4220 (Focus Bio-Inova)**

Kmeň *Staphylococcus aureus* RN4220 bol požitý ako recipientný kmeň pre expresiu *vga(A)*, *vga(A)_{LC}*, ich mutovaných variant a pre sledovanie rezistenčného fenotypu udeľovaného týmito proteínmi.

***Staphylococcus aureus* JE2**

Kmeň *Staphylococcus aureus* JE2 je derivát klinického kmeňa *Staphylococcus aureus* USA300 izolovaný od pacienta s infekciou mäkkých tkanív. Jedná sa o meticilín-rezistentný kmeň *S. aureus* (MRSA). Pomocou transpozónovej mutagenézy, bola v tomto kmeni vytvorená delécia génov kódujúcich rezistenciu k erytromycínu.

4. 1. 3. Vektory

pJAKO (2,96 kbp)

Tento klonovací vektor bol odvodený od vektora pBluescript II KS+ (Stratagene). Vektor vo svojej sekvencii obsahuje modifikovaný polylinker, ktorý uľahčuje integráciu fragmentov medzi klonovacím a expresným vektorom.

pRB374 (5,9 kbp) (ATCC® 77374™)

pRB374 patrí medzi tzv. kyvadlové vektory. Z kmeňa *Bacillus subtilis* obsahuje konštitutívny promótor *vegII*. Tento promótor je funkčný nielen v *B. subtilis*, ale aj u *S. aureus*. Súčasťou pRB374 sú rezistenčné gény *amp* (rezistencia na ampicilín), *neo* (rezistencia na kanamycín a neomycín) a *ble* (rezistencia na bleomycín a phleomycín). Vektor bol používaný na klonovanie v *Escherichia coli* a k expresii rezistenčných génov v *S. aureus* RN4220.

pET28b(+) (5,4 kbp), (Novagene)

pET28 patrí medzi expresné vektory, ktorý umožňuje nadprodukcii proteínu v natívnej forme spolu so 6 histidínovými zvyškami pripojených na N- alebo C- terminálny koniec proteínu. Histidínová kotva je využívaná pri metaloafinitnej chromatografii. C-terminálne od histidínovej kotvy je obsiahnuté cieľové miesto pre trombín, ktorý v dodatočnom kroku po purifikácii umožňuje odstránenie histidínovej kotvy. Expresia proteínu je pod kontrolou T7 promótoru. Obsahuje selekčný marker pre kanamycín. Vektor pET28b::*lmbJ* bol pripravený Mgr. Marekom Poľanom a v tejto práci bol použitý pre prípravu LmbJ proteínu.

pET42b(+) (5,9 kbp), (Novagene)

pET42 patrí medzi expresné vektory, ktorý umožňuje nadprodukcii proteínu v natívnej forme rovnako ako expresný vektor pET28. Súčasťou kódujúcej sekvencie vektora je aj 6 histidínových zvyškov, ktoré sú využívané pri metaloafinitnej chromatografii. Navyac tento vektor obsahuje kódujúcu sekvenciu pre glutation-S-transferázu (GST), ktorá môže zvyšovať

produkcii a rozpustnosť proteínu. Takto ukotvený proteín spolu s GST je možné purifikovať cez glutation. Ako selekčný marker je používaný kanamycín. Tento vektor bol použitý na expresiu *vga(A)_{LC}* spolu s mnou pripravenou histidínovou kotvou v C-terminálnej časti proteínu.

pGroESL (6,5 kbp), (Du Pont)

Vektor pGroESL bol používaný v bunkách *E. coli* BL21 (DE3) pre koexpresiu cieľového proteínu spolu so chaperonínmi. Tento vektor kóduje chaperoníny GroES (10 kDa) a GroEL (60 kDa). Chaperoníny napomáhajú priestorovému usporiadaniu odpovedajúcemu natívnej konformácii. Plazmid obsahuje sekčný marker – chloramfenikol.

pRMC2 (6,55 kbp), (získaný od T. Foster)

pRMC2 je klonovací vektor odvodený od pALC2703, obsahujúci viacnásobné klonovacie miesta. Upstream od klonovacieho miesta sa nachádza *P_{xyl}/tetO* promótor, ktorý je indukovaný anhydratetracyklínom. Selekčný marker ampilicín bol používaný u kmeňa *E. coli*, zatiaľ čo u kmeňa *S. aureus* to bol chloramfenikol.

4.1.4. Primery

Primery použité v tejto dizertačnej práci boli pripravené firmou Sigma-Aldrich a Eurofins Genomics. Primery boli riedené na výslednú koncentráciu 10 pmol/μl. Zoznam všetkých primerov je uvedený v tabuľke č. 1. spolu s ich cieľom použitia.

Tabuľka 1. – Zoznam použitých primerov

označenie primeru	sekvencia primeru 5'-3'	využitie
SGAS f	AACTTAAGCTCATCTGAAGGCAAAATAAAAGGAGCTAAGCCATACTTTGCCAGTAAGCAA	miestne špecifická mutagenéza
SGAS r	TTGCTTACTGGCAAAGTATGGCTTAGCTCTTTTATTTTGCCTTCAGATGAGCTTAAGTT	miestne špecifická mutagenéza
SVAG f	GAAAACTTAAGTTTCATCTGAAGGCAAAATAAAAGTAGCAAAGCCATACTTTGCAGGTAAGCAAAGAAG	miestne špecifická mutagenéza
SVAG r	CTTCTTTTGCTTACCTGCAAAGTATGGCTTTGCTACTTTTATTTTGCCTTCAGATGAACCTTAAGTTTTTC	miestne špecifická mutagenéza
LVTG f	AACTTAAGCTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGTAACTAAGCCATACTTTGCCGTAAGCAA	miestne špecifická mutagenéza
LVTG r	TTGCTTACCGGCAAAGTATGGCTTAGTTACTTTTATTTTGCCTTCAGATAAGCTTAAGTT	miestne špecifická mutagenéza
LVAS f	GAAAACTTAAGTTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGTAGCAAAGCCATACTTTGCAAGTAAGCAAAGAAG	miestne špecifická mutagenéza
LVAS r	CTTCTTTTGCTTACTTGCAAAGTATGGCTTTGCTACTTTTATTTTGCCTTCAGATAAAGCTTAAGTTTTTC	miestne špecifická mutagenéza
LVAG f	AGCTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGTAGCTAAGCCATACTTTGCCGTAAGCAAAGAAGTTAC	miestne špecifická mutagenéza
LVAG r	GTAACCTCTTTTGCCTTACCGCAAAGTATGGCTTAGCTACTTTTATTTTGCCTTCAGATA	miestne špecifická mutagenéza
LGTG f	AGCTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGGAACTAAGCCATACTTTGCCGTAAGCAAAGAAGTTAC	miestne špecifická mutagenéza
LGTG r	GTAACCTCTTTTGCCTTACCGCAAAGTATGGCTTAGTTCCTTTTATTTTGCCTTCAGATA	miestne špecifická mutagenéza
pRB374 f	GTGCACCAACTGATCTT	sekvenácia, kolóniová PCR
pRB374 r	GTCCGTTACTAGAAAA	sekvenácia, kolóniová PCR
vgaK2 f	GTAACACGAACTATATTCCG	sekvenácia, kolóniová PCR
M13 f	GTAACACGACGCCAGT	sekvenácia
M13 r	GCGGATAACAATTCACACAGG	sekvenácia
vga r	TGAAAATACTGTTAGA	sekvenácia, kolóniová PCR
pRMC2 f	ACATTATATCATTGATAGAGTATTTGTCAAACCTAG	sekvenácia
pRMC2 r	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	sekvenácia
vga_del_NdeI f	GATGGCACTTATGAACAATT	delícia NdeI restrikčného miesta vo <i>vga</i> géne
vga_del_NdeI r	AATTGTTTCATAAGTGCCATC	delícia NdeI restrikčného miesta vo <i>vga</i> géne
VgaALC_pET42 f	GCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAATACTGTAGAGGGACTTCATATAAACATTATG	amplifikácia <i>vga(A)</i> _{Lc} s restrikčným miestom NdeI
VgaALC-6HIS_pET42 r	AAAGGATCCGAATTCCTAATGATGATGATGATGATGATGTTTGTCCAAATTTCTTTTTTC	amplifikácia <i>vga(A)</i> _{Lc} spolu s 6his koncom a restrikčným miestom EcoRI
vga_E105Q f	GCTATTAGCAGATCAACCAACAATAAC	miestne špecifická mutagenéza
vga_E105Q r	GTTAGTTGTTGGTTGATCTGCTAATAGC	miestne špecifická mutagenéza
vga_E410Q f	GGTACTAGATCAACCAACAATACTTTCTTG	miestne špecifická mutagenéza
vga_E410Q r	CAAGAAAGTTTGGTTGATCTAGTACC	miestne špecifická mutagenéza
EBBg_RBS_vga f	TTTTGAATTCGGATCCAGATCTAGAGGATGAGAAAATATGAAAATAATGTTAGAGGGAC	klonovanie do pRMC2
EBBg_RBS_vgaLC f	TTTTGAATTCGGATCCAGATCTAGAGGATGAGAAAATATGAAAATACTGTTAGAGGGGA	klonovanie do pRMC2
vga_ecoRI r	aaaagaattcTATTTATCCAAATTTCTTTTTTC	klonovanie do pRMC2

4.1.5. Kultivačné a uchovávacie média

Kultivačné a uchovávacie média boli pripravené podľa nasledujúcich predpisov. Pokiaľ nie je uvedené inak, všetky komponenty boli resuspendované v destilovanej vode a následne sterilizované pri teplote 121°C po dobu 15 minút.

LB médium

Zloženie:

Tryptón (BD Difco™) 10 g

Kvasničný extrakt (Oxoid) 5 g

NaCl 5 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml, pH= 7,5

LB agar

Zloženie:

Agar (Oxoid) 15 g

LB médium 1000 ml

pH= 7,5

LB médium s 20% glycerolom

Zloženie:

Tryptón (BD Difco™) 10 g

Kvasničný extrakt (Oxoid) 5 g

NaCl 5 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 799 ml, pH= 7,5. Po sterilizácii a vychladení média bolo pridaných 201 ml glycerolu. Médium bolo následne sterilizované filtráciou.

TSA agar

Zloženie:

Trypton Soya Broth (Oxoid) 30 g

Agar (Oxoid) 5 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1 000 ml.

TSB médium

Zloženie:

Trypton Soya Broth (Oxoid) 30 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1 000 ml.

BHI agar

Zloženie:

Brain-heart infusion (Oxoid) 37 g

Agar (Oxoid) 15 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml, pH= 7,5.

BHI médium

Zloženie:

Brain-heart infusion (Oxoid) 37 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml, pH= 7,5.

BHI médium s 20% glycerolom

Zloženie:

Brain-heart infusion (Oxoid) 37 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 799 ml, pH= 7,5. Po sterilizácii a vychladení média bolo pridaných 201 ml glycerolu. Médium bolo následne sterilizované filtráciou.

Médium na uchovávanie kompetentných buniek

Zloženie:

Polyetylén glykol (Mw= 8000)	3,6 g
Glycerol	10,8 ml
1 M MgSO ₄ .7H ₂ O	0,36 ml

LB médium doplniť do objemu 30ml. Pripravené médium bolo sterilizované filtráciou.

H médium

Zloženie:

Trypton (BD Difco™)	10 g
NaCl	8 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml, pH= 7,5.

Mueller-Hinton agar

Zloženie:

Mueller- Hinton Broth (Oxoid)	21 g
Agar (Oxoid)	15 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1 000 ml.

Mueller-Hinton médium

Zloženie:

Mueller- Hinton Broth (Oxoid)	21 g
-------------------------------	------

Destilovaná voda doplnená do objemu 1 000 ml.

4.1.6. Roztoky a pufry

Roztoky a pufry boli pripravené podľa nasledujúcich predpisov. Pokiaľ nie je uvedené inak, všetky komponenty boli resuspendované v destilovanej vode a následne sterilizované pri teplote 121°C po dobu 15 minút.

Fyziologický roztok

Zloženie:

NaCl 0,9 g

Navážené množstvo chloridu sodného rozpusteného v 1000 ml destilovanej vody zodpovedá výslednej koncentrácii 0,9%.

20% glukóza

Zloženie:

Glukóza 200 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml. Takto pripravený roztok bol sterilizovaný filtráciou.

10% glycerol

Zloženie:

Glycerol 100,5 ml

Deionizovaná voda doplnená do objemu 1000 ml. Takto pripravený roztok bol sterilizovaný filtráciou.

1M MgSO₄·7H₂O

Roztok sterilizovaný filtráciou.

1mM ATP

Roztok sterilizovaný filtráciou.

1M NiSO₄·7H₂O

Roztok sterilizovaný filtráciou.

1,5M Tris-Cl, pH=8,8

10mM Tris-Cl, pH=8,3

1M Tris-Cl, pH=9

5% SDS

Zloženie:

SDS 50 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml. Roztok nebol sterilizovaný.

100% TCA

Zloženie:

TCA 50 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 50 ml. Roztok nebol sterilizovaný.

30% APS

Zloženie:

APS 0,334 g

Destilovaná voda doplnená do objemu 1 ml. Roztok nebol sterilizovaný.

TS-8 pufor

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 100mM NaCl, pH=8.

TAE pufor

Zloženie: 40mM Tris- acetát, 1mM EDTA, pH= 8,0.

Pufor nebol sterilizovaný.

10x DNA vzorkový pufor

Zloženie: 100mM EDTA, 1 % SDS, 20 % glycerol, 0,25 % brómfenolová modrá, pH= 8,0.

Pufor nebol sterilizovaný.

SDS- PAGE pufor

Zloženie: 25mM Tris-Cl, 192mM glycín, 0,1 % SDS, pH=8,0.

Pufor nebol sterilizovaný.

2x SDS- PAGE vzorkový pufor

Zloženie: 125mM Tris-Cl, 2 % SDS, 5 % merkaptoetanol, 20 % glycerol, 0,002% brómfenolová modrá, pH=8,0.

Pufor nebol sterilizovaný.

Farbiaci roztok- Coomassie Brilliant Blue

Zloženie: 50% metanol, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% kyselina octová

Roztok nebol sterilizovaný.

Odfarbovací roztok (Destain)

Zloženie:

Metanol 200 ml

Kyselina octová 100 ml

Destilovaná voda 700 ml

Roztok nebol sterilizovaný.

PBS pufor

Zloženie:

PBS (Phosphate Buffer Saline) DulbeccoA (Oxoid) 1 tbl.

Destilovaná voda 100 ml

Pufor nebol sterilizovaný.

TE⁻¹ pufor

Zloženie: 10mM Tris-Cl, 0,1mM EDTA, pH= 8,0.

Prenosový pufo

Zloženie: 25mM Tris-Cl, 192mM glycín, 0,1 % SDS, 15 % metanol, pH=7,5.

Pufo nebol sterilizovaný.

5% Blocking (vyvážovací) pufo

Zloženie:

Blotting Grade Blocker (Bio-Rad)	5 g
1x PBS	100 ml

Pufo nebol sterilizovaný.

1% Blocking (vyvážovací) pufo

Zloženie:

Blotting Grade Blocker (Bio-Rad)	1 g
1x PBS	100 ml

Pufo nebol sterilizovaný.

Pufo pre polymerázu

5x Phusion GC pufo

Pufo pre Taq- Purple DNA polymerázu

Pufo A1

Zloženie: 50mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 20mM NaCl, 1mM MgCl₂.6H₂O, pH7,5.

Pufo A

Zloženie: 50mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 20mM NaCl, 1mM MgCl₂.6H₂O, 0,5% Triton-X100, 1mM Pefabloc-SC, pH7,5.

Pufo B

Zloženie: 50mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH7,5.

Pufor C

Zloženie: 50mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 2M NaCl, 50mM imidazol, pH7,5.

Pufor D

Zloženie: 50mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 2M NaCl, 250mM imidazol, pH7,5.

Pufor E

Zloženie: 25mM Tris-Cl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂.6H₂O, 2 mM β-merkaptetoetanol, pH=7,5.

Pufor I.

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, pH=7,5.

Pufor II.

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, 40% sacharóza, pH=7,5.

Pufor I. + 7% sacharóza

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, 7% sacharóza, pH=7,5.

Pufor I. + 15% sacharóza

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, 15% sacharóza, pH=7,5.

Pufor I. + 30% sacharóza

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, 30% sacharóza, pH=7,5.

Pufor I. + 45% sacharóza

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, 45% sacharóza, pH=7,5.

Pufor RA

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 350mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, pH=7,5.

Pufor RB

Zloženie: 20mM Tris-Cl, 1M NH₄Cl, 10mM MgCl₂. 6H₂O, pH=7,5.

4.1.7. Enzýmy

Restriktázy

NdeI, BsaBI, EcoRI-HF, HindIII, XbaI, DpnI a k nim výrobcom doporučené pufry (New England Biolabs)

Ligázy

T4 DNA ligáza a k nej výrobcom doporučený pufor (BioLabs)

Fosfatázy

CIP- Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal a k nej výrobcom doporučený pufor (New England Biolabs)

Polymerázy

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs)

Taq-Purple DNA polymeráza (Top-Bio)

Nukleázy

Benzonáza (Sigma-Aldrich)

Ostatné

Lyzostafín – pracovná koncentrácia 10mg/ml (Ambi Product LLC)

4.1.8. Protilátky

Primárne protilátky

Špecifická protilátka proti Vga(A)_{LC} proteínu

Špecifická protilátka proti ribozomálnej S7 podjednotke

Sekundárne protilátky

Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti- rabbit (H+L) (Invitrogen)- Kozia polyklonálna protilátka proti králičiemu IgG konjugovaná s chrenovou peroxidázou

4.1.9. Antibiotiká

Tabuľka 2. – Zoznam použitých antibiotík

Antibiotikum	prac. koncentrácia	rozpúšťadlo
Ampicilín	100 mg/ml	destilovaná voda
Anhydratetracyklín	100 ng/ml	etanol
Chloramfenikol	25 mg/ml	etanol
Erytromycín	10 mg/ml	etanol
Karbenicilín	100 mg/ml	destilovaná voda
Kanamycín	50mg/ml, 70mg/ml	destilovaná voda
Klindamycín	10 mg/ml	destilovaná voda
Linkomycín	10 mg/ml	destilovaná voda
Pristinamycín IIA	10 mg/ml	metanol
Tiamulín	10 mg/ml	destilovaná voda

4.1.10. Komerčne dodávané súpravy

Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega) – izolácia plazmidovej DNA

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) – prečistenie PCR zmesi, izolácia DNA z agarózového gélu

NucleoBond Xtra Maxi Columns (Machinery Nagel) - izolácia plazmidovej DNA

1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) - Štandard molekulevej hmotnosti pre DNA agarózovú elektroforézu (100 bp - 12 Kbp).

Príprava pracovného roztoku:

100 ul 1 kb Plus DNA ladder

100 ul 10x DNA vzorkový pufor

800 ul TE⁻¹

BlueElf Prestained Protein Marker (Jena Bioscience) - Štandard molekulevej hmotnosti pre SDS- PAGE elektroforézu (5- 245 kDa).

Qubit™ RNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific) – kit na stanovenie celkovej koncentrácie RNA.

4.1.11. Software a internetové aplikácie

CLC Main Workbench 6.8.1. – software pre analýzu sekvencií

ChromLab V 6.0 – software poskytuje riešenie pre ovládanie NGC Chromatography System, získavanie dát a ich analýzy.

Gen5 2.01 (Biotek Synergy HT) - software spracovávajúci namerané hodnoty zo spektrofotometra pri analýze MIC a rastových kriviek

GenBank - databáza sekvencií

Geneious - software pre analýzu sekvencií

GENESys V 1.5.5.0 - program na analýzu DNA elektroforézy

CHROMuLAN 0.91 – software spracovávajúci namerané hodnoty zo spektrofotometra pri analýze ribozómálnych profilov

GrowthRates v2.0 – software na analýzu rastových kriviek

4.2. Metódy

4.2.1. Kultivácia a uchovávanie kompetentných buniek

4.2.1.1. Kultivácia a uchovávanie buniek kmeňa *Escherichia coli*

U *E. coli* sa vyžívali dva druhy kultivácie buniek – kultivácia na pevnej pôde a v tekutom médiu. Kultivácia na pevnej pôde (LB agar) s príslušným antibiotikom pri teplote 37°C 18 hodín bola využívaná po transformáciách, a na oživenie buniek z konzervy uchovávanej pri -80°C. Bunky kultivované na pevných pôdach boli následne uchovávané pri teplote 4°C. Platne boli obalené parafilmom, z dôvodu ochrany pred vysychaním. Kultivácia v médiu (LB médium) s príslušným antibiotikom prebiehala v trepačke pri teplote 37°C, 16-18 hodín, pri rýchlosti trepania 200 RPM. Takto pripravované bunky boli používané na pomnoženie plazmidov.

Pri dlhodobom uchovávaní boli bunky resuspendované v LB médiu s obsahom 20% glycerolu. Následne boli bunky prudko schladené v tekutom dusíku a uchovávané pri teplote -80°C.

4.2.1.2. Kultivácia a uchovávanie kmeňa *Staphylococcus aureus*

U *S. aureus* sa využívali dva druhy kultivácie buniek - kultivácia na pevnej pôde a v tekutom médiu. Kmene na pevných pôdach (TSA, BHI agar) boli kultivované s príslušným antibiotikom pri teplote 37°C 24 hodín. Kultivácia na pevných pôdach bola využívaná po transformáciách a na oživenie buniek z konzervy uchovávanej pri teplote -80°C. Bunky kultivované na pevných pôdach boli následne uchovávané pri teplote 4°C. Platne boli obalené parafilmom, z dôvodu ochrany pred vysychaním. V prípade kultivácie v médiu (TSB, BHI bujón), boli kmene kultivované pri teplote 37°C, 16-18 hodín, pri rýchlosti trepania 200 RPM.

V prípade dlhodobého skladovania boli jednotlivé bakteriálne kmene resuspendované v BHI médiu s obsahom 20% glycerolu. Následne boli bunky prudko schladené v tekutom dusíku a uchovávané pri teplote -80°C.

4.2.2. Príprava a transformácia kompetentných buniek

Kompetentné bunky sa vyznačujú schopnosťou prijať do svojej bunky cudzorodú DNA. Úspešnosť transformácie závisí nielen na genetických vlastnostiach daného kmeňa ale aj od inkubačných a transformačných podmienok, ktoré zaistia vytvorenie priepustnej bunkovej steny a prijatie transformovanej DNA.

4.2.2.1. Príprava kompetentných buniek *E. coli* pre transformáciu teplotným šokom

Kmene používané v experimentalnej časti boli pripravované identickým spôsobom. Pri príprave kompetentných buniek bol do LB média pridávaný 10 mM MgSO₄.6H₂O a 0,2% glukóza.

1. Príprava inokula spočívala v zaočkovaní kolónie do 2 ml LB média. Kultivácia inokula prebiehala pri teplote 37°C, 16 až 18 hodín pri rýchlosti trepania 200 RPM.
2. Z celkového objemu 110 ml obohateného LB média (LB médium s prídavkom 1,1 ml 20% glukózy a 1,1 ml 1M MgSO₄.6H₂O) sa odobralo 10 ml média a zvyšná časť (100ml) bola temperovaná na teplotu 37°C. Do vytemperovaného média sa pridal 1 ml inokula a v čase t_0 sa zmerala OD₆₀₀ (optická denzita pri vlnovej dĺžke 600nm). Ako slepá vzorka bolo použité LB médium s vyššie spomínaným prídavkom. Kultúra sa nechala kultivovať pri teplote 37°C/200 RPM do OD₆₀₀ = 0,4-0,6.

3. Po dosiahnutí správnej OD_{600} sa kultúra schladila vo vode s ľadom.
4. Kultúra sa preliala do vychladených 50 ml sterilných kónických skúmaviek a centrifugovala sa vo vychladenej centrifúge pri 1500x g, 10 minút pri teplote 4°C.
5. Po centrifugácii bol supernatant opatrne odsatý a sediment bol resuspendovaný v 1 ml obohateného LB média. Počas spracovávania buniek, boli bunky neustále udržiavané na ľade. Do pripravenej suspenzie sa pridalo 5 ml média určeného na uchovávanie buniek a celá suspenzia sa opatrne premiešala.
6. Bunky boli resuspendované po 100 µl alikvotách do vopred vychladených a popísaných mikroskúmaviek a uchovávané pri teplote -80°C.

4.2.2.1.1. Transformácia kompetentných buniek *E. coli* teplotným šokom

Na transformáciu teplotným šokom sú používané kompetentné bunky, ktoré sú schopné prijať cudzorodú DNA. Teplotný šok sa využíva k čiastočnej destabilizácii cytoplazmatickej membrány.

1. K alikvóte (100 µl) buniek bol pridaný 1 µg plazmidovej DNA. Suspenzia sa opatrne, ale zároveň dôkladne premiešala a nechala sa inkubovať na ľade 25-30 minút.
2. Následne došlo k teplotnému šoku ponorením do vodného kúpeľa o teplote 42°C po dobu 1 minúty.
3. Po teplotnom šoku sa suspenzia prudko schladila umiestnením do ľadu po dobu 2 minút. Po inkubácii v ľade, bol ku kultúre pridaný 1 ml LB média vytemperovaného na teplotu 37°C. Celá suspenzia bola následne kultivovaná v trepačke vytemperovanej na 37°C po dobu 1 – 1,5 hodiny, pri rýchlosti 200-250 RPM.
4. Kultúra bola následne prudko zcentrifugovaná a supernatant bol odstránený tak, aby v mikroskúmavke ostalo približne 100 µl média. Sediment so zvyšným supernatantom bol opätovne resuspendovaný a suspenzia bola vyočkovaná na LB agar s prídavkom antibiotika rozterovou metódou. Kultúra bola kultivovaná pri teplote 37°C približne 24 hodín.

4.2.2.2. Príprava kompetentných buniek *S. aureus* pre transformáciu elektroporáciou

1. Prvý deň, bolo potrebné rozočkovať kmeň *S. aureus* na BHI agar s následnou kultiváciou pri teplote 37°C po dobu 24 hodín.
2. Príprava inokula spočívala v zaočkovaní kolónie do 2 ml BHI média. Kultivácia inokula prebiehala pri teplote 37°C, 16 až 18 hodín pri rýchlosti trepania 200 RPM.
3. Do 100 ml vytemperovaného BHI média na teplotu 37°C sa inokulovalo 0,5 ml suspenzie kultivovanej cez noc. Po inokulácii sa zmerala OD₆₀₀ v čase t₀. Ako slepá vzorka bolo použité BHI médium. Kultúra bola kultivovaná v trepačke pri teplote 37°C pri rýchlosti 200 RPM.
4. Po dosiahnutí OD₆₀₀ = 0,5-0,7, bola kultúra schladená na ľade a rozdelená do vopred vychladených 50 ml sterilných kónických skúmaviek. Kultúra bola centrifugovaná pri zrýchlení 8000x g po dobu 10 minút, pri teplote 4°C.
5. Po centrifugácii bol supernatant odstránený a kultúra bola resuspendovaná v 100 ml vychladenej deionizovanej vody (kultúra v každej skúmavke bola premytá 50 ml deionizovanej vody). Suspenzia bola opäť centrifugovaná pri 8000x g po dobu 10 minút, pri teplote 4°C.
6. Bunky z oboch skúmaviek boli resuspendované v 20 ml 10% glycerolu (roztok glycerolu a deionizovanej vody) a opäť centrifugované pri 8000x g po dobu 10 minút, pri teplote 4°C.
7. Sediment po centrifugácii bol následne resuspendovaný v 5 ml 10% glycerolu a inkubovaný 15 minút na ľade. Po inkubácii boli bunky opäť centrifugované pri 8000x g po dobu 10 minút, pri teplote 4°C.
8. Kompetentné bunky boli resuspendované v 1,6 ml 10% glycerolu a suspenzia bola rozdelená po 50 µl alikvotách do mikroskúmaviek a uchovávaná pri teplote -80°C.

4.2.2.2.1. Transformácia kompetentných buniek *S. aureus* elektroporáciou

Princíp elektroporácie spočíva vo vytvorení pórov na povrchu bakteriálnych buniek pôsobením elektrického impulzu. Toto pôsobenie má za následok prijatie cudzorodej DNA. Na

elektroporáciu buniek bol používaný prístroj MicroPulser Electroporator od spoločnosti Bio-Rad.

1. Ku kompetentným bunkám bola pridaná DNA (5ng – 2μg) v maximálnom objeme 3 μl. Zmes sa nechala inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote.
2. Na prístroji bol nastavený program „StA“, ktorý je prednastavený výrobcom pre kmeň *S. aureus* s napätím 1,8 kV a dĺžkou trvania pulzu 2,5 ms.
3. Zmes buniek a DNA bola napipetovaná do vychladenej elektroporačnej kyvety s priemerom 0,2 cm. Po prebehnutí pulzu v kyvete, bola suspenzia resuspendovaná v 1 ml BHI média a späť prepipetovaná do mikroskúmavky.
4. Bakteriálna suspenzia bola následne inkubovaná v trepačke pri teplote 37°C pri rýchlosti 200 RPM, po dobu 1 – 2 hodín.
5. Kultúra bola následne prudko zcentrifugovaná a supernatant bol odstránený tak, aby v mikroskúmavke ostalo približne 100 μl média. Sediment so zvyšným supernatantom bol opätovne resuspendovaný a suspenzia bola vyočkovaná na BHI agar s prídavkom antibiotika rozterovou metódou. Kultúra bola kultivovaná pri teplote 37°C približne 24 hodín.

4.2.3. Miestne špecifická mutagenéza pomocou QuikChange™ (Promega)

QuikChange™ miestne špecifická mutagenéza bola použitá na prípravu bodových mutácií, ktorej výsledkom bola zámena aminokyselín v polypeptidovom reťazci, alebo vytvorenie tichých mutácií, ktorej výsledkom bola zmena miesta špecifického pre restriktívnu endonukleázu. Aminokyselinové zámeny v proteíne, resp. tiché mutácie v génoch boli pripravované podľa návodu komerčnej súpravy QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, avšak s použitím vlastných komponentov, ako sú enzýmy, pufrý a primery. Princíp metódy spočíval v zainkorporovaní komplementárnych oligonukleotidov nesúcich požadované mutácie do sekvencie génov, ktoré boli vložené vo vektore pJAKO. K elongácii oligonukleotidov bola použitá vysoko špecifická polymeráza (Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza). Výsledkom bola amplifikácia génu spolu s vektorom. Po ukončení samotnej PCR reakcie bol do zmesi pridaný DpnI (enzým rozlišujúci metylovanú DNA v pozícií 5'-G(6mA)TC-3'), ktorého výsledkom bolo rozštiepenie metylovanej DNA, čiže vektor, ktorý bol do reakcie

pridaný ako templát. Samotný PCR produkt metylovaný nebol a preto nedošlo k štiepeniu pomocou DpnI. 10 μ l PCR zmesi bolo transformovaných do XL-1 Blue kompetentných buniek. Zloženie reakčnej zmesi a priebeh PCR reakcie spolu s použitím restriktívnej endonukleázy je uvedený v tab. 3 a 4.

Tabuľka 3. - Zloženie reakčnej zmesi

Komponenty	Množstvo na 1 reakciu
5 x Phusion GC pufor	10 μ l
Templát (20ng/ μ l)	1 μ l
Primer forward (125ng)	1 μ l
Primer reverse (125 ng)	1 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l
Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza 2 U/ μ l	1,25 μ l
Destilovaná voda	34,75 μ l

Tabuľka 4. – Priebeh PCR reakcie spolu s použitím miestne špecifickej endonuleázy DpnI

Cyklus	Teplota	Čas
1.	95°C	5 minút
Pauza, polymeráza 1,25 μ l	68°C	-
2. – 18.	95°C	30 sekúnd
	56°C	1 minúta
	72°C	3 minúty
Pauza, DpnI – 0,75 μ l	14°C	-
	37°C	1 hodina
	80°C (inaktivácia DpnI)	20 minút

4.2.4.Štiepenie fragmentov pomocou restriktívnych endonukleáz

Restriktívne endonukleázy rozpoznávajú dsDNA, ktorú dokážu štiepiť v špecifickom mieste vo vnútri vlákna. Objavenie restriktívnych endonukleáz umožnilo značný rozmach génovému inžinierstvu.

Práca s restričnými endonukleázami sa opierala o odporúčenia výrobcu New England Biolabs. Endonukleázy boli používané na klonovanie génu do pripravených linearizovaných plazmidov, ale taktiež aj na overenie správnosti ligovaných fragmentov do plazmidov. Teplota a zvolený pufor je uvedený v kapitole 5.1. Materiál, ale taktiež tieto informácie sú dostupné v protokoloch výrobcu. Čas inkubácie celej reakčnej zmesi bol v rozmedzí 1,5 až 2 hodiny. Po restričnom štiepení nasledovala verifikácia správnosti štiepeného fragmentu a prípadná jeho izolácia. Zloženie reakčných zmesi je uvedený v tabuľkách 5 a 6.

Tabuľka 5. – Zloženie reakčnej zmesi pre restričiu mutovaného génu

Zloženie reakčnej zmesi	Množstvo na 1 reakciu
NEB pufor (10 x koncentrovaný)	1/10 celkového množstva
Restričná endonukleáza*	30 U
Plazmidová DNA	10 µg
Destilovaná voda	doplniť do objemu 200 µl

* použité endonukleázy sú uvedené v kapitolách 4.1. Materiál, 5. Výsledky

Tabuľka 6. – Zloženie reakčnej zmesi pre kontrolnú restričnú analýzu

Zloženie reakčnej zmesi	Množstvo na 1 reakciu
NEB pufor (10 x koncentrovaný)	1/10 celkového množstva
Restričná endonukleáza*	10 U
Plazmidová DNA	4 µg
Destilovaná voda	doplniť do objemu 20 µl

* použité endonukleázy sú uvedené v kapitolách 4.1. Materiál, 5. Výsledky

4.2.5. Defosforylácia pomocou alkalickej fosfatázy (CIP)

Alkalická fosfatáza je zodpovedná za defosforyláciu 5' a 3' koncov DNA a RNA. Cieľom jej použitia je zabránenie recirkularizácie lineárnej DNA, ktorá bola linearizovaná pomocou jednej miestne špecifickej restričnej endonukleázy. Zloženie zmesi je uvedený v tabuľke 7. Reakčná zmes bola inkubovaná pri teplote 37°C po dobu 1 hodiny. Na rozdiel od novších typov alkalickej fosfatáz, nebola na trhu v dobe prípravy konštruktu tepelne deaktivovateľná

alkalická fosfatáza, preto bolo nutné prečistenie celej reakčnej zmesi pomocou kitu na prečistenie DNA (Promega).

Tabuľka 7. – Zloženie reakčnej zmesi na defosforyláciu linearizovaného plazmidu

Zloženie reakčnej zmesi	Množstvo na 1 reakciu
CutSmart® pufor (10 x koncentrovaný)	1/10 celkového množstva
CIP	10 U
Plazmidová DNA	4 µg
Destilovaná voda	doplniť do objemu 40 µl

4.2.6. Ligácia restričných fragmentov DNA do vektoru pRB374, pRMC2 a pET42

Ligáciou sa rozumie spájanie jedného alebo viacerých fragmentov donorovej molekuly DNA s recipientnou molekulou DNA, najčastejšie sa jedná o linearizovaný vektor, pomocou špecifických enzýmov označovaných ako ligázy.

Pre správny priebeh ligačnej reakcie je nutné dodržať molárny pomer medzi inzertom a vektorom (3:1). Najčastejšie používaný objem ligačnej reakcie bol 20 µl. Ligačnú reakciu, v prostredí odoviedajúceho ligačného pufru katalizovala T4 DNA ligáza od firmy Fermentas (1 Weiss U / µl). Súčasťou ligačnej zmesi bol aj navyše pridávaný ATP v konečnej koncentrácii 1mM. Zvyšný objem bol doplnený destilovanou vodou. Celá reakčná zmes bola inkubovaná pri laboratórnej teplote 1 hodinu. Po inkubácii bolo z reakčnej zmesi odobraných 10 µl, ktoré boli použité na transformáciu do kompetentných buniek *E. coli* JM109. Zvyšný objem ligačnej zmesi bol naďalej inkubovaný pri teplote 4°C po dobu 12-18 hodín. Následne bol zvyšný reakčný objem použitý na transformáciu kompetentných buniek *E. coli* JM109.

4.2.7. Polymerázová reťazová reakcia

Polymerase Chain Reaction označovaná ako PCR, alebo polymerázová reťazová reakcia je rutinnou metódou molekulárnej biológie, ktorej výsledkom je in vitro amplifikácia DNA molekúl za využitia enzýmu DNA-polymerázy. Všetky PCR reakcie v dizertačnej práci prebiehali v objeme 50 µl.

- amplifikácia génu *vga(A)_{LC}* s histidínovou kotvou pre klonovanie do pET42b

Pomocou PCR bola amplifikovaná DNA obsahujúca *vga(A)_{LC}* s vydeletovaným NdeI restriktčným miestom. K amplifikácii *vga(A)* génu dochádzalo pomocou použitia špecifických primerov, ktoré obsahovali vo svojej sekvencii aj sekvenciu pre proteínovú kotvu. Zloženie a priebeh PCR reakcie je uvedené v tab. 8 a 9.

Tabuľka 8. – Zloženie PCR reakcie

Komponenty	Množstvo na 1 reakciu
Templát 20 ng/ μ l	1 μ l
VgaALC_pET42 f	2 μ l
VgaALC-6HIS_pET42 r	2 μ l
dNTP	2 μ l
5 x Phusion GC pufor	10 μ l
Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza 2 U/ μ l	1,25 μ l
Destilovaná voda	31,75 μ l

Tabuľka 9. - priebeh PCR reakcie

Cyklus	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
	Primárna denaturácia	95°C	2 minúty
Pauza	Nanesenie enzýmu	68°C	-
1. – 35.	Denaturácia	95°C	30 sekúnd
	Nasadnutie primerov	56°C	45 sekúnd
	Elongácia primerov	72°C	1,5 minúty
	Finálna elongácia	72°C	5 minút

- amplifikácia génu *vga(A)_{LC}* pre klonovanie do vektora pRMC2

PCR reakciou bol amplifikovaný gén *vga(A)_{LC}* pomocou špecifických primerov, ktoré obsahovali miesto pre štiepenie špecifickou restriktívnou endonukleázou EcoRI (tab.10 a 11). Tento krok bol potrebný na preklonovanie génu z vektora pRB374::*vga(A)_{LC}*, ktorý slúžil ako templát, do nového vektora pRMC2.

Tabuľka 10. – Zloženie PCR reakcie

Komponenty	Množstvo na 1 reakciu
Templát 20 ng/ µl	1 µl
EBBg_RBS_vgaLC f	2 µl
vga_ecoRI r	2 µl
dNTP	2 µl
5 x Phusion GC pufor	10 µl
Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza 2 U/ µl	1,25 µl
Destilovaná voda	31,75 µl

Tab. 11. - priebeh PCR reakcie

Cyklus	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
	Primárna denaturácia	95°C	2 minúty
Pauza	Nanesenie enzýmu	68°C	-
1. – 35.	Denaturácia	95°C	30 sekúnd
	Nasadnutie primerov	54°C	45 sekúnd
	Elongácia primerov	72°C	1,5 minúty
	Finálna elongácia	72°C	5 minút

- amplifikácia úsekov pre overenie správnosti elektroporácie

Metóda PCR bola využívaná aj na overenie správnosti elektroporácie plazmidov pRB374, pRMC2 v stafylokokových bunkách a na kontrolu plazmidov s vloženým inzertom po ligáčnych reakciach. Ako templát do PCR reakcie bola používaná izolovaná celková DNA,

v prípade kontroly plazmidu vloženého v stafylokokových bunkách. V prípade kontroly plazmidov s vloženým inzertom, bol ako templát používaný vyzolovaný plazmid (tab. 12 a 13).

Tabuľka 12. – Zloženie PCR reakčnej zmesi

Komponenty	Množstvo na 1 reakciu
Templát	4 μ l
LA pufor	5 μ l
dNTP (10 mM)	2 μ l
Primer forward (10pM)	2 μ l
Primer reverse (10pM)	2 μ l
LA DNA polymeráza mix 5 U/ μ l	0,5 μ l
Destilovaná voda	34,5 μ l

Tabuľka 13. – Priebeh PCR

Cyklus	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
	Primárna denaturácia	95°C	2 minúty
Pauza	Nanesenie enzýmu	68°C	-
1. – 35.	Denaturácia	95°C	30 sekúnd
	Nasadnutie primerov	52°C	45 sekúnd
	Elongácia primerov	68°C	1,5 minúty
	Finálna elongácia	68°C	5 minút

4.2.8. Elektroforetické separačné metódy

Elektroforetické metódy sú základným kameňom molekulárnej biológie a proteomiky. Na základe vstupného materiálu použitého v separačných metódach (DNA, proteín), rozlišujeme elektroforézu v agarózovom gély a SDS (sodium dodecyl sulfát) elektroforézu. Medzi elektroforetické metódy taktiež patrí aj vertikálny prenos proteínov z SDS gélu na PVDF membránu, tzv. „trans blot“, ktorý je súčasťou Western Blotu.

- Elektroforéza v agarózovom gély

Agarózová elektroforéza umožňuje delenie DNA fragmentov na základe ich veľkosti. V prípade potreby (napr. izolácia fragmentu po restrikcii), je možná izolácia žiaduceho DNA fragmentu. Veľkou výhodou je priama detekcia fragmentov DNA pri vlnovej dĺžke odpovedajúcej UV žiareniu za použitia fluorescenčných interkalačných látok. Rýchlosť elektroforézy v agarózovom gély závisí od koncentrácie agarózového gély, konformácie DNA, molekulovej veľkosti DNA, ale taktiež aj od zloženia elektroforetického roztoku, teploty a v neposlednom ráde aj od veľkosti použitého napätia.

V experimentálnej časti bol používaný agarózový gély rozpustený v TAE pufri. Koncentrácia gély bola od 0,8 % do 1 % v závislosti na veľkosti analyzovaného fragmentu. Do gély bol pridávaný roztok 0,005% ethidium bromidu, za účelom vizualizácie DNA pod UV svetlom. Samotná vzorka bola pred nanesením zmiešaná s 10x koncentrovaným vzorkovým pufrom. Fragmenty boli separované pri konštantnom napätí 3 – 5 V/cm.

- Elektroforéza v polyakrylamidovom gély

Elektroforéza v polyakrylamidovom gély označovaná ako SDS-PAGE, je biochemická metóda využívajúca fyzikálne a biochemické vlastnosti proteínov k ich separácii. Separácia závisí od dĺžky polypeptidového reťazca, molekulovej hmotnosti, stupni denaturácie proteínu, ale aj na posttranslačných modifikáciách. SDS denaturuje proteíny a dodáva im záporný náboj, ktorý je priamo úmerný veľkosti proteínu. Záporné nabitie proteínu je následne využívané pri migrácii proteínov ku kladne nabitej elektróde – anóde. Ku vzorke pred nanesením je pridávaný vzorkový pufor (2-5x koncentrovaný), obsahuje merkaptoetanol, ktorý je zodpovedný za zrušenie disulfidických väzieb (kap. 4.1.6.). Zároveň sú vzorky so vzorkovým pufrom vystavené teplote 90°C po dobu 10 minút. Podľa veľkosti proteínov bol používaný 10% alebo 16% separačný gély. Elektroforéza prebiehala v elektródovom pufri pre SDS-elektroforézu za použitia Mini-PROTEAN® (Bio-Rad) aparatúry. Zloženie hlavného rozdeľovacieho gély a zaostrovacieho gély je uvedené v tab. 14.

Tabuľka 14. – Zloženie deliaceho a zaostrovacieho SDS gélu

	deliaci gél			zaostrovaci gél
	10%	16%		2,5 ml
30% AA/BA	3,3 ml	5,3ml	30% AA/BA	333 µl
1,5M Tris-Cl, pH=8,8	2,5 ml	2,5 ml	05M Tris-Cl, pH=8,8	625 µl
5% SDS	0,2 ml	0,2 ml	5% SDS	50 µl
H₂O	4,6 ml	2 ml	H₂O	1492 µl
30% APS	50 µl	50 µl	30% APS	12,5 µl
TEMED	5 µl	5 µl	TEMED	1,25 µl

4.2.9. Imunoanalýza proteínov

- Imunoanalýza pomocou dot blotu

Dot blot patrí medzi zjednodušené imunohistochemické metódy v porovnaní s Western Blotom. U tejto metódy odpadá nutnosť SDS gélovej elektroforézy a prenosu proteínu z gélu na membránu. Na aktivovanú PVDF membránu je vzorka s obsahom proteínu nášho záujmu nanášaná priamo.

1. Pred nanesením Vga(A)_{LC} bolo nutné membránu aktivovať, ponorením do metanolu po dobu 10 sekúnd. Následne boli na membránu nanesené vzorky v rôznych koncentráciách a membrána spolu so vzorkami bola ponechaná na vzduchu pri laboratórnej teplote až do úplného vyschnutia.
2. PVDF membrána bola ponorená do fosfátového pufru s obsahom 5% blotting grade blocker a 0,05% Tween 20 po dobu 12-16 hodín (cez noc) v teplote 4 °C s miernym kývaním. Cieľom tohto kroku bolo obsadenie celej membrány proteínmi a tým pádom aj nešpecifickému naviazaniu protilátok na neobsadenú membránu.
3. Po inkubácii cez noc, bola membrána premytá vo fosfatovom pufri s obsahom 0,05% Tween 20 a následne inkubovaná so špecifickou anti-Vga(A)_{LC} protilátkou resuspendovanou vo fosfátovom pufri s obsahom 1% blotting grade blocker a 0,05% Tween 20 v pomere 1:10 000 pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny s miernym kývaním.

4. Po inkubácii špecifickou protilátkou bola membrána premytá vo fosfátovom pufri s obsahom a 0,05% Tween 20 po dobu 15 minút s miernym kývaním. Tento krok bol opakovaný 4 krát.
5. Po premytí bola membrána inkubovaná v sekundárnej kozej protilátke v pomere 1:2000, ktorá bola resuspendovaná vo fosfátovom pufri s 1% blotting grade blocker a 0,05% Tween 20 pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny s miernym kývaním.
6. Po inkubácii sekundárnou protilátkou boli membrány premývané vo fosfátovom pufri s obsahom a 0,05% Tween 20 po dobu 15 minút pri laboratórnej teplote s miernym kývaním.
7. K detekcii nami sledovaného proteínu pošlo pri použití chemiluminiscentného substrátu (Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate). Na dokumentáciu signálu bol používaný prístroj ChemiDoc XRS+ (BioRad).

- Imunoanalýza pomocou imunoblotu (Western Blot)

Imunoblot sa radí medzi analytické metódy, pomocou ktorých je možné detegovať špecifický proteín v zmesi s inými proteínmi. Prvým krokom je gélová efektoforéza, u ktorej dôjde k rozdeleniu proteínov na základe ich veľkosti (SDS polyakrylamidová efektoforéza). Následne po rozdelení proteínov dochádza k prenosu proteínov v gély na PVDF, alebo nitrocelulózoú membránu, pôsobením elektrického prúdu. Následne sú proteíny na membráne detegované špecifickými protilátkami, ktoré môžu byť značené rádioizotopom, alebo chemickými činidlami ako je napr. peroxidáza, alebo alkalická fosfatáza.

1. Pred samotným prenosom proteínov z akrylamidového gélu bola nutná aktivácia PVDF membrány v metanole po dobu 10 sekúnd a následná ekvilibrácia membrány, filtračných papierov a gélu v prenosovom pufri po dobu 10-15 minút. Počas celej procedúry bolo nutné dbať aby nedošlo k vyschnutiu všetkých komponentov.
2. Na blotovací prístroj boli ukladané komponenty tzv. sendvičovou metódou. Ako prvý bol uložený filtračný papier, PVDF membrána, gél a vrchnú časť tvoril opäť filtračný papier. Pri ukladaní membrány a gélu, bolo nutné dbať na to aby medzi jednotlivými komponentami nevznikali vzduchové bubliny, ktoré by znemožnili prenos proteínov na membránu.

3. Na prenos proteínov z gélu na PVDF membránu bol používaný Trans-Blot Semi-Dry Cell (Bio-Rad) prístroj. Tento prístroj je realizovaný ako sústava katódy (horný diel) a anódy (spodný diel), kde pôsobením elektrického napätia dochádza k prenosu proteínov.
4. Záporne nabité proteíny sú prenášané smerom k anóde, kde sú zachytávané na PVDF membráne. Prenos prebiehal pri napätí 15 V po dobu 15 minút. Záporne nabité proteíny boli prenášané smerom k anóde, kde sú zachytávané na PVDF membráne.
5. Následne bola PVDF membrána ponorená do fosfátového pufru s obsahom 5% blotting grade blocker a 0,05% Tween 20 po dobu 12-16 hodín (cez noc) v teplote 4 °C s miernym kývaním. Cieľom tohto kroku bolo obsadenie celej membrány proteínmi a tým pádom aj nešpecifickému naviazaniu protilátok na neobsadenú membránu.
6. Po inkubácii cez noc, bola membrána premytá vo fosfátovom pufri s obsahom a 0,05% Tween 20 a následne inkubovaná so špecifickou protilátkou resuspendovanou vo fosfátovom pufri s obsahom 1% blotting grade blocker a 0,05% Tween 20 pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny s miernym kývaním. Ako špecifické protilátky boli používané anti-Vga(A)LC (v pomere 1:1000) v prípade detekcie Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteínu, alebo anti-S7 protilátka (v pomere 1:1000) v prípade detekcie ribozómov.
7. Po inkubácii špecifickou protilátkou bola membrána premytá vo fosfátovom pufri s obsahom 0,05% Tween 20 po dobu 15 minút s miernym kývaním. Tento krok bol opakovaný 4 krát.
8. Po premytí bola membrána inkubovaná v sekundárnej protilátke, ktorá bola resuspendovaná vo fosfátovom pufri s 1% blotting grade blocker a 0,05% Tween 20 pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny s miernym kývaním. Sekundárna protilátka má špecificitu voči epitopom primárnej protilátky. V prípade detekcie Vga(A) proteínov bola ako sekundárna protilátka používaná kozia protilátka (v pomere 1:2000), v prípade detekcie ribozómou bola používaná myšia protilátka (v pomere 1:2000).
9. Po inkubácii sekundárnou protilátkou boli membrány premývané vo fosfátovom pufri s obsahom 0,05% Tween 20 po dobu 15 minút pri laboratórnej teplote s miernym kývaním.

10. K detekcii nami sledovaného proteínu došlo pri použití chemiluminiscentného substrátu (Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate). Na dokumentáciu signálu bol používaný prístroj ChemiDoc XRS+ (BioRad).

4.2.10. Stanovenie citlivosti na antimikróbne látky

Testovanie citlivosti na antimikróbne látky je štandardom, ktorý je využívaný v mikrobiológii. Základom testovania citlivosti je kvalitatívne alebo kvantitatívne stanovenie citlivosti. Princípom kvalitatívneho testovania je difúzia antimikróbnej látky z disku do agaru, kedy dochádza k vytvoreniu koncentračného gradientu antimikróbnej látky. Na základe veľkosti inhibičnej zóny sa hodnotí mikroorganizmus ako citlivý, rezistentný, alebo intermediárny, avšak u tohto testu nie je možné zistiť koncentráciu antibiotika, ktorá inhibuje rast. Typickým príkladom kvalitatívnej metódy je diskový difúzny test. Kvantitatívne testovanie spočíva v určení minimálnej inhibičnej koncentrácie antibiotika, ktorá inhibuje rast baktérii. Na základe určenia minimálnej inhibičnej koncentrácie sa mikroorganizmus hodnotí ako citlivý, rezistentný, alebo intermediárny, rovnako ako v predchádzajúcom prípade. Príkladom tejto metódy je stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie mikrodilúčnou metódou.

4.2.10.1. Stanovenie citlivosti na antimikróbne látky mikrodilúčnou metódou.

Testovanie citlivosti na antimikróbne látky mikrodilúčnou metódou prebiehalo v 96-jamkových sterilných mikrotitračných platničkách s obsahom Mueller-Hinton (MH) média a postupne sa zvyšujúcou sa koncentráciou antibiotika. Rozmedzie koncentrácií antimikróbných látok nebolo u všetkých testovaných kmeňov identické. Rozmedzie bolo volené podľa experimentu a kmeňov exprimujúcich jednotlivé rezistenčné determinanty v závislosti na miere rezistenčného fenotypu. Výsledkom tejto metódy bolo stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie antimikróbnej látky, ktorý viditeľne inhibuje rast bakteriálneho kmeňa v médiu.

1. Na prípravu inokula boli odobrané čerstvo narastené bakteriálne kolónie na TSA alebo BHI agare s prídavkom chloramfenikolu o výslednej koncentrácii 25 $\mu\text{g/ml}$ (kmeň obsahujúci pRMC2 plazmid), alebo kanamycínu o výslednej koncentrácii 80 $\mu\text{g/ml}$ (kmeň obsahujúci pRB374 plazmid). Chloramfenikol a kanamycín boli používané na udržanie plazmidu v bunke a selekciu stafylokokových buniek obsahujúci plazmid nášho záujmu. Inokulum testovaného kmeňa bolo pripravené

resuspendovaním kolónie v 2 ml fyziologického roztoku o výslednej turbidite 0,5 – 1 McF (McFarland), čo zodpovedá rozmedziu $1,5-3 \times 10^8$ buniek na 1 ml.

2. Do jednotlivých jamiek mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 100 μ l MH média s prídavkom chloramfenikolu, kanamycínu. V prípade, že to vyžadoval experiment, bol do média pridaný anhydratetracyklín ako induktor, vo výslednej koncentrácii 100 ng/ml. Následne bolo do jamiek s obsahom najvyššej koncentrácie antibiotika pridaných ďalších 100 μ l média s obsahom 2x vyššej koncentrácie antibiotika, ako bola použitá. Pridaním 2-násobnej koncentrácie antimikróbneho liečiva k už pridaných 100 μ l MH média, došlo k zriedeniu antimikróbnej látky na nami požadovanú koncentráciu. Následne bolo antibiotikum v každej jamke postupne riedené, pridaním 100 μ l média s antimikróbnu látkou z predchádzajúcej jamky. Týmto postupom bolo možné výrazne eliminovať chybu pipetovania. Prvá rada v mikrotitračnej doštičke slúžila ako kontrola, čiže MH médium obsahovalo len selekčný marker a prípadne induktor.
3. Do takto pripravenej mikrotitračnej doštičky bolo k zmesi pridaných 5 μ l pripraveného inokula do každej jamky. Na záver bol objem jamky opatrne premiešaný pipetou, za účelom získania homogenného prostredia v každej jamke. Mikrotitračná doštička bola následne zakrytá vekom a obalená parafilmom ako prevencia pred vysúšaním okrajových jamiek.
4. Aby sa eliminovala chyba pri meraní, zaznamenávala sa OD_{600} v čase $t=0$ a v čase $t=24$ hodín, spektrofotometricky (Biotek Synergy HT). Rozdielom vzniknutým medzi t_{24} a t_0 bolo možné najpresnejšie odčítanie rastu, prípadnej inhibície rastu, v každej jamke. Počas kultivácie boli mikrotitračné platničky uložené v termostate pri teplote 37°C.

4.2.11. Heterológna expresia a purifikácia LmbJ proteínu

4.2.11.1. Heterológna expresia LmbJ proteínu

Bunky *E. coli* BL21(DE3) boli transformované expresným vektorom spolu s génom kódujúcim LmbJ proteín, pET28b::*lmbJ*. Ako selekčný marker bol použitý kanamycín o výslednej koncentrácii 30 μ g/ml. Čerstvo narastené bunky boli zaočkované do

vytemperovaného LB média s prídavkom kanamycínu o výslednom objeme 500 ml a celkovou $OD_{600}=0,05-0,1$. Kultúra bola následne kultivovaná pri teplote 37°C a neustále aerovaná trepaním (200 RPM). Po dosiahnutí $OD_{600}=0,6-0,8$ bol do kultúry pridaný induktor IPTG vo výslednej koncentrácii 0,4mM. Po pridaní induktora bol proteín exprimovaný po dobu 90 minút. Nasledovne bola kultúra rýchle schladená na ľade a následne centrifugovaná pri 3000x g, po dobu 10 minút, pri teplote 4°C . Po centrifugácii bol supernatant opatrne odstránený a kultúra bola resuspendovaná v 100 ml TS-8 pufru a opätovne centrifugovaná pri 3000x g, po dobu 10 minút a teplote 4°C .

4.2.11.2. Príprava buniek na purifikáciu LmbJ proteínu

Bunky s exprimovaným proteínom LmbJ boli resuspendované v 1/40 pôvodného objemu vychladeného TS-8 pufru s obsahom 15 mM imidazolu ($V=12,5$ ml). Za neustáleho chladenia na ľade boli bunky sonikované po dobu 15 sekúnd v 6 cykloch, pričom pauza medzi jednotlivými cyklami bola 30 sekúnd. Po sonikácii bola kultúra centrifugovaná pri 15000x g, po dobu 25 minút a teplote 4°C . Supernatant bol následne používaný v ďalšom kroku.

4.2.11.3. Purifikácia LmbJ proteínu

Purifikácia prebiehala pomocou metaloafinitnej chromatografie pomocou HisTrap HP kolóny (GE Healthcare) o objeme 1 ml. Chelatačná kolóna bola pred použitím premytá 25 objemami kolónky (CV) destilovanej vody aby došlo k odstráneniu etanolu, v ktorom je matrica uchovávaná. Následne bola kolóna nabitá Ni^{2+} iónmi pomocou $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o objeme 0,5 ml. Kolóna bola následne premytá 25 CV destilovanej vody a 25 CV TS-8 pufru. Po premytí bol na kolónu nanesený supernatant, ktorý sme získali centrifugáciou v predchádzajúcom kroku. Následne bola kolóna premývaná 3 objemami CV TS-8 pufru s obsahom 15mM imidazolu, 3 objemami CV TS-8 pufru s obsahom 50mM imidazolu, 5 objemami CV TS-8 pufru s obsahom 100mM imidazolu a 5 objemami CV TS-8 pufru s obsahom 250mM imidazolu. Pri použití TS-8 pufru s obsahom 250mM imidazolu došlo k elúcii proteínu. Proteín bol zachytávaný po 1 ml alikvotách a následne analyzovaný na nitrocelulózovej membráne a pomocou SDS-PAGE elektroforézy.

4.2.11.4. Dialýza a zakoncentrovanie proteínu

Dialýza je dej, pri ktorom sú od seba oddelené látky s rôznou rozpustnosťou a veľkosťou molekúl. Tie prechádzajú cez polopriepustnú membránu z prostredia s vyššou koncentráciou týchto látok, do prostredia s nižšou koncentráciou. Aby bolo možné použitie LmbJ proteínu do metylačnej reakcie, bolo nutné odstránenie imidazolu z roztoku. Odstránenie bolo prevedené pomocou dialyzačného čreva VISKING DIALYSIS TUBING – MWCO 3500 (Serva). Dialyzačné črevo opláchnuté v dialyzačnom pufri bolo naplnené najbohatšími frakciami obsahujúcimi LmbJ proteín ($V=2$ ml). Následne bolo ponorené do dialyzačného roztoku s objemom 1000x väčším ako bol objem vzorky. Dialýza prebiehala za neustáleho miešania a pri teplote 4°C po dobu 3-4 hodín. Následne bol dialyzačný pufor vymenený za nový a bolo pokračované v dialýze cez noc (10-12 hodín). Následne bol proteín zakoncentrovaný pomocou centrifugačných filrov Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter NMWL 10kDa na objem približne 0,5 ml. Výsledná koncentrácia bola stanovená spektrofotometricky na základe zadaných hodnôt molárneho extinkčného koeficientu a molekulovej hmotnosti proteínu (DeNovix DS-11).

4.2.12. Heterológna expresia a purifikácia Vga(A)_{LC} proteínu

4.2.12.1. Heterológna expresia Vga(A)_{LC} proteínu

Bunky *E. coli* BL21(DE3) obsahujúce vektor pGroESL boli transformované expresným vektorom spolu s génom kódujúcim Vga(A)_{LC} proteín, pET42b::*vga(A)_{LC}-6His*. Ako selekčný marker bol použitý kanamycín o výslednej koncentrácii $30\ \mu\text{g/ml}$. Čerstvá kultúra bakteriálnych buniek bola zaočkovaná do vytemperovaného LB média s prídavkom kanamycínu v celkovom objeme 1 liter a výslednou $\text{OD}_{600}=0,05-0,1$. Kultúra bola následne kultivovaná pri teplote 37°C a neustále aerovaná trepaním (200 RPM). Po dosiahnutí $\text{OD}_{600}=0,6-0,8$ bola kultúra schladená a do kultúry pridaný induktor IPTG vo výslednej koncentrácii $0,4\text{mM}$. Po pridaní induktora bol proteín exprimovaný po dobu 16 hodín pri teplote 18°C . Po dosiahnutí doby expresie bola kultúra rýchle schladená na ľade a následne centrifugovaná pri $3000x\ \text{g}$, po dobu 10 minút, pri teplote 4°C . Po centrifugácii bol supernatant opatrne odstránený a kultúra bola resuspendovaná v 100 ml pufri A1 opätovne centrifugovaná pri $3000x\ \text{g}$, po dobu 10 minút a teplote 4°C . Na purifikáciu Vga(A)_{LC} proteínu bola používaná kultúra z 2 litrov LB média.

4.2.12.2. Príprava buniek na purifikáciu Vga(A)_{LC} proteínu

Bunky s exprimovaným proteínom Vga(A)_{LC} boli resuspendované vo vychladenom pufré A s obsahom 1mM imidazolu, 0,5% Tritonu X-100 a 1mM Pefabloc-SC (inhibítora proteáz). Bunky boli resuspendované v 1/50 pôvodného objemu kultúry (V=40ml) a za neustáleho chladenia na ľade sonikované po dobu 5 sekúnd s 5 sekundovou pauzou pre chladenie v 36 cykloch. Následne bola do suspenzie pridaná benzonáza v množstve 40U/ml a celá zmes bola inkubovaná 30 minút pri laboratórnej teplote s miernym kývaním. Benzonáza je nukleáza, ktorá je zodpovedná za rozštiepenie DNA. Po inkubácii s benzonázou bol do suspenzie pridaný protamín sulfát v množstve 4 mg, ktorý je zodpovedný za inhibíciu enzýmov. Zmes bola inkubovaná pri laboratórnej teplote po dobu 30 minút s miernym kývaním. Po inkubácii bola kultúra centrifugovaná pri 75600xg po dobu 30 minút, teplote 4°C, s použitím rotora JA-25.15 (Beckman Coulter). Supernatant po centrifugácii bol následne používaný v ďalšom kroku.

4.2.12.3. Purifikácia Vga(A)_{LC} proteínu

Purifikácia Vga(A)_{LC} proteínu prebiehala pomocou metaloafinitnej chromatografie pomocou Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare). Objem použitej matrice bol 1 ml. Matrica bola premývaná 20 CV pufru B. Následne bola na kolónu opatrne nanosená vzorka, kde došlo k naviazaniu proteínu na matricu pomocou histidínovej kotvy. Matrica bola premývaná 20 CV pufru C. K elúcii proteínu došlo po pridaní 10 CV pufru D, ktorý obsahoval 250mM imidazol. Počas elúcie bol eluát zbieraný po 1 ml frakciách. Každá frakcia bola nanosená na PVDF membránu a taktiež kontrolovaná pomocou SDS elektroforézy. Celá purifikácia prebiehala v otvorenej kolóne bez použitia peristaltickej pumpy, len za základe gravitácie.

4.2.12.4. Zakoncentrovanie a odsolenie proteínu pomocou PD-10 odsolovacej kolóny

Vzorky s obsahom Vga(A)_{LC} proteínu boli zakoncentrované pomocou centrifugačných filtrov Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter NMWL 10kDa na objem 1-1,5 ml. Následne bola vzorka nanosená na PD-10 odsolovaciu kolónu (GE Healthcare), ktorá bola premytá 25 ml sterilnej destilovanej vody a následne ekvilibrovaná 25 ml pufru E. Po nanesení vzorky bola kolóna premytá 3,5 ml pufru E a jednotlivé frakcie boli zbierané po 0,5 a 1 ml. Proteín bol opätovne zakoncentrovaný pomocou centrifugačných filtrov Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter NMWL

10kDa na objem 1 ml, rozdelený po alikvotách, ktoré boli prudko zmrazené v tekutom dusíku a uchovávané pri teplote -80°C.

4.2.13. Enzymatická syntéza linkomycínu

Linkomycín je možné pripraviť jeho enzymatickou reakciou z N-demetyllinkomycínu (NDL) a S-adenozyl-L-metionínu (SAM). Reakcia je katalyzovaná LmbJ proteínom tzv. N-demetyllinkomycín-metyltransferázy, ktorá je zodpovedná za prenos metylovej skupiny z SAM na NDL.

4.2.13.1. Priprava linkomycínu – reakcia s neznačeným SAM

Pri príprave [3H]-linkomycínu, bola ako prvá reakcia používaná tzv. studená reakcia, pomocou ktorej sme overovali aktivitu N-demetyllinkomycín-metyltransferázy, aby nedochádzalo k zbytočnému plytvaniu rádioaktívne značeného NDL a SAM. Zloženie reakcie je uvedené v tab. 15. Celková reakcia prebiehala pri teplote 42°C po dobu 3 hodín. SAM je látka pomerne nestabilná a preto bola do reakcie pridávaná v hodinových intervaloch, z dôvodu zvýšenia výťažnosti reakcie.

Tabuľka 15 - Zloženie „studenej“ reakcie prípravy linkomycínu

LmbJ (2mg/ml)	80 µl	
NDL (10mM)	12 µl	
SAM (5mM)	12 µl	po 1. a 2. hodine pridané po 3 µl
Tris-Cl (1M), pH=9	2,4 µl	
destilovaná voda	13,6 µl	

Výsledný produkt, linkomycín, bol overený pomocou tenkovrstvovej chromatografie. Na detekciu bolo použité Orcinolovo činidlo.

4.2.13.2. Príprava [3H]-linkomycínu

Postup v príprave [3H]-linkomycínu je identický ako je popísaný vyššie, avšak namiesto SAM bol použitý SAM s metylovou skupinou značenou trícium. Presné zloženie reakcie je uvedené v tabuľke 16. Celková reakcia prebiehala pri teplote 42°C po dobu 3 hodín. Triciovaný SAM bol do reakcie dodatočne pridávaný v hodinových intervaloch. Výsledný produkt, [3H]-linkomycín, bol overený pomocou tenkovrtvovej chromatografie. Na detekciu bolo použité orcinolové činidlo.

Tabuľka 16. - Zloženie reakcie prípravy [3H]-linkomycínu

LmbJ (9mg/ml)	44,4 µl	
NDL (100mM)	12,8 µl	
SAM (50mM)	40 µl	po 1. a 2. hodine pridané po 5 µl
Tris-Cl (1M), pH=9	20 µl	
destilovaná voda	282,8 µl	

4.2.13.3. Odstránenie vstupných produktov reakcie

Výsledná reakcia [3H]-linkomycínu obsahuje aj vstupné produkty reakcie. Na oddelenie [3H]-linkomycínu od vstupných produktov bola použitá hydrofilná, reverzne fázová matrica WATERS OASIS[®]HLB. Postup prečistenia [3H]-linkomycínu je uvedený v tab. 17. Od kroku 5. (tab. 17) bolo odobraných 2 µl vzorky, ktorá bola pridaná do 5 ml scintilačného roztoku (Ficoll). Následne bola meraná miera radioaktivity v jednotlivých krokoch aby bolo možné overiť prítomnosť linkomycínu v elučnom kroku prečistenia vzorky. Meranie rádioaktivity prebiehalo v servisnom stredisku rádiometrie Fyziologického ústavu AV ČR na prístroji Tricarb a dĺžkou merania každého vzorku 1 minúta.

Tabuľka 17. - Postup prečistenia [3H]-linkomycínu pomocou WATERS OASIS[®]HLB

1.	metanol	2 ml	aktivácia kolónky
2.	destilovaná voda	2 ml	
3.	10 mM Tris-Cl, pH=8,3	1 ml	
4.	nanesenie vzorky		
5.	5% metanol	1 ml	preplach kolónky
6.	5% metanol	1 ml	
7.	5% metanol	1 ml	
8.	20 % metanol	1,5 ml	
9.	20 % metanol	1,5 ml	
10.	20 % metanol	1,5 ml	
11.	20 % metanol	1,5 ml	elúcia
12.	100 % metanol	1 ml	
13.	100 % metanol	1 ml	

4.2.13.4. Stanovenie miery rádioaktivity v analyzovanom vzorku

Aby sme mohli stanoviť množstvo nasyntetizovaného [3H]-linkomycínu, resp. stanoviť mieru akumulácie [3H]-linkomycínu v klinických izolátoch *Staphylococcus haemolyticus* bola

nutná kvantifikácia rádioaktivity. Vzorky na analýzu v objeme 2 μ l boli pridávané do plastových scintilačných nádobiek, ktoré obsahovali 5 ml scintilačného činidla (Ficoll). Meranie radioaktivity prebiehalo v servisnom stredisku Rádiometrie Fyziologického ústavu AV ČR na prístroji Tricarb a dĺžkou merania každého vzorku 1 minúta.

4.2.13.5. Tenkovrstvová chromatografia

Tenkovrstvová chromatografia (TLC) je chromatografická metóda, ktorá sa používa na analýzu neprchavých zmesí. TLC je tvorená pevnou a mobilnou fázou. Stacionárna fáza je tvorená silikagélom nanesenom na hliníkovú fóliu.

V experimentoch v našom laboratóriu bola používaná ako stacionárna fáza Silikagel 60F₂₅₄ (Merck). Mobilná fáza bola tvorená zmesou chloroformu, metanolu a amoniaku v pomere (12:3:0,1). Ako štandard bol používaný komerčný linkomycín o koncentrácii 1 μ g/ml a NDL o koncentrácii 1 μ g/ml.

Roztok vzorky o objeme 1 μ l bol nanesený na tzv. štart, t.j. oblasť približne 2 cm od okraja stacionálnej fázy. Spolu so vzorkou ako kontroly boli nanesené linkomycín a NDL o objeme 1 μ l. Nanesené vzorky sa nechali usušiť a následne sa stacionárna fáza ponorila do nádoby s obsahom pohyblivej fázy. Nádoba sa uzavrela a vzorka sa nechali unášať pohyblivou fázou smerom hore. Vo chvíli kedy mobilná fáza dosiahla cca 15 cm od štartu, sa stacionárna fáza nechala usušiť a následne sa detegovala Orcinolovým činidlom. Porovnávala sa vzdialenosť komerčného linkomycínu a syntetizovaného linkomycínu od štartu.

4.2.14. Meranie akumulácie [3H]-linkomycínu u klinických izolátoch

Miera akumulácie [3H]-linkomycínu bola sledovaná v rámci kultivácie buniek v médiu. Princípom metódy bolo sledovanie, množstva a priebehu akumulácie [3H]-linkomycínu v bakteriálnych bunkách u jednotlivých izolátoch. U tohto typu experimentu bola použitá trepačka vo vodnom kúpeli, z prevencie aby nedochádzalo k zmenám teploty média, čo by sa prejavilo zmenou rastových vlastností jednotlivých kmeňov.

1. Klinické izoláty zahrnuté v tomto experimente boli vyočkované na BHI agar a kultivované pri teplote 37°C, 16-18 hodín. Následne bola bakteriálna kultúra inokulovaná do vytemperovaného H média a kultivovaná pri teplote 37°C a aerácii trepaním, (200 RPM) do OD₆₀₀=0,7-0,8, čo odpovedalo exponenciálnej fáze.

2. Po dosiahnutí požadovanej OD_{600} bola kultúra preočkovaná do vytemperovaného H média s obsahom linkomycínu s koncentráciou 0,25 $\mu\text{g/ml}$ a [3H]-linkomycínu ($V=100 \mu\text{l}$), tak aby výsledná OD_{600} bola 0,5.
3. Ihneď po inokulácii bakteriálnou kultúrou bolo odobraných z média 3 ml kultúry a zároveň zmeraná OD_{600} . Bakteriálna kultúra bola prefiltrovaná cez nilonový filter s veľkosťou pórov 0,45 μm . Bakteriálne bunky boli následne premyte 5 ml HEPES A pufru s obsahom linkomycínu o výslednej koncentrácii 50 $\mu\text{g/ml}$ a 1 mM dithiothreitolom. Antibiotikum pridávané do HEPES A pufru bolo zvolené z dôvodu aby nedošlo k vyriedňovaniu linkomycínu z bakteriálnych buniek. Po premytí bol filter s bakteriálnymi bunkami prenesený do 5 ml scintilačného roztoku v scintiláčnej fľaštičke.
4. Tento postup bol opakovaný v 5. a 10. minúte, a následne každých 10 minút až do dosiahnutia 120. minúty. Následne bola rádioaktivita vo vzorkách prepočítaná na počiatočnú optickú denzitu v čase t_0 . V prípade dosiahnutia vyššej OD_{600} ako 1 bola kultúra riedená 2 dielmi H média a následne reálna OD_{600} matematicky prepočítaná.

4.2.15. Práca s bakteriálnymi ribozómami

4.2.15.1. Príprava bakteriálnej kultúry *S. aureus* na prácu s ribozómami

1. Použitý bakteriálny kmeň bol vyočkovaný na BHI agar s prídavkom selekčného markera (u pRMC2 bol použitý chloramfenikol vo výslednej koncentrácii 25 $\mu\text{g/ml}$). Kultúra bola kultivovaná pri teplote 37°C cez noc. Následne bola kolónia inokulovaná do BHI média ($V=5\text{ml}$) s prídavkom selekčného markra a kultivovaná pri teplote 37°C cez noc.
2. Do vytemperovaného média s objemom 120 ml a prídavkom selekčného markra, linkomycínu a induktora (induktor anhydratetracyklín o výslednej koncentrácii 100 ng/ml) bola inokulovaná kultúra kultivovaná cez noc na výslednú $OD_{600}=0,05-0,06$. Kultúra bola kultivovaná pri teplote 37°C, s miešaním (200 RPM) do výslednej $OD_{600}=0,7-0,8$.
3. Po dosiahnutí požadovanej OD_{600} bola kultúra centrifugovaná pri 7000x g/10 minút/4°C.

4. Bunečný pelet bol premytý pufrom I. a suspenzia opätovne centrifugovaná pri 7000x g/10 minút/4°C. Supernatant bol odstránený a bakteriálne bunky boli šokovo zmrazené v tekutom dusíku a následne uchovávané pri teplote -80°C.

4.2.15.2. Príprava bakteriálnych kultúr kmeňa *S. haemolyticus*

1. Použitý bakteriálny kmeň bol vyočkovaný na BHI agar. Kultúra bola kultivovaná pri teplote 37°C cez noc. Následne bola kolónia inokulovaná do BHI média (V=5 ml) a kultivovaná pri teplote 37°C cez noc.
2. Do vytemperovaného média s objemom 120 ml s prídavkom linkomycínu (1 mg/l) bola inokulovaná bakteriálna kultúra na výslednú OD₆₀₀=0,05-0,06. Kultivácia prebiehala pri teplote 37°C, s miešaním (200 RPM) do výslednej OD₆₀₀=0,7-0,8.
3. Po dosiahnutí požadovanej OD₆₀₀ bola kultúra centrifugovaná pri 7000x g/10 minút/4°C.
4. Bunečný pelet bol premytý pufrom I. a suspenzia opätovne centrifugovaná pri 7000x g/10minút/4°C. Supernatant bol odstránený a bakteriálne bunky boli šokovo zmrazené v tekutom dusíku a následne uchovávané pri teplote -80°C.

4.2.15.3. Pripráva bakteriálneho lyzátu pomocou Emulsiflex C3 (Avestin)

Pomocou prístroja Emulsiflex C3 bol pripravovaný bakteriálny lyzát..

1. Bunkový pelet bol resuspendovaný v 2 ml pufru II. S prídavkom lyzostafínu (10 mg/ml) o objeme 50 µl a celá zmes bola inkubovaná po dobu 15 minút pri teplote 37°C.
2. Zmes bola následne centrifugovaná 4000x g/10 minút/4°C. Supernatant bol opatrne odstránený a bunky boli resuspendované v 1 ml pufru I. s prídavkom linkomycínu.
3. Bunková suspenzia bola následne homogenizovaná pomocou prístroja Emulsiflex C3 pri maximálnom tlaku 10 000 – 15 000 psi celkom 5 krát.

4.2.15.4. Príprava bakteriálneho lyzátu pomocou FastPrep-24™ (MP Biomedicals)

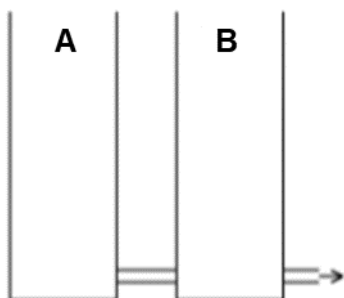
Pomocou prístroja FastPrep-24™ bol pripravovaný bakteriálny lyzát, ktorý bol následne používaný na kopurifikáciu Vga(A)_{LC} proteínu spolu s bakteriálnymi ribozómami.

1. Zcentrifugovaná bakteriálna kultúra ($V=100$ ml) bola znovu resuspendovaná v 1 ml pufru I. a ku kultúre bolo pridaných 0,5 g mikroguličiek s priemerom 0,1 mm. Celá suspenzia bola neustále chladená na ľade.
2. Homogenizácia prebiehala vo všetkých po sebe nasledujúcich cykloch pri rýchlosti $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 20 sekúnd. Medzi každým opakovaním bola vzorka schladená po dobu 2 minút na ľade.
3. Následne bola suspenzia centrifugovaná pri $3000\times g/3$ minúty/ 4°C , aby došlo k oddeleniu guľičiek od lyzátu.

4.2.15.5. Príprava sacharózového gradientu

Na obr. 25 je schematicky znázornené zariadenie Hoefer SG 50. Jedná sa o dve spojené nádoby obsahujúce rozličné koncentrácie sacharózy, ktoré umožňujú postupné miešanie oboch roztokov za vzniku gradientu.

1. Ventil medzi valcom A a B sa uzavrie. Do valca B sa umiestni magnetické miešadlo.
2. Do valca označeného písmenom A sa napipetuje 8 ml pufru I. s obsahom sacharózy o nižšej koncentrácii (7% alebo 10%). Do valca B sa napipetuje 8 ml pufru I. s obsahom vyššej koncentrácie sacharózy (30% alebo 45%).
3. Pootvorením ventilu dochádza k prepojeniu oboch nádob, kedy dochádza k postupnému miešaniu roztokov s rôznymi koncentráciami sacharózy. S hadičkou pripojenej u vypusti je do ultracentrifugačnej skúmavky pomaly vrstvený roztok sacharózy. Aby nedochádzalo k víreniu roztoku v skúmavke, udržiava sa hadička približne 0,5 – 1 mm nad hladinou vrstveného roztoku.



Obrázok 25. – Znázornenie aparatury Hoefer SG-50 na prípravu sacharózového gradientu.

4.2.15.6. Ribozómalne profilovanie v sacharózovom gradiente

Cieľom tohto experimentu je rozdelenie bunkovej frakcie sacharózovým gradientom na ribozómy a ribozómálne podjednotky. Pri optimálnom zvolení sacharózového gradientu je možné detegovať až polyzómy.

1. Bunkový lyzát (príprava spomenutá vyššie pomocou FastPrep-24™) bol centrifugovaný pri 16 000x g/10 minút/4°C (16S frakcia). Cieľom tejto centrifugácie bolo oddelenie bunkovej steny od obsahu kompartmentov v cytoplazme.
2. Pre všetky vzorky bola stanovená koncentrácia celkovej RNA pomocou Qubit™ RNA HS. Vzorky boli následne upravené na rovnakú koncentráciu RNA.
3. Supernatant bunkového lyzátu bol opatrne navrstvený na sacharózový gradient o maximálnom objeme 1 ml a ultracentrifugované 35 000 RPM (rotor SW41 BeckmanCoulter) po dobu 3 hodín, pri teplote 4°C, u sacharózového gradientu 7%-45%. Pri použití sacharózového gradientu 10% - 30% bola použitá rýchlosť 20 000 RPM (rotor SW41 BeckmanCoulter), doba ultracentrifugácie 17 hodín pri teplote 4°C.
4. Následným krokom bolo rozoberanie frakcii pomocou rozoberača frakcii (BeckmanCoulter), ktorý bol pripojený na pumpu a následne UV-detektor. Pomocou detektora bola analyzovaná absorbanca pri vlnovej dĺžke 260nm v čase. (prístroj LCD 5000-PIKRON, program CHROMuLAN 0.91). Vzorky boli rozoberané po objeme 1 ml, resp. 0,5 ml.
5. Vzorky o objeme 1 ml boli precipitované pomocou 100% TCA (trichlóroctovej kyseliny) o objeme 100 µl (v prípade vzoriek o objeme 0,5 ml bolo použitých 50 µl TCA. Vzorky boli následne uložené pri teplote -20°C cez noc. Po inkubácii s TCA boli vzorky centrifugované pri 15 000x g/ 10 minút/ 4°C. Supernatant bol následne opatrne odstránený a sediment bol premytý 100 µl ľadovo vychladeného acetónu. Celá zmes bola centrifugovaná pri 15 000x g/ 10 minút/ 4°C. Následne sa postup premytia acetónom opakoval spolu s centrifugáciou. Po centrifugácii bol acetón odstránený a mikroskúmavka sa nechala vysušiť od zbytkového acetónu. Následne bolo do mikroskúmavky pridaných 50 µl 8M močoviny a vzorka bola opatrne resuspendovaná. K zmesi sa pridalo 25 µl 3x koncertovaného vzorkového pufru a zmes sa denaturovala 10 minút pri teplote 99°C.

6. Následne boli vzorky analyzované pomocou SDS-akrylamidovej elektroforézy nasledovanou imunochemickou detekciou Vga(A)_{LC} proteínu a S7 ribozómálnej podjednotky.

4.2.15.7. Kopurifikácia Vga(A)_{LC} proteínu s bakteriálnymi ribozómami pomocou ionexovej chromatografie

Ionexová chromatografia je založená na iónových interakciách medzi ionexom a separovanou látkou, ktorá nesie opačný náboj. Sila väzby je ovplyvnená hodnotou pH a veľkosti iónovej sily v prostredí. Zvýšením iónovej sily dochádza k elúcii ribozómov spolu s Vga(A)_{LC} proteínom.

1. Bakteriálny lyzát pripravený pomocou FastPrep-24™ bol centrifugovaný pri 3000x g/ 3 minúty/ 4°C, z dôvodu odstránenia guľičiek a oddelenia bakteriálnej suspenzie.
2. Suspenzia bola opatrne prepipetovaná do mikroskúmavky, do ktorej bolo pridaných 5 µl TURBO DNázy I (2U/ul) (Invitrogen) a zmes bola inkubovaná 30 minút na ľade. Následne bola celá zmes centrifugovaná pri 30 000x g/ 30 minút/ 4°C.
3. Po centrifugácii bol lyzát opatrne prepiperovaný do novej skúmavky a obohatený NH₄Cl na výslednú molárnu koncentráciu 350mM. Takto obohatený lyzát bol následne prefiltrovaný cez PVDF filter s veľkosťou pórov 0,22 µm. Použitie DNázy I, obohatenie na 350mM NH₄Cl a následná filtrácia lyzátu je za účelom ochrany a potlačenia nešpecifických väzieb na ionexovú kolónu.
4. Pomocou tuberkulínovej striekačky o objeme 1 ml sa suspenzia naniesla na ekvilibrovanú monolitovú CIMmultus™ QA-1 kolónu (kolóna bola ekvilibrovaná 20 ml pufrom RA).
5. Premývanie kolóny a následná elúcia prebiehala pomocou NGC chromatografického systému (BioRad). V prvom kroku bola premývaná pufrom RA o objeme 25 ml. Po premytí bola v rámci metódy pre purifikáciu proteínu (NGC ChromLab Software) nastavená možnosť automatického miešania RA a RB o výslednej koncentrácii 0,6M NH₄Cl. Nasledovala elúcia gradientom 0,6-0,9M NH₄Cl. Jednotlivé elúčne frakcie boli zbierané po 1 ml. K elúcii ribozómov dochádzalo pri koncentrácii 0,7M NH₄Cl.

6. Jednotlivé frakcie boli následne analyzované pomocou SDS-akrylamidovej elektroforézy nasledovanou imunodetekciou Vga(A)_{LC} proteínu a S7 ribozomálnej podjednotky. Frakcia bohatá na ribozómy bola následne analyzovaná pomocou sacharózového gradientu (10% - 30%) z dôvodu detekcie 70S ribozómov a ich podjednotiek.

5. Výsledky

Moja dizertačná práca sa zameriava na pochopenie mechanizmu funkcie rezistenčných ABC-F proteínov so zameraním na Vga(A)_{LC} a Msr(A), ktoré spadajú do ARE1 podrodiny ABC-F proteínov a prirodzene sa vyskytujú aj u stafylokokov. Táto práca priamo nadväzuje na moju diplomovú prácu.

5.1. Vplyv sekvencie VgaA linkeru na špecificitu rezistencie

Cieľom tejto časti práce bolo zistiť, ktoré aminokyseliny a zároveň ako rozhodujú o špecificite rezistencie k linkozamidom a streptogramínom A. Medzi stafylokokovými izolátmi sa vyskytuje mnoho Vga(A) variant, ktoré sa líšia svojou schopnosťou udeľovať rezistenciu k linkozamidom a streptogramínom A (G. Novotna & Janata, 2006; Vimberg et al., 2020). Za rôznu antibiotickú špecificitu sú zodpovedné aminokyselinové zvyšky v špičke linkeru, konkrétne v pozíciách 212, 219, 220 a 226 (G. Novotna & Janata, 2006). Zaujímalo nás, či je možné na základe znalosti sekvencie linkeru predpovedať rezistenčný fenotyp. Aminokyselinové zvyšky LGAG v pozícií 212, 219, 220 a 226 sú charakteristické pre Vga(A) proteín, ktorý udeľuje nízku rezistenciu k linkomycínu, ale vysokú rezistenciu k streptogramínom A. Avšak aminokyselinové zvyšky SVTS vo vyššie spomínaných pozíciách, sú charakteristické pre Vga(A)_{LC} proteín a sú zodpovedné za vysokú rezistenciu k linkozamidom a nízku k streptogramínom A. Cieľom bolo pripraviť aminokyselinové zámény medzi Vga(A) a Vga(A)_{LC} a zistiť ako to ovplyvní výsledný rezistenčný fenotyp. V diplomovej práci boli pripravené konštrukty s kombináciou aminokyselín SGTS, SVTG, SGTG, SVAS, LGTS, LVTS, LGAS, SGAG v pozíciách 212, 219, 220 a 226, ktoré boli testované diskovou difúznou metódou a zaznamenané jednotlivé priemery inhibičných zón.

V roku 2011 bol objavený variant Vga(A), ktorý obsahoval v oblasti linkeru na pozadí Vga(A) proteínu (kombinácia aminokyselín LGAG) ďalšiu aminokyselinovú zámenu K218T (Qin et al., 2011). Táto varianta okrem rezistencie udeľovanej k streptogramínom udeľovala zvýšenú mieru rezistencie aj k linkozamidom. Bolo zaujímavé zistiť, aká bude zmena rezistenčného fenotypu, v prípade, že dôjde k zámene K218T a zároveň aminokyselinové zvyšky v pozíciách 212, 219, 220 a 226 budú charakteristické pre Vga(A)_{LCba}.

5.1.1. Príprava mutovaných variant Vga(A) a Vga(A)_{LC}

Nové Vga(A) varianty boli pripravené cielenou mutagenézou tak ako v diplomovej práci (Lenart, 2012). Celý postup prebiehal podľa návodu v kapitole 4.2.3. Pre cielenú mutagenézu bol použitý templát kódujúci hybridný proteín Vga(A)_{LCba}, ktorý udeľuje najväčšiu hladinu rezistencie (G. Novotna & Janata, 2006). Pre mutagenézu boli použité komplementárne oligonukleotidy obsahujúce jednotlivé mutácie v cieľovom mieste (zoznam použitých primerov a postup obsahujúci zloženie reakčnej zmesi je uvedený v kapitole 4.1.4. a 4.2.3.).

Výsledný konštrukt bol transformovaný do superkompetentných buniek *E. coli* XL-1 Blue pomocou teplotného šoku a bunky boli vyočkované na LB agar s kanamycínom (100 µg/ml) a kultivované pri teplote 37°C po dobu 24 hodín (kap. 4.2.2). U každého konštraktu boli analyzované tri náhodne klony: tri nezávislé kolónie boli zaočkované do LB bujónu s prídavkom kanamycínu (100 µg/ml) a po pomnožení bola vyizolovaná plazmidová DNA. Plazmidová DNA bola spolu s prídavkom špecifického primeru VgaK2F odoslaná na sekvenáciu do firmy Macrogen. V prípade správnej kombinácie aminokyselín v špecifickom mieste, bola sekvenačná analýza doplnená o sekvenácie koncov génov, pomocou špecifických primerov M13 f a M13 r pre overenie správnosti celého génu.

Správne mutovaný gén bol následne preklonovaný do vektoru pRB374 s konštitutívnym promótorom *vegII*, vhodného pre expresiu v *Staphylococcus aureus* RN4220. Fragment o veľkosti 1287 bp bol vyštiepený pomocou restričných endonukleáz BsaBI a EcoRI-HF z vektora pJAKO (kap. 4.2.4). Takto vyštiepený fragment bol separovaný pomocou agarózovej elektroforézy, čím došlo k oddeleniu požadovaného fragmentu od zvyšnej časti vektora pJAKO (kap. 4.2.8.). Po izolácii fragmentu z gélu bol fragment ligovaný do vektora pRB374, obsahujúceho *vga(A)_{LCba}*, ktorý bol linearizovaný identickými restričnými endonukleázami (kap. 4.1.10 a 4.2.6.). Zoznam takto pripravených konštruktov je uvedený v tabuľke 18.

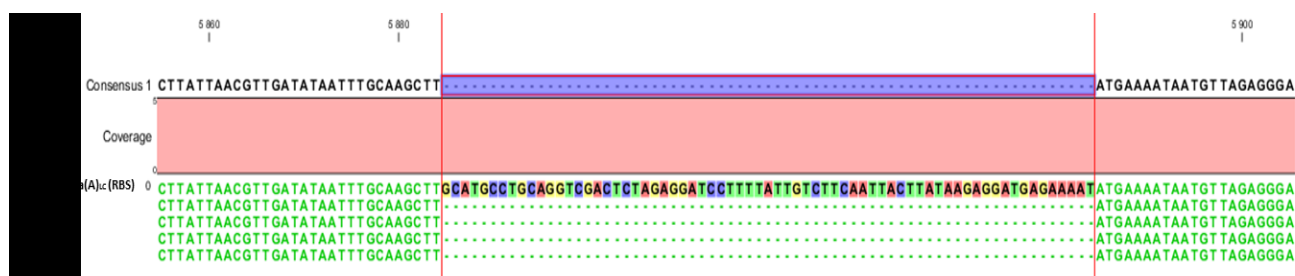
Tabuľka 18. – Zoznam pripravených konštruktov a spôsob klonovania do vektora pRB374

označenie konštruktú	použitý vektor	Aminokyselinová zámena v géne <i>Vga(A)_{LCba}</i> (číslo udávajú aminokyselinovú pozíciu)				Restrikčné endonukleázy používané k restrikcii	veľkosť ligovaného fragmentu
		212.	219.	220.	226.		
SGAS	pRB374.vga(A) _{LCba}	S	G	A	S	BsaBI, EcoRI	1287bp
SVAG	pRB374.vga(A) _{LCba}	S	V	A	G	BsaBI, EcoRI	1287bp
LVTG	pRB374.vga(A) _{LCba}	L	V	T	G	BsaBI, EcoRI	1287bp
LVAS	pRB374.vga(A) _{LCba}	L	V	A	S	BsaBI, EcoRI	1287bp
LVAG	pRB374.vga(A) _{LCba}	L	V	A	G	BsaBI, EcoRI	1287bp

* Pozn. Červenou farbou sú označené aminokyseliny proteínu *Vga(A)*, zelenou farbou sú označené aminokyseliny *Vga(A)_{LC}* proteínu

Ligačná reakcia prebiehala za dvoch teplotných podmienok. Prvotná ligácia prebiehala inkubáciou ligačnej zmesi pri laboratórnej teplote počas 1 hodiny. Následne polovica zmesi bola transformovaná do kompetentných buniek *E.coli* JM109 a vysiata na LB agar s prídavkom karbenicilínu (100 µg/ml). Zvyšná časť ligačnej zmesi bola inkubovaná pri teplote 4°C cez noc. Po inkubácii cez noc bola zvyšná časť ligačnej zmesi transformovaná do kompetentných buniek *E. coli* JM109 a vyočkovaná na LB agar s prídavkom karbenicilínu (100 µg/ml). Jednotlivé narastené klony boli zaočkované do LB média s prídavkom karbenicilínu (100 µg/ml) a kultivované do nasledujúceho dňa kedy bola vyizolovaná plazmidová DNA (kap. 4.1.10.). Správnosť konštruktov bola overená spätným vyštiepením restrikčnými enzýmami BsaBI a EcoRI-HF.

Podarilo sa pripraviť všetky kombinácie aminokyselín v pozíciách 212, 219, 220 a 226 s výnimkou konštruktú LGTG, ktorý ani po niekoľkonásobnom opakovaní experimentu nebolo možné pripraviť. Vo finálnom kroku bola celá knižnica mutovaných *vga(A)* variant opätovne sekvenovaná pomocou špecifických primerov pRB374 f, pRB374 r a VgaK2 f. Sekvenačnou analýzou sme zistili, že u konštruktov obsahujúcich kombináciu aminokyselín SGTG, LGAS, SVAS a SGTS, ktoré boli pripravené počas môjho magisterského štúdia, došlo k delícii ribozóm viažuceho miesta (obr.26). Tieto varianty boli preklonované vyštiepením fragmentu o veľkosti 1287bp (kap. 4.2.4.) restrikčnými endonukleázami BsaBI a EcoRI-HF a následne ligované do konštruktú pRB374::*vga(A)_{LCba}*, opracovaného rovnakými enzýmami tab. 19 (kap. 4.2.6.). Postup prípravy bol identický ako je uvedené vyššie. Takto pripravené konštrukty boli vo finálnom kroku opätovne overené sekvenáciou pomocou špecifických primerov pRB374F, pRB374R a VgaK2F.



Obrázok 26. Porovnanie jednotlivých sekvencií s absenciou RBS

Tabuľka 19. - Zoznam opravených konštruktov u ktorých došlo k delícii RBS

označenie konštrukt	použitý vektor	Aminokyselinová zámena v géne <i>Vga(A)_{LCba}</i> (čísla udávajú aminokyselinovú pozíciu)				Restriktčné endonukleázy používané k restrikcii	veľkosť ligovaného fragmentu
		212.	219.	220.	226.		
SGTG	pRB374. <i>vga(A)_{LCba}</i>	S	G	T	G	BsaBI, EcoRI	1287bp
LGAS	pRB374. <i>vga(A)_{LCba}</i>	L	G	A	S	BsaBI, EcoRI	1287bp
SVAS	pRB374. <i>vga(A)_{LCba}</i>	S	V	A	S	BsaBI, EcoRI	1287bp
SGTS	pRB374. <i>vga(A)_{LCba}</i>	S	G	T	S	BsaBI, EcoRI	1287bp

* Pozn. Červenou farbou sú označené aminokyseliny proteínu *Vga(A)*, zelenou farbou sú označené aminokyseliny *Vga(A)_{LC}* proteínu

Všetky konštrukty obsahujúce miestne špecifické zámery vo *vga(A)* génoch boli transformované do elektrokompetentných buniek *S. aureus* RN4220 (kap. 4.2.2.). Kmene obsahujúce vektory s inzerovanými génmi boli overené pomocou sekvenácie a kolóniovej PCR, ktorá bola použitá na amplifikáciu fragmentu obsahujúceho špecifickú zámernú aminokyselinu pomocou primerov *vgaK2 f* a *vga r* (kap. 4.2.7.). Takto pripravené kmene boli použité na testovanie minimálnych inhibičných koncentrácií v nasledujúcej kapitole.





5.1.2. Špecifita rezistencie udeľovaná pripravenými variantami *Vga(A)*

Citlivosť *S. aureus* RN4220 exprimujúceho pripravené *vga(A)* varianty z konštitutívneho *vegII* promótoru bola testovaná mikrodilúčnou metódou (kap. 4.2.10.). Do skupiny testovaných antimikrobiálnych látok, boli zaradené látky interagujúce s 50S ribozomálnou podjednotkou. Testovanými antimikrobiálnymi látkami boli linkomycín, klindamycín, tiamulín, pristinamycín IIA a erytromycín, ku ktorému *Vga(A)* neudeľuje rezistenciu, ako negatívna kontrola. Keďže mikrotitračné platničky obsahujúce stúpajúce koncentrácie jednotlivých antibiotík boli pripravované v laboratóriu, bol tento experiment opakovaný minimálne 4 krát (kap. 4.2.10.) v duplikátoch. Aby sa eliminovala chyba pri odčítavaní, zaznamenávala sa OD₆₀₀ v čase t=0 a v čase t=24 hodín. Na základe rozdielov týchto dvoch časov, bolo možné stanoviť

inhibičnú koncentráciu pre dane antibiotikum. Ako kontroly pri tomto testovaní bol použitý kmeň *S. aureus* RN4220 s prázdny plazmidom pRB374, kmeň *S. aureus* RN4220 exprimujúci Vga(A)_{LCba}, Vga(A)_{xlc} (G. Novotna & Janata, 2006) a referenčný kmeň *S. aureus* ATCC29213. Rezistenčný fenotyp udeľovaný Vga(A) kombinujúci aminokyseliny LGTG, ktorú nebolo možné pripraviť bol predikovaný s použitím jednovrstvových neuronových sietí (Auer et al., 2008). v spolupráci s Mgr. Jánom Vojtom.

Na základe hodnôt minimálnych inhibičných koncentrácií môžeme tieto kmene, exprimujúce mutované varianty *vga(A)*, rozdeliť do troch skupín podľa rezistencie udeľujúcej k jednotlivým antibiotikám (obr. 27). Prvá skupina je tvorená mutovanými proteínmi, ktoré sú zodpovedné za substrátovú špecifitu rovnakú, eventuálne podobnú ako Vga(A)_{LC}. Udeľuje vysokú rezistenciu k linkomycínu, klindamycínu a taktiež k tiamulínu. Rezistencia k pristinamycínu IIA ostala zachovaná. Pre túto skupinu je charakteristický **LPSa fenotyp**. Druhú skupinu tvoria kmene produkujúce mutované proteíny, ktoré majú substrátovú špecifitu podobnú ako Vga(A) proteín. U nej pozorujeme zvýšenú rezistenciu k pristinamycínu IIA, avšak rezistencia k linkomycínu, klindamycínu ostala nezmenená. Táto skupina sa vyznačuje **Sa fenotypom**. Tretiu skupinu tvoria konštrukty, ktoré udeľujú nízku rezistenciu k vyššie spomínaným antibiotikám. Fenotyp prirodzených variant, ktoré sme testovali v publikácii (Vimberg et al., 2020) sa zhoduje s nami definovanými fenotypmi u pripravených mutovaných variant.

Prekvapivo varianta LTGAG, ktorá sa od Vga(A) (kombinácia aminokyselín LKGAG) líši len v jednej aminokyseline udeľuje vysokú hladinu rezistencie ako k linkozamidom, tak aj k streptogramínom A a pleuromutilínom.

AA combinations in positions: 212, 219, 220, 226	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	LIN	CLI	TIA	PIIA	ERY	
S V T S	8-16	4	4-8	16	0.25	
S V T G	16	4	16	16	0.5	
SG T S	16	2	32-64	8	0.5	
SG T G	8-16	1	16	8	0.5	
SV A S	8	1	4	8	0.5	
LG A G	4	0.5	1	64	0.5	
L G T G[#]	4-8	1	4	64	-	
LG T S	4-8	1	2	32	0.5	
SG A S	4	0.25	2	16	0.5	
SG A G	2	0.25-0.5	1-2	16	0.5	
LG A S	2-4	0.25	1	16	0.5-1	
SV A G	4	0.5	4	4	0.5	
LV T S	4	0.5	2	4	0.5	
LV T G	2	0.25	1	4	0.5	
LV A S	2	0.25	1	4	0.5	
LV A G	2	0.125	0.5	4	0.5-1	
212, 218, 219, 220, 226						
L T G A G	64	8	32-64	64	0.5-1	
S. aureus RN4220	1	0.125	0.5	2	0.25	
S. aureus RN4220 + pRB374	1	0.125	0.5	2	0.5	

Obrázok 27. - Hodnoty minimálných inhibičných koncentrácií u jednotlivých konštruktov kombinujúcich aminokyselinové zvyšky v pozíciach 212, 219, 220 a 226. (MIC pre antimikróbne látky u konštruktú s označením LGTG bol vypočítaný analýzou neuronových sietí) (obrázok bol publikovaný v Lenart, 2015).

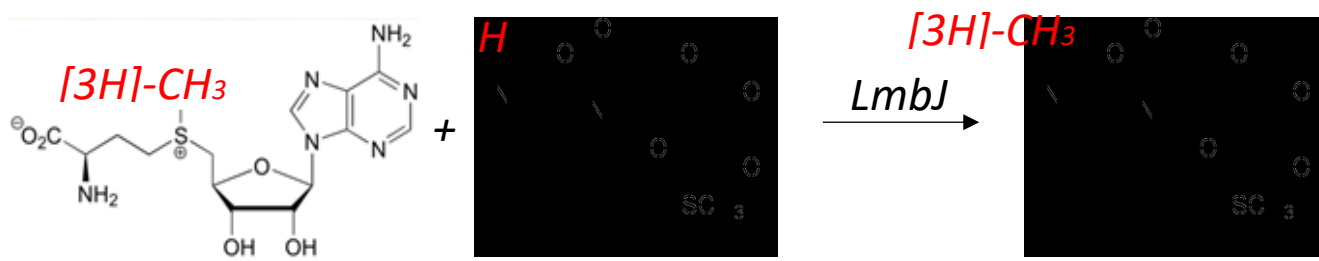
5.3. Akumulácia antibiotika v bunkách v dôsledku zmeny väzby na ribozóm

Znížená akumulácia antibiotika v bunkách s ARE ABC-F proteínom bola dlho považovaná za dôkaz, že tieto proteíny patria medzi transportéry (Chesneau et al., 2005). Avšak rovnaký efekt môže mať zníženie väzobných miest pre antibiotikum v bunke (Reynolds et al., 2003). Túto hypotézu sme chceli overiť porovnaním akumulácie rádioaktívne značeného [3H]-linkomycínu v bunkách exprimujúcich *vga(A)*, súčasne s rezistenčným génom *erm(C)*, ktorý vedie k metylácii 23S rRNA, ktorá zabraňuje väzbe linkomycínu do ribozómu. V prípade, že Vga(A) odstraňuje antibiotikum z ribozómu, tak výsledná akumulácia sa nebude líšiť od kmeňa, ktorý exprimuje iba *erm(C)*. Avšak pokiaľ by bol Vga(A) transportér, tak by dochádzalo k ďalšiemu zníženiu akumulácie linkomycínu v bunkách.

Aby sme mohli sledovať zmeny akumulácie u jednotlivých klinických izolátoch, bola nutná príprava [3H]-linkomycínu.

5.2.1. Príprava rádioaktívne značeného linkomycínu

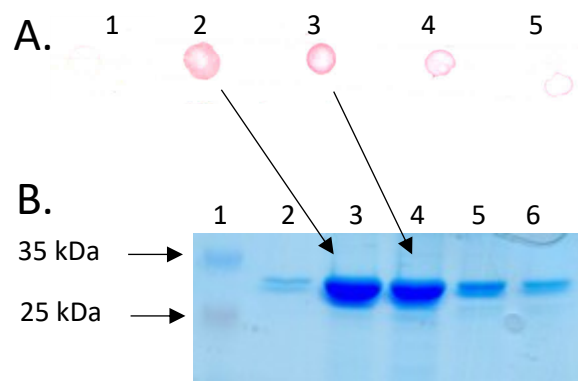
Pre prípravu [3H]-linkomycínu sme využili znalosť enzýmov biosyntetickej dráhy linkomycínu. Metyltransferáza LmbJ katalyzuje N-metyláciu propylprolínu u linkomycínových prekursorov a ma špecificitu taktiež k N-demetylalinkomycínu (NDL), ktorý však nie je jeho hlavným substrátom (Kamenik et al., 2016). Nahradením donoru metylovej skupiny S-adenozyl L-metionínu (SAM) je možné pripraviť značený [3H]-linkomycín (obr. 28).



Obrázok 28. – schématické znázornenie funkcie proteínu LmbJ

5.2.1.1. Purifikácia LmbJ proteínu

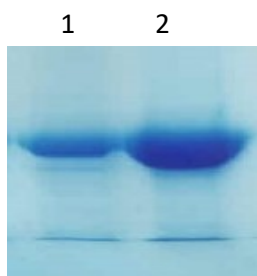
Nadprodukovaný proteín LmbJ-6His bol purifikovaný pomocou metaloafinitnej chromatografie na His-Trap kolónke. LmbJ proteín bol eluovaný pri 250mM koncentrácii imidazolu. Postup purifikácie je uvedený v kapitole 4.2.11. Vzorky boli nanosené na nitrocelulóзовú membránu o objeme 1 μ l a farebne detekované pomocou Ponceau S. Zároveň boli vzorky nanosené na SDS-PAGE elektroforézu za účelom overenia čistoty purifikácie (obr. 29).



Obrázok 29. – Purifikácia rekombinantného proteínu LmbJ (pufr – 20mM Tris-Cl, pH 8,3, 100mM NaCl, 250mM imidazol)

- A. Nitrocelulóзовá membrána obsahujúca päť frakcií z elúcie, u ktorých došlo k uvoľneniu LmbJ z kolóny pri 250 mM koncentrácii imidazolu.
- B. Elektroforeogram purifikovaného rekombinantného proteínu LmbJ (SDS-PAGE) 1.štandard molekulej hmotnosti, 2.frakcia č.1 eluovaná 250mM imidazolom, 3.frakcia č.2 eluovaná 250mM imidazolom, 4.frakcia č.3 eluovaná 250mM imidazolom, 5.frakcia č.5 eluovaná 250mM imidazolom, 6.frakcia č.6 eluovaná 250mM imidazolom.

Takto overený proteín bol následne pomocou permeačnej chromatografie prevedený do reakčného pufru. (20mM Tris-Cl, pH 8,3) (kap. 4.2.11.). Po zakoncentrovaní bola vzorka opätovne overená pomocou SDS-PAGE elektroforézy (obr. 30) a stanovená jej koncentrácia pomocou mikroobjemového UV-VIS spektrofotometra na základe extinkčného koeficientu proteínu LmbJ (16180) a molekulej hmotnosti proteínu LmbJ (29548 kDa). Výsledná koncentrácia po purifikácii bola 2,15 mg/ml.

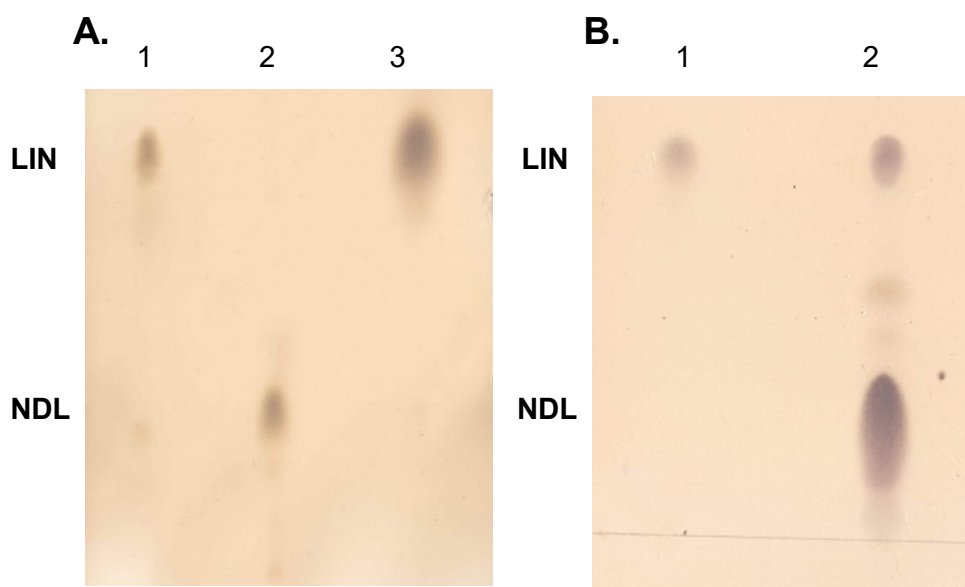


Obrázok 30. – Kontrola purifikovaného rekombinantného proteínu LmbJ po dialýze. 1. rekombinantný proteín LmbJ pred dialýzou 2. rekombinantný proteín LmbJ po dialýze a zakoncentrovaní.

5.2.1.2. Optimalizácia značiacej reakcie a samotné značenie katalyzované LmbJ

Prvým krokom prípravy linkomycínu bolo overenie aktivity LmbJ metyltrasferázy. Na toto overenie sme používali ako substrát neznačený SAM a N-demetylalinkomycín, ktorý bol vyizolovaný Mgr. Stanislavom Kadlčíkom, Ph.D. z *lmbJ* delečnej mutanty produkčného kmeňa *Streptomyces lincolnensis*. Zloženie kontrolnej reakcie je uvedené v kapitole 4.2.13. Reakcia sa nechala inkubovať pri teplote 42°C 3 hodiny. Po 1. a po 2. hodine bolo k reakcii pridaných 3 ul 5mM S-adenozín-L-metionínu. Donor metylovej skupiny bol do reakcie pridávaný za účelom zvýšenia výťažnosti reakcie. Výsledný produkt enzymatickej reakcie bol analyzovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) (obr. 31A) (kapitola 4.2.13.). Ako kontrola bol pri separácii použitý komerčne dodávaný linkomycín a N-demetylalinkomycín.

Na základe overenia aktivity LmbJ sme pristúpili k príprave trícium značeného linkomycínu. Zloženie reakcie obsahujúcej izotop [3H] je uvedené v kapitole 4.2.13.2. Reakcia bola inkubovaná pri teplote 42°C po dobu 3 hodín. Výsledný produkt bol analyzovaný pomocou TLC (obr. 31B) (kap. 5.2.13.). Ako kontrola bol použitý komerčne dodávaný linkomycín.



Obrázok 31. – TLC analýza produktu

A. 1. syntéza linkomycínu s neznačeným SAM, 2. NDL, 3. linkomycín

B. 1. linkomycín, 2. syntéza [3H]-linkomycínu so značeným [3H]-SAM

5.2.1.3. Prečistenie [3H]-linkomycínu od substrátov reakcie

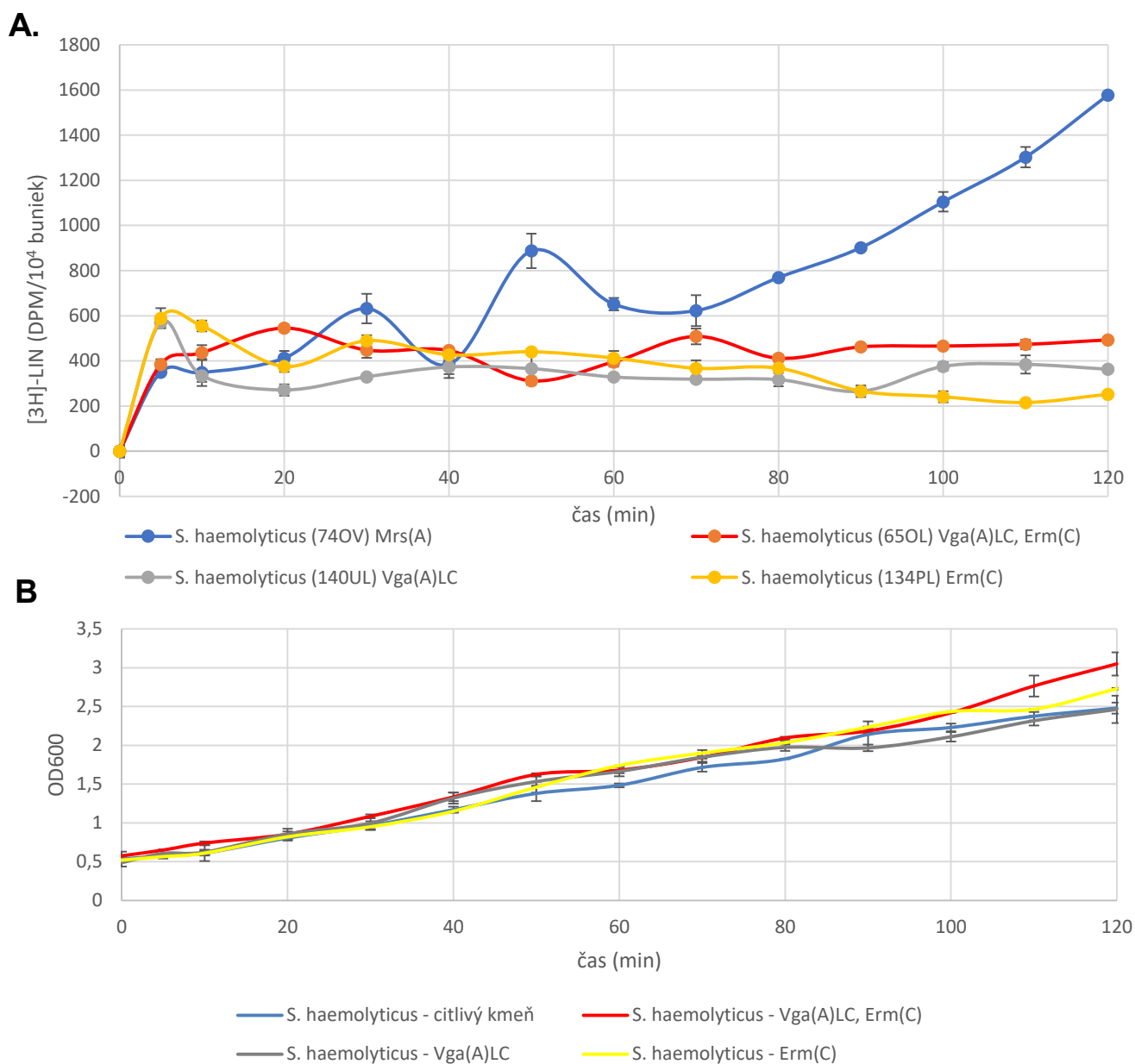
Výsledný produkt [3H]-linkomycín bolo nutné odseparovať od [3H]-SAM. K tomuto účelu bola použitá WATERS OASIS[®]HLB kolónka, ktorá obsahuje silne hydrofilnú, reverznu fázovú maticu, pomocou ktorej bolo možné oddelenie [3H]-linkomycínu od zvyšných zložiek reakcie (kap. 5.2.13.).

Po ekvilibrácii, bola na kolónu nanesená vzorka, ktorá bola následne premývaná zvyšujúcou sa koncentráciou metanolu (5%, 20%, 100%). Pri premytí 100% metanolom došlo k elúcii [3H]-linkomycínu. Do scintilačnej fľaštičky so scintilačným roztokom Ficoll (V=5 ml) boli pridané 2 µl vzorky. Prítomnosť linkomycínu v elučných krokoch bola overená rádiometricky na prístroji QuantaSmart. Výsledná radioaktivita bola **16759,9 cpm**, čo zodpovedalo **69211,98 DPM**. Takto pripravený linkomycín bol skladovaný pri teplote -80°C, až do samotného experimentu.

5.2.2. Sledovanie akumulácie [3H]-linkomycínu u *S. haemolyticus* exprimujúceho *vga(A)_{LC}* alebo *erm(C)*

Pre sledovanie akumulácie linkomycínu v bunkách s rôznou schopnosťou udeľovať rezistenciu k linkomycínu sme použili klinické izoláty *S. haemolyticus* (74OV, 140UL, 65OL, 134PL) s definovaným MLS rezistenčným genotypom (G. Novotna et al., 2005). Tieto klinické izoláty exprimovali rezistenčné gény *msr(A)*, *vga(A)_{LC}*, *erm(C)* a kombináciu *vga(A)_{LC}* a *erm(C)*. *Erm(C)* bol v oboch kmeňoch exprimovaný konštitutívne. Predpokládame, že kmeň ktorý bude exprimovať oba tieto rezistenčné gény *erm(C)* a *vga(A)_{LC}*, v prípade, kedy by bol *Vga(A)* transportér by bola akumulácia linkomycínu nižšia, než u kmeňa len s *Erm(C)*. Naopak v prípade ochrany ribozómu sa množstvo antibiotika v bunkách v porovnaní s kmeňom s metylovanými ribozómami nezmení. Ako kontrolu u tohto experimentu sme použili kmeň exprimujúci *msr(A)*, ktorý neudeľuje rezistenciu k linkomycínu.

Do vytemperovaného H média (V=50 ml) s prídavkom linkomycínu (0,25 mg/l) a [3H]-linkomycínu (V=100 µl) bola pridaná kultúra v exponenciálnej fáze rastu. Kultúra bola následne odoberaná v 10 minútových intervaloch s tým rozdielom, že na začiatku experimentu bol odber vykonaný v 0., 5. a 10. minúte. Pri každom odbere bola zaznamenaná OD₆₀₀ a rádioaktivita scintilačným meraním, ktorá odpovedala miere akumulácie linkomycínu. Experiment bol prevedený v troch nezávislých opakovaniach. U týchto kmeňov boli v určených časových intervaloch zaznamenávané OD₆₀₀ (obr. 32B) a zároveň, aj miera akumulácie [3H]-linkomycínu (obr. 32A). Z grafu znázornenom v obrázku 32A vyplýva, že kmene exprimujúce rezistenčné gény - *erm(C)*, ktorý zabraňuje väzbe linkomycínu a *vga(A)_{LC}* akumulujú menej [3H]-linkomycínu v porovnaní s kontrolným kmeňom s *msr(A)*, ktorý neudeľuje rezistenciu k linkomycínu. Graf znázornený na obrázku 32B dokladá, že všetky kultúry rástli podobne. Na základe pozorovania tohto experimentu dochádzame k záveru, že miera akumulácie [3H]-linkomycínu u kmeňov 140UL s *Vga(A)_{LC}* a 134PL s *Erm(C)* je veľmi podobná ako u kmeňa 65OL s *Erm(C)* a *Vga(A)*. Z toho môžeme usudzovať, že mechanizmus rezistencia udeľovaná *Vga(A)* spočíva v ribozomálnej ochrane avšak nie v transporte, kedy by dochádzalo k výrazne nižšej akumulácii [3H]-linkomycínu u kmeňa 65OL v porovnaní s ostatnými.



Obrázok 32. – Sledovanie akumulácie [3H]-linkomycínu u klinických izolátov kmeňa *Staphylococcus haemolyticus*.

A. Relatívna akumulácia linkomycínu u klinických izolátov kmeňa *S. haemolyticus*

B. Záznam rastu u klinických izolátov kmeňa *S. haemolyticus* počas experimentu

5.3. Interakcia ABC-F proteínov s ribozómom *in vivo*

Počas môjho štúdia vyšli prvé publikácie o EttA (Boel et al., 2014) a Msr(E) proteíne (Su et al., 2018), u ktorých boli popísané štruktúry ABC-F proteínu spolu s ribozómom, avšak chýbala charakterizácia interakcie ABC-F proteínov s ribozómom *in vivo*. Zaujímalo nás, či interakcia Vga(A) s ribozómami je podmienená prítomnosťou antibiotika a zároveň, či sa líši väzba Vga(A)-WT a jeho nefunkčných EQ mutant. Pre tieto účely sme použili profilovanie polyzómov v sacharózovom gradiente spolu s imunodetekciou Vga(A) a taktiež chromatografickú purifikáciu ribozómov spolu s Vga(A) na monolitovej aniónovej kolóne. Pomocou monolitovej kolóny sme chromatograficky kopurifikovali Lmr(C) spolu s bakteriálnymi ribozómami.

5.3.1. Príprava špecifickej anti-Vga(A)_{LC} polyklonálnej protilátky

K príprave špecifickej polyklonálnej protilátky sme sa uchýlili z dôvodu nešpecifických interakcií komerčne dodávanej anti-His protilátky. V prípade, že sme použili túto protilátku pri imunodetekcii u kmeňa *S. aureus* RN4220 dochádzalo k nešpecifickým interakciám s proteínom v tesnej blízkosti Vga(A).

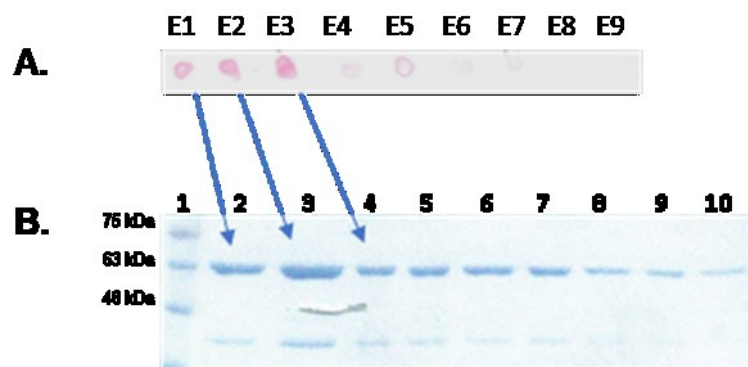
5.3.1.1. Príprava konštrukt pET42b.vga(A)_{LC}-6HIS

Konštrukt pET42b.vga(A)_{LC}-6HIS bol pripravený ligáciou linearizovaného vektora pET42b(+) pomocou restriktčných enzýmov NdeI a EcoRI (kap. 4.2.4.). Keďže vga(A)_{LC} gén obsahoval vo svojej sekvencii NdeI restriktčné miesto, bolo nutné toto miesto zrušiť cielenou mutagenézou pri zachovaní aminokyselinovej sekvencie proteínu. Pomocou miestne špecifickej mutagenézy a použitím primerov vga_del_NdeI f a vga_del_NdeI r došlo k zámene adenínu za tymín v pozícii 1395, avšak nedošlo k zmene aminokyselinovej sekvencie (4.2.3.). Takto mutovaný gén bol overený sekvenáciou pomocou primerov M13 f a M13 r. Následne bol amplifikovaný celý gén pomocou špecifických primerov Vga(A)_{LC}_pET42 f, ktoré obsahovali v koncovej časti NdeI restriktčné miesto a primeru Vga(A)_{LC}-6HIS_pET42 r, s nehomológnou sekvenciou kódujúcou 6 histidínových zvyškov spolu s restriktčným miestom EcoRI (kap. 4.2.7.). PCR produkt bol prečistený a opracovaný restriktčnými endonukleázami NdeI a EcoRI (kap. 4.2.4. a 4.1.10). Takto pripravený fragment bol ligovaný do linearizovaného vektora pET42b(+) (kap. 4.2.6.). Správnosť konštrukt bola overená spätným vyštiepením fragmentu pomocou

restrikčnej endonukleázy XbaI a EcoRI, ktorej výsledkom bol fragment o veľkosti 820 bp (kap. 4.2.4.).

5.3.1.2. Purifikácia Vga(A)_{LC} proteínu

Nadprodukováný proteín Vga(A)_{LC}-6His bol purifikovaný metaloafinínou chromatografiou pomocou matrice Ni Sepharose High Performance. V tomto experimente sme zvolili maticu pred kolónou z dôvodu vyššej výťažnosti izolácie proteínu. Matrica pred samotným nanosením vzorky bola ekvilibrovaná pufrom B. Eluované vzorky boli nanosené na nitrocelulóзовú membránu o objeme 1 μl a farbené pomocou Ponceau S (obr. 33A). Zároveň boli vzorky nanosené na SDS-PAGE elektroforézu za účelom overenia správnosti čistoty purifikácie (obr. 33B) (kap. 4.2.8. a 4.2.12.).



Obrázok 33.– Purifikácia rekombinantného proteínu Vga(A)_{LC}-6His (pufr 50mM NaH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5, 2M NaCl, 250mM imidazol)

- A. Nitrocelulóзовá membrána obsahujúca deväť frakcií z elúcie, u ktorých došlo k uvoľneniu Vga(A)_{LC} proteínu pri 250mM koncentrácii imidazolu.
- B. Elektroforeogram purifikovaného rekombinantného proteínu Vga(A)_{LC} (SDS-PAGE) 1.štandard molekulej hmotnosti 2.-10. frakcie Vga(A)_{LC} proteínu eluované 250mM imidazolom

Proteín bol následne odsolený pomocou PD-10 odsolovacej kolóny (kapitola 4.2.12.). Vzorka bola eluovaná pufrom E v objeme 3,5 ml a jednotlivé frakcie boli zbierané po 0,5 ml a 1 ml. Prítomnosť proteínu bola overená pomocou SDS-PAGE elektroforézy (obr. 34.)

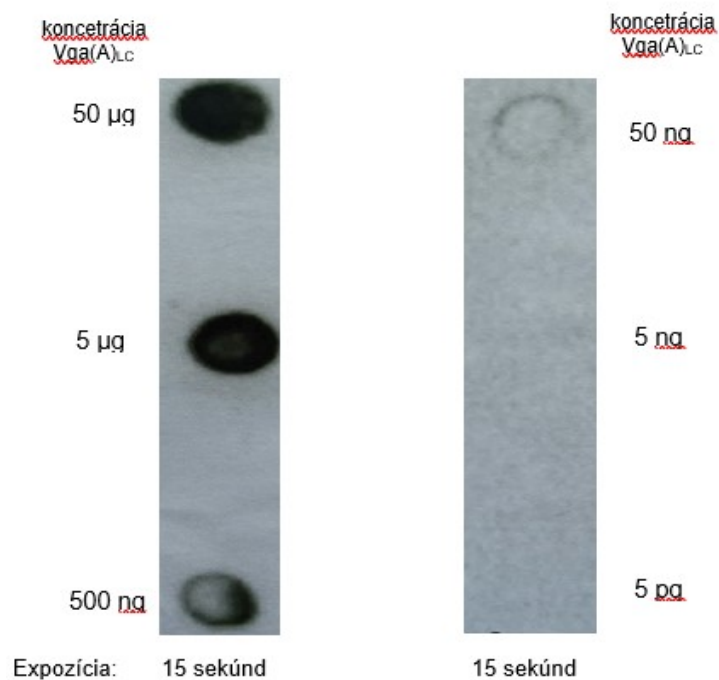


Obrázok 34. – Odsolenie rekombinantného proteínu Vga(A)_{LC}-6HIS odsolovacím pufrom. 1.frakcia č.1 (V=0,5 ml), 2.frakcia č.2 (V=0,5 ml), 3. frakcia č.3 (V=0,5 ml), 4.štandard molekulovej hmotnosti, 5.frakcia č.4 (V=1 ml), 6.frakcia č. 5 (V=0,5 ml), 7.frakcia č. 6 (V=0,5 ml)

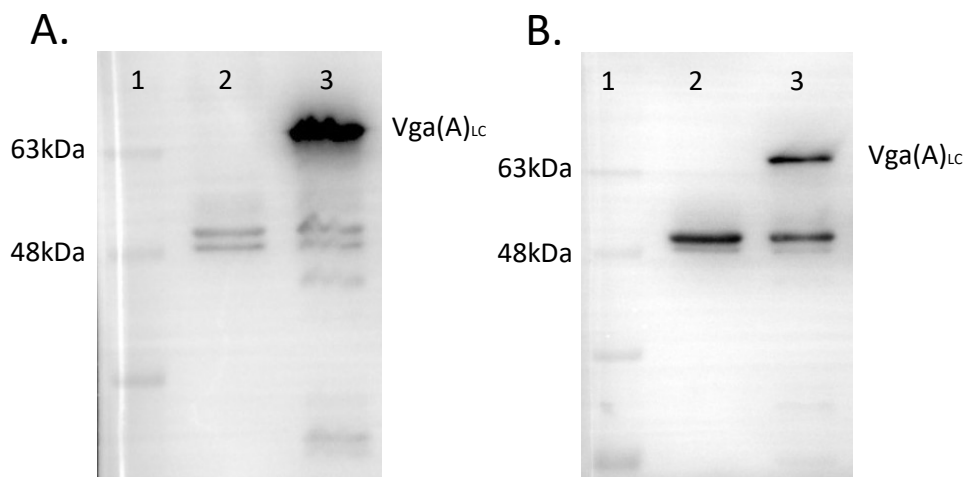
Po odsolení bola vzorka zakoncentrovaná pomocou Amicon – Ultra 4 centrifugačného filtra. Po zakoncentrovaní bola stanovená koncentrácia Vga(A)_{LC} pomocou mikroobjemového UV-VIS spektrofotometra na základe extinkčného koeficientu proteínu Vga(A)_{LC} (38975) a molekulovej hmotnosti proteínu Vga(A)_{LC} (60991 kDa). Výsledná koncentrácia po purifikácii bola 0,997 mg/ml. Proteín bol následne zamrazený v tekutom dusíku a skladovaný pri teplote -80°C.

5.3.1.3. Testovanie polyklonálnej anti-Vga(A) protilátky

Imunizácia séra bola zaistená firmou BioGenes GmbH, ktorej sme pre imunizáciu králičieho séra poskytli vypurifikovaný proteín Vga(A)_{LC}-6His. Po imunizácii sme získali séra dvoch králikov. Z antiséra imunizovaných králikov anti-Vga(A)_{LC}2 a anti-Vga(A)_{LC}3, u ktorého sme najprv stanovili optimálne riedenie pomocí Dot Blot analýzy proti vyčistenému VgaA_{LC}-6His (obr. 35) (kap. 4.2.9.). V experimente bol proteín riedený 10^{-1} až 10^{-6} . Následne bola testovaná špecificita voči *S. aureus* RN4220 exprimujúceho Vga(A)_{LC} proteín a prázdny vektor (obr. 36). Postup prípravy imunochemickej analýzy pomocou Dot Blotu a Western Blotu je uvedený v kapitole (4.2.9.). Následne sme ako vhodnejšiu protilátku na nasledujúce experimenty rozhodli použiť protilátku s označením 2.



Obrázok 35. – Testovanie citlivosti protilátky anti- $Vga(A)_{LC-2}$ s použitím purifikovaného proteínu $Vga(A)_{LC}$ pomocou metódy Dot Blot.



Obrázok 36. – Porovnanie antiséra obsahujúceho špecifické anti- $Vga(A)_{LC}$ protilátky.

- A. Protilátka s koncovým označením anti- $Vga(A)_{LC2}$ – 1. molekulový štandard, 2. pRMC2, 3. $Vga(A)_{LC}$
- B. Protilátka s koncovým označením anti- $Vga(A)_{LC3}$ – 1. molekulový štandard, 2. pRMC2, 3. $Vga(A)_{LC}$

5.3.2. Príprava VgaA_{LC} mutanty neschopnej hydrolýzy ATP a jej vplyv na rast

Vga(A)_{LC} obsahuje dve nukleotid väzobné domény, ktoré sú zodpovedné za väzbu a následnú hydrolýzu ATP. Zámenou glutamátu za glutamín v konzervovaných motívoch DEPT v oboch NBD doménach (E105Q a E410Q) je možné vytvoriť mutantu neschopnú hydrolýzy ATP. Vychádzame z poznatku o EttA mutante neschopnej hydrolýzy ATP (Boel et al., 2014). Táto mutanta sa pevne viaže na ribozóm a inhibuje transláciu, čo sa výsledne prejaví inhibíciou rastu. Z dôvodu očakávanej inhibícií rastu bolo nutné Vga(A)_{LC}EQ1+2 naklonovať do vektora s inducibilným promotórom.

Ako prvé boli do génu zavedené mutácie meniace aminokyselinovú sekvenciu v pozícii 105 a 410 z kyseliny glutámovej na glutamát pomocou špecifických mutačných primerov vga_E105Q f a vga_E105Q r vga_E410Q f a vga_E410Q r (kap. 4.2.3.). Prítomnosť mutácie E105,410Q bola overovaná sekvenáciou pomocou primerov pRB374 f, pRB374 r a vgaK2 f. Aby sme mohli sledovať vplyv vytvorených mutácií, bolo potrebné preklonovať tieto gény do vektora pRMC2, ktorý obsahuje inducibilný promótor.

Gén *vga(A)_{LC}* bol amplifikovaný pomocou špecifických primerov EBBg_vgaLC f a vga_ecoRI r, ktoré obsahovali na svojich koncoch EcoRI restričné miesto (kap. 4.2.7). Prečistený a restričnou endonukleázou opracovaný PCR produkt bol vložený do pRMC2, ktorý bol linearizovaný rovnakým enzýmom a následne defosforylovaný pre zabránenie znovuspojenia prázdneho vektoru behom ligácie (kap. 4.1.10; 4.2.4; 4.2.5. a 4.2.6.). Konštrukt bol overený sekvenáciou pomocou primerov pRMC2 f a pRMC2 r.

Mutované časti génu boli do pRMC2 vložené pomocou restričných endonukláz BsaBI a EcoRI štiepiacich vo vnútri *vga(A)_{LC}* génu (kap. 4.2.4). Výsledný konštrukt pRMC2::*vga(A)_{LC}EQ1+2* bol overený sekvenáciou a natransformovaný do kmeňa *E. coli* IMO8B, ktorý je geneticky upravený tak, aby produkoval DNA s rovnakým metylačným paternom ako hostiteľský kmeň *S. aureus* JE2. Vyizolovaný plazmid (kap. 4.1.10.) bol elektroporovaný do *S. aureus* JE2 (kap. 4.2.2.). Konštrukt pRMC2::*vga(A)_{LC}EQ1+2* bol overený sekvenáciou pomocou primerov pRMC2 f a pRMC2 r. Následne u týchto kmeňov obsahujúce jednotlivé plazmidy bola stanovená minimálna inhibičná koncentrácia na linkomycín a erytromycín v tab. 20. Podľa očakávania, nemutovaný kmeň udeľoval po indukcii anhydratetracyklínom (50ng/ml) rezistenciu k linkomycínu, zatiaľ čo mutovaná varianta Vga(A)_{LC}-EQ1+2 stratila schopnosť

udeľovať rezistenciu k linkomycínu. Narozdiel od EttA-EQ1+2 mutanty, *Vga(A)_{LC}*-EQ1+2 mutanta neinhibovala rast.

Tabuľka 20. - Stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií na linkomycín (LIN) a erytromycín (ERY) u *Vga(A)_{LC}* a jeho ATP-ázy deficientnej mutanty v prítomnosti/absencii induktora (anhydratetracyklín 50 ng/ml).

	LIN (mg/l)		ERY (mg/l)
	aTET=50 ng/ml	aTET=0 ng/ml	aTET=50 ng/ml
pRMC2:: <i>Vga(A)_{LC}</i>	32	0,5	0,125-0,25
pRMC2:: <i>Vga(A)_{LC}</i> EQ1+2	0,25	0,5	0,25
pRMC2	0,5	0,5	0,25

5.3.3. Interakcie Vga(A)_{LC} s bakteriálnym ribozómom *in vivo*

Pre bližšiu charakterizáciu interakcie Vga(A) s ribozómami sme použili profilovanie poly-ribozómov v sacharózovom gradiente, alebo kopurifikáciu Vga(A) s ribozómami pomocou monolitovej aniónovej chromatografie. V oboch prípadoch bol Vga(A) detegovaný v ribozómálnych frakciách Western Blotom a následnou imunodetekciou špecifickou polyklonálnou protilátkou (kap. 5.3.1.). Prítomnosť malej podjednotky bakteriálneho ribozómu bola overená protilátkou proti S7 proteínu.

Porovnávali sme intenzitu signálu Vga(A) v jednotlivých ribozómálnych frakciách pri rôznych podmienkach (prítomnosť antibiotika, WT vs. EQ mutanta). Ako kontrolu prítomnosti ribozómov v jednotlivých frakciách sme použili protilátku proti S7 proteínu malej ribozómálnej podjednotky.

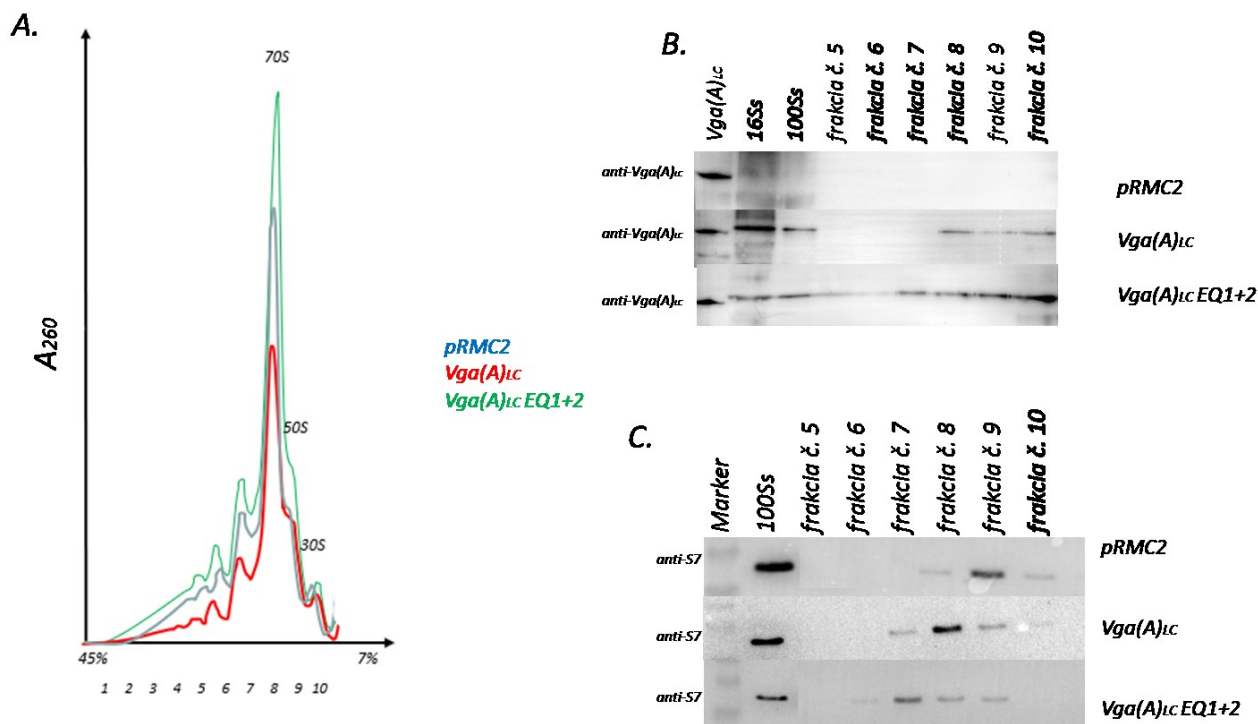
V prvom prípade, sme použili kmene *S. aureus* RN4220 exprimujúci *vga(A)_{LC}* a mutantu neschopnú hydrolýzy ATP Vga(A)_{LC}_EQ1+2. Expresia *vga(A)* bola indukovaná induktorom anhydratetracyklínom (100 ng/ml) od začiatku kultivácie. Ako negatívna kontrola bol použitý prázdny plazmid pRMC2. V druhej časti experimentu sme výsledky overili použitím izolátu epidemického klonu MRSA USA300_FRP3757 s odliečeným plazmidom (JE2). Tento kmeň je súčasťou transpozónovej knižnice, ktorá obsahuje približne 2000 mutant vytvorených inzerciou transpozónu v neesenciálnych génoch (Bae et al., 2007).

5.3.3.1. Profilovanie ribozómov v sacharózovom gradiente a western blot analýza

V prvej časti experimentu sme sledovali vplyv väzby WT Vga(A) proteínu a jeho EQ mutanty v prítomnosti linkomycínu. Použili sme bakteriálny kmeň *S. aureus* RN4220 exprimujúci Vga(A)_{LC} proteín v prítomnosti linkomycínu o výslednej koncentrácii 4 µg/ml a kmeň exprimujúci mutantu neschopnú hydrolýzy ATP Vga(A)_{LC}_EQ v prítomnosti 0,125 µg/ml linkomycínu. Ako negatívna kontrola bol použitý kmeň obsahujúci prázdny plazmid pRMC2 v prítomnosti 0,125 µg/ml linkomycínu. Rovnaká koncentrácia linkomycínu ako pri kultivácii bola použitá vo všetkých pufroch použitých pri ribozómálnom profilovaní. Bakteriálny lyzát (kap. 4.2.15.4.) bol opatrne navrstvený na sacharózový gradient (7%-45%) a následne bol ultracentrifugovaný (kap. 4.2.15.6.). Sacharózový gradient v rozmedzí 7%-45% umožnil detekciu di-, tri-, tetra-, penta- a hexazómov avšak nedošlo k dostatočnému odseparovaniu 70S ribozómov a 50S, a 30S podjednotiek (obr. 37A a 38A). Následná WB

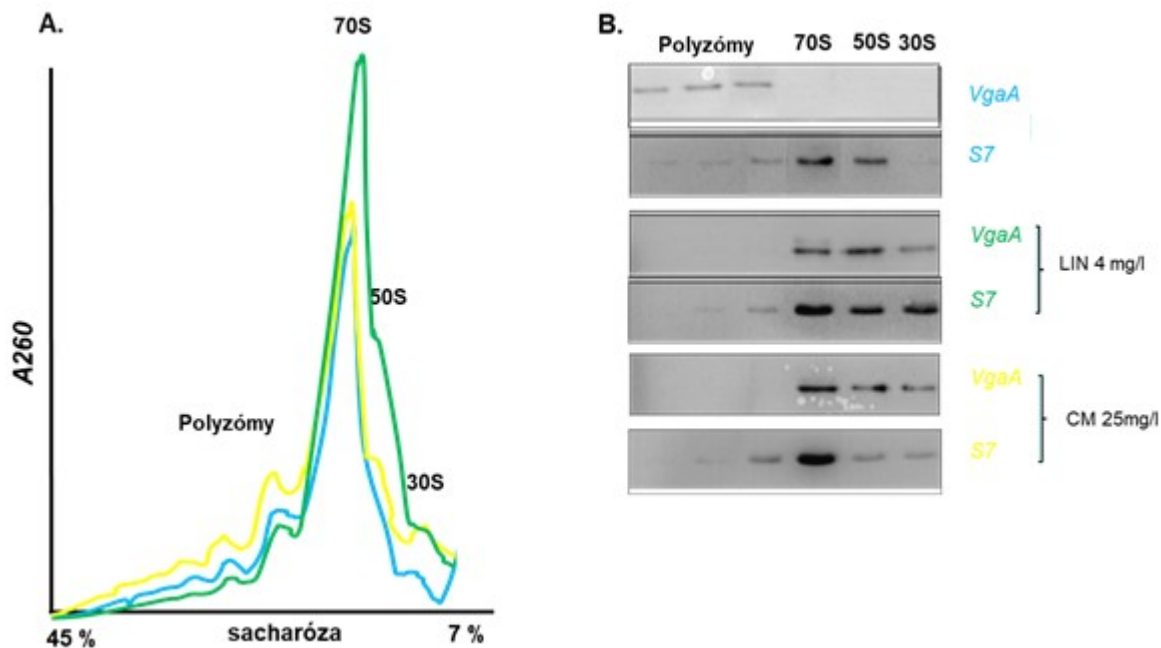
analýza ukázala prítomnosť Vga(A)_{LC} vo frakciách odpovedajúcich 30S, 50S a 70S podjednotkám, zatiaľ čo Vga(A)_{LC_EQ} bolo možné detegovať aj vo frakciách s polyzómami. To odpovedá tomu, že Vga(A)_{LC_EQ} mutanta, uzamknutá v konformácii s naviazaným ATP má pravdepodobne vyššiu afinitu k ribozómu než nemutovaný Vga(A)_{LC}. Z obrázku 37B, C vyplýva, že WT Vga(A) proteínu interaguje s ribozómom v prítomnosti antibiotika.

Keďže sme zistili, že interakciu Vga(A) s ribozómom môžeme preukázať aj u WT, zamerali sme sa aj na druhé antibiotikum, a to chloramfenikol, ktorý sa viaže rovnako do PTC a zároveň u pRMC2 slúži ako selekčný marker. U linkomycínu bola zvolená koncentrácia 4 µg/ml u chloramfenokolu 25 µg/ml. Celý postup analýzy je identický ako pri testovaní nemutovaného Vga(A)_{LC}. Je zaujímavé, že nebolo dôležité, či sa jedná o linkomycín alebo chloramfenikol (obr. 38), ku ktorému Vga(A)_{LC} neudeľuje rezistenciu (Jacquet et al., 2008). Z toho vyplýva, že nemutovaný Vga(A)_{LC} proteín má pravdepodobne väčšiu afinitu k antibiotikám zodpovedným za zastavenie ribozómov.



Obrázok 37. – Ribozómalny profil v sacharózovom gradiente (7%-45%) v prítomnosti linkomycínu a imunodetekcia Vga(A)_{LC} a S7 ribozomálneho proteínu

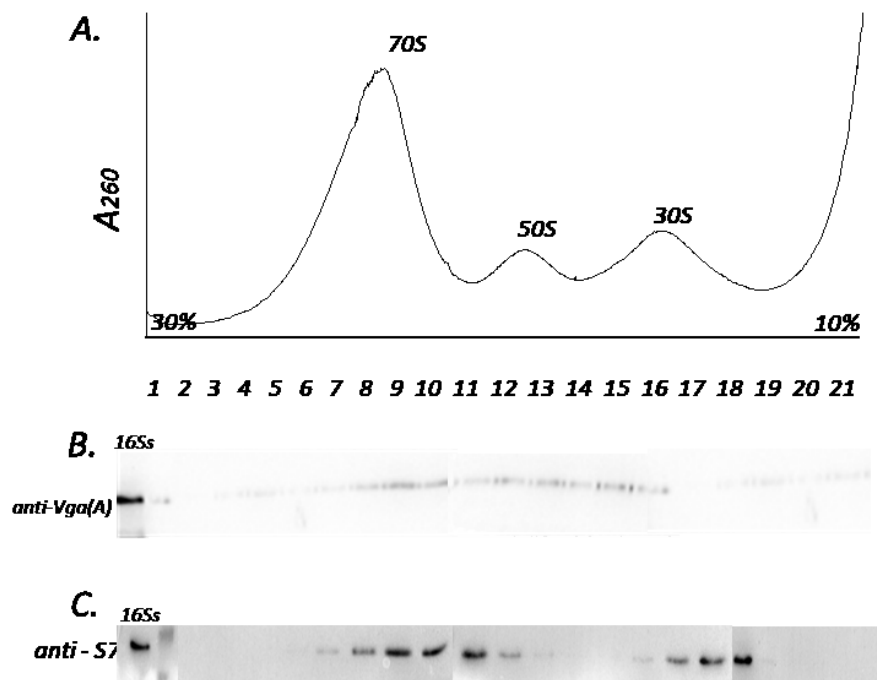
- Ribozómalny profil v sacharózovom gradiente v koncentračnom rozmedzí 7% - 45% bakteriálneho lyzátu kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 exprimujúceho prázdny plazmid pRMC2 (LIN=0,125 mg/l, ozn. modre), Vga(A)_{LC} (LIN=4 mg/l, ozn. červene) a Vga(A)_{LC}-EQ1+2 (LIN=0,125 mg/l, ozn. zelene).
- Imunodetekcia Vga(A)_{LC} proteínu na PVDF membráne pomocou špecifickej anti-Vga(A)_{LC} protilátky. Ako kontrola bol použitý vypurifikovaný Vga(A)_{LC} proteín, 16S supernatant a 100S sediment. Frakcie č. 5-11 zodpovedajú ribozomálnému profilu v obrázku A.
- Imunodetekcia S7 ribozomálneho proteínu na PVDF membráne pomocou špecifickej anti-S7 protilátky. Ako kontrola bol použitý 100S sediment. Frakcie č. 5-11 zodpovedajú ribozomálnému profilu v obrázku A.



Obrázok 38. – Ribozómalny profil v sacharózovom gradiente (7%-45%) v prítomnosti linkomycínu, alebo chloramfenikolu a imunodetekcia Vga(A)_{LC} a S7 ribozómalného proteínu

- A. Ribozómalny profil v sacharózovom gradiente v koncentračnom rozmedzí 7% - 45% bakteriálneho lyzátu kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 exprimujúceho Vga(A) bez prítomnosti linkomycínu (modré označenie), Vga(A) v prítomnosti linkomycínu 4 mg/l (zelené označenie) a Vga(A) v prítomnosti chloramfenikolu (25 mg/l) (žlté označenie)
- B. Imunodetekcia Vga(A)_{LC} proteínu na PVDF membráne pomocou špecifickej anti- protilátky. Vga(A)_{LC} protilátky a S7 ribozómalného proteínu pomocou anti-S7. Jednotlivé frakcie zodpovedajú frakciám na obrázku A.

Pretože použitím gradientu 7% - 45% sacharózy nebolo možné rozlíšiť 70S, 50S a 30S frakcie, rozhodli sme sa použiť v ďalšom experimente sacharózový gradient v rozmedzí 10% - 30%, vďaka ktorému boli jednotlivé frakcie dobre separované (obr. 39A). V tomto prípade sme analyzovali kmeň *S. aureus* JE2 s nemutovaným Vga(A)_{LC}, v prítomnosti linkomycínu (4 mg/l). WB analýza ukázala, že Vga(A) interaguje so 70S a 50S ribozómami avšak nie s 30S podjednotkou, čo odpovedá tomu, že Vga(A) v štruktúre s ribozómom interaguje hlavne s 23S rRNA veľkej ribozómálnej podjednotky (obr. 39B,C).



Obrázok 39. – Ribozómalný profil v sacharózovom gradiente (10%-30%) a imunodetekcia WT Vga(A)_{LC} a S7 ribozomálneho proteínu

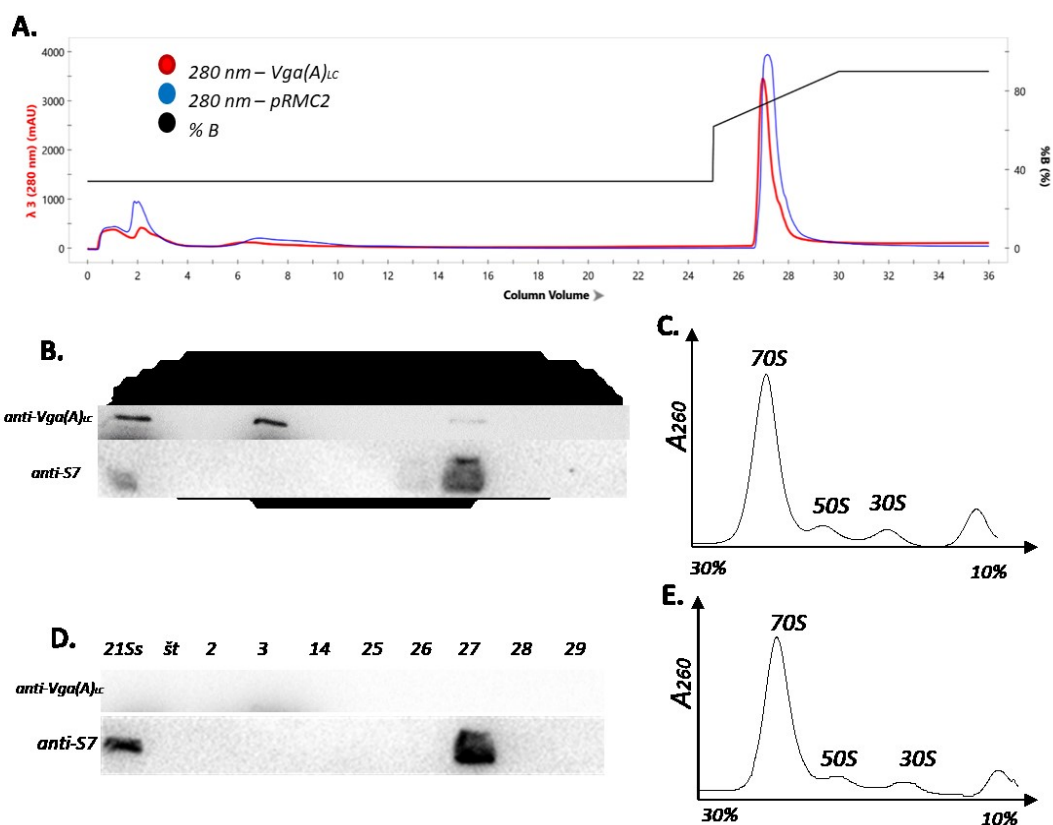
- Ribozómalný profil v sacharózovom gradiente v koncentračnom rozpätí 10% - 30% bakteriálneho lyzátu kmeňa *Staphylococcus aureus* JE2 exprimujúceho Vga(A)_{LC}
- Imunodetekcia Vga(A)_{LC} proteínu pomocou špecifickej anti-Vga(A)_{LC} protilátky. Ako kontrola bol použitý 16S supernatant. Jednotlivé signály zodpovedajú ribozomálnemu profilu v obrázku A.
- Imunodetekcia S7 ribozomálnej podjednotky pomocou špecifickej anti-S7 protilátky. Ako kontrola bol použitý 16S supernatant. Jednotlivé signály zodpovedajú ribozomálnemu profilu v obrázku A.

5.3.3.2. Kopurifikácia Vga(A)_{LC} proteínu a bakteriálnych ribozómov a ich imunodetekcia

Pre analýzu interakcie ABC-F proteínov sme sa v nasledujúcich experimentoch rozhodli použiť alternatívnu metódu, ktorá je rýchla a pomerne jednoduchá. Hlavný princíp spočíva v chromatografickom delení veľkých biomolekúl za použitia vysokých prietokov pufrov cez póry matrice. Navyše touto metódou sme dokázali analyzovať väčšie množstvo pripravených kmeňov a taktiež sme sa pokúsili zachytiť aj interakcie iných ABC-F proteínov, napr. Lmr(C). Kmeň exprimujúci *vga(A)* bol použitý na optimalizáciu metódy.

V tomto experimente boli používané bakteriálne kmene *S. aureus* JE2 exprimujúci *vga(A)_{LC}* v prítomnosti linkomycínu (4 mg/l) a kontrolný kmeň *S. aureus* JE2 obsahujúci pRMC2 plazmid. Kopurifikácia proteínu nášho záujmu spolu s bakteriálnymi ribozómami prebiehala pomocou monolitovej kolóny CIMmultus™ QA-1 Advanced Composite Column o objeme 1 ml (BIA separations). Táto kolóna využíva princíp ionexovej chromatografie, kedy k purifikácii proteínu a ribozómov dochádza pri vysokej molárnej koncentrácii NH₄Cl. Zároveň pomocou tejto matrice môžeme separovať veľké komplexy ako sú ribozómy, alebo vírusové častice. Keďže sa jedná o kolónu, ktorá pracuje pod vysokým tlakom, bol použitý NGS chromatografický systém (BioRad). *Vga(A)_{LC}* bol detegovaný vo frakcii obsahujúcej ribozómy pomocou WB analýzy (kap. 4.2.9.). Bakteriálna kultúra bola pripravená podľa kapitoly 4.2.15.1. V prvých experimentoch sme používali veľké objemy bakteriálneho lyzátu pripraveného z 500 ml bakteriálnej kultúry (kap. 4.2.15.3.). Následnou optimalizáciou metódy sme prešli na menšie objemy bakteriálneho lyzátu, ktorý bol pripravený podľa kapitoly 4.2.15.4. Celý proces samotnej kopurifikácie je uvedený v kapitole 4.2.15.7. Frakcia bohatá na ribozómy (frakcia č. 27) znázornená na obrázku 40B,D bola následne nanesená na sacharózový gradient v koncentračnom rozmedzí 10% - 30% a ultracentrifugovaná (kap. 4.2.15.6.). Na základe separácie pomocou sacharózového gradientu sme detegovali 70S ribozómy a v malej miere aj 50S a 30S podjednotky (obr. 40C,E). Najväčšie zastúpenie je u 70S ribozómov čo zodpovedá pravdepodobnému zastúpeniu v bakteriálnej bunke v čase ukončenia kultivácie. Porovnaním sacharózových gradientov s predchádzajúcou kapitolou neboli zistené rozdiely. Práve túto metódu sme použili na sledovanie interakcie ďalších variant *Vga(A)* v klinických izolátoch *S. haemolyticus* a taktiež u *Lmr(C)* zo *Streptomyces lincolnensis*, ktorý je súčasťou biosyntetického genového zhluku pre linkomycín.

Pretože kopurifikácia ABC-F proteínov s ribozómami na monolitovej kolóne na rozdiel od centrifugácie neposkytuje toľko informácií. Nie je možné zistiť s akým typom ribozómu proteíny interagujú, avšak dokáže zachytiť aj menej stabilné interakcie. Na druhej strane je možné purifikovaný ribozómálny komplex použiť napr. na kryoelektronovú mikroskopiu.

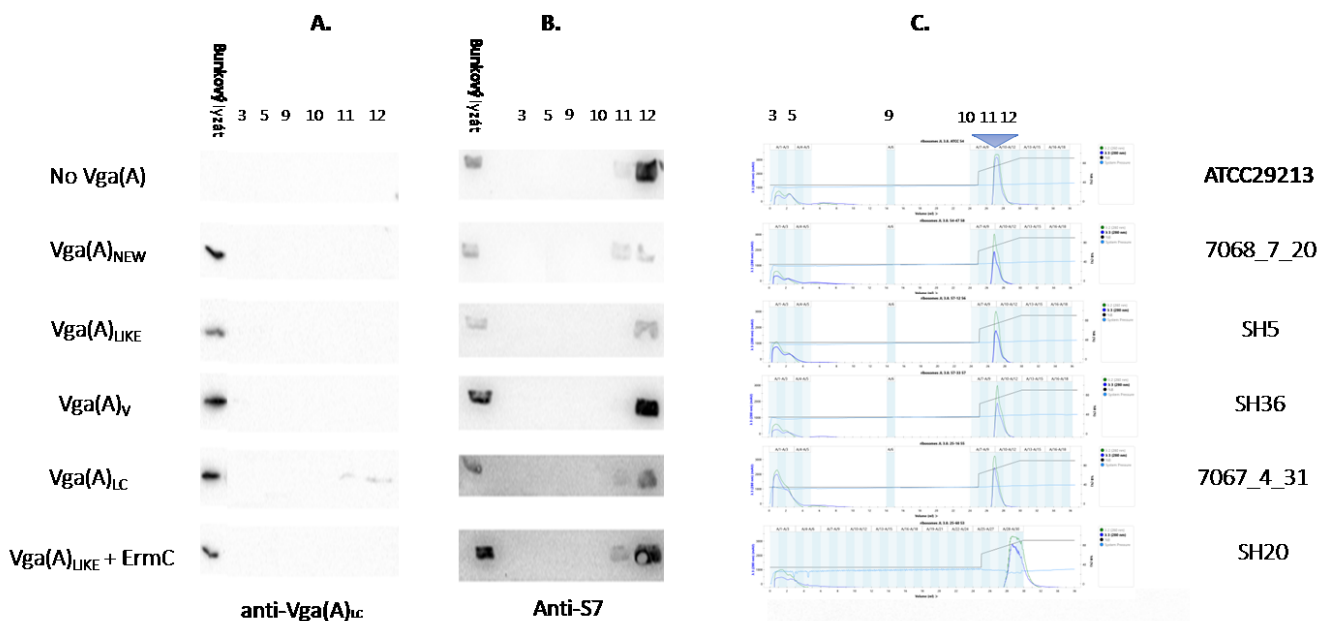


Obrázok 40. – Kopurifikácia bakteriálnych ribozómov kmeňa *S. haemolyticus* a Vga(A)_{LC} proteínu

- Chromatografický záznam kopurifikácie Vga(A)_{LC} proteínu s ribozómami (označený červene) a pRMC2 ako negatívnej kontroly (označený modre) s ribozómami
- Imunodetekcia Vga(A)_{LC} v kmeni *S. aureus* JE2 exprimujúceho Vga(A)_{LC} proteín na PVDF membráne pomocou anti-Vga(A)_{LC} protilátky a imunodetekcia S7 ribozomálnej podjednotky na PVDF membráne pomocou anti-S7 protilátky
- Ribozómálny profil kmeňa *S. aureus* JE2 exprimujúceho Vga(A)_{LC} v sacharózovom gradiente v koncentračnom rozmedzí 10%-30%
- Imunodetekcia Vga(A)_{LC} v kmeni *S. aureus* JE2 exprimujúceho prázdny plazmid pRMC2 ako negatívnu kontrolu na PVDF membráne pomocou anti-Vga(A)_{LC} protilátky a imunodetekcia malej ribozomálnej podjednotky na PVDF membráne
- Ribozómálny profil kmeňa *S. aureus* JE2 exprimujúceho prázdny plazmid pRMC2 v sacharózovom gradiente v koncentračnom rozmedzí 10%-30%

5.3.3.2.1. Kopurifikácia rôznych variant Vga(A) proteínu a bakteriálnych ribozómov a ich imunodetekcia

Na základe štúdie mechanizmu indukcie expresie *vga(A)* variant prirodzene sa vyskytujúcich v klinických izolátoch *S. haemolyticus* sme sledovali mieru expresie v prítomnosti linkomycínu a klindamycínu ako induktora (Vimberg et al., 2020). Cieľom tohto experimentu bolo zistiť či sú rôzne *vga(A)* varianty, vyznačujúce sa rôznou schopnosťou udeľovať rezistenciu k linkozamidom, rovnocenné v schopnosti vytvorenia stabilného komplexu s ribozómom. Predpokladáme, že ak sa nám podarilo kopurifikovať $Vga(A)_{LC}$ spolu s bakteriálnym ribozómom, tak by sme mali byť schopný kopurifikácie aj iných variant. V tomto experimente sme porovnali kopurifikáciu rôznych variant *Vga(A)* proteínov u kmeňov *S. haemolyticus* (Vimberg et al., 2020), kedy ako kontrolu sme použili kmeň *Staphylococcus haemolyticus* 7068_7_20 kodujúci $vga(A)_{LC}$. Ako negatívna kontrola bol použitý referenčný kmeň *S. aureus* ATCC29213. Podmienky kultivácie a postup pri príprave lyzátu je uvedený v kapitole. 4.2.15.



Obrázok 41. – Porovnanie kopurifikácie u izolátoch *S. haemolyticus* exprimujúcich rôzne varianty *Vga(A)*

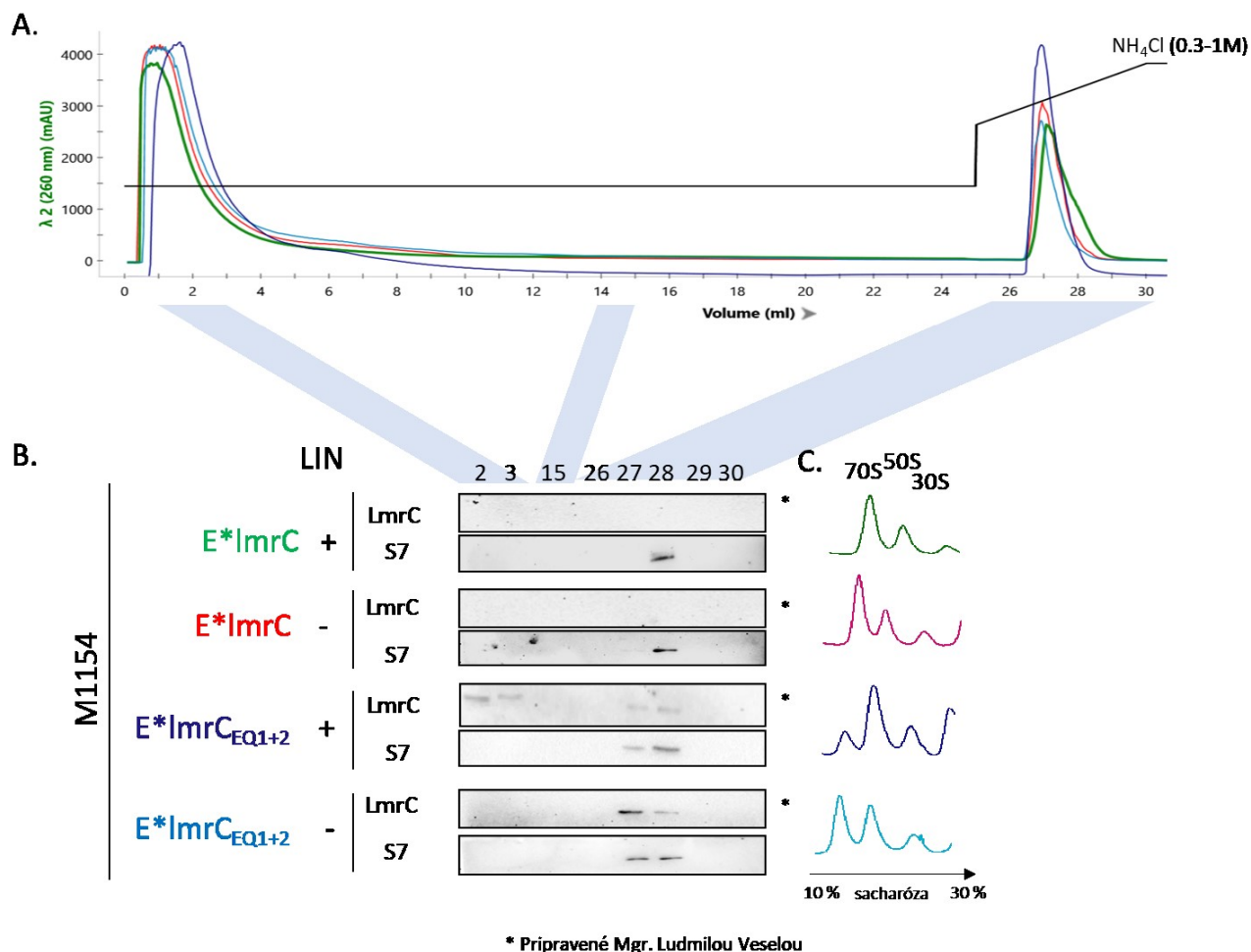
- A. imunohistochemická detekcia Vga(A) variant anti-VGa(A)_{LC}
- B. imunohistochemická detekcia S7 proteínu anti-S7
- C. chromatografický záznam kopurifikácie jednotlivých kmeňov

Kopurifikačná analýza Vga(A) variant ukazuje, že jedine Vga(A)_{LC} je možné detegovať na ribozóme. Sila signálu špecifického pre Vga(A)_{LC} v lyzáte ukazuje, že všetky varianty boli exprimované v rovnakej miere (obr. 41A), avšak napriek tomu bol v ribozomálnej frakcii detegovaný iba Vga(A)_{LC}. Na základe týchto zistení dochádzame k záveru, že okrem predĺženej špičky linkeru, ktorý je zodpovedný za substrátovú špecificitu, sa Vga(A)_{LC} líši od ostatných variant v aminokyselínovej sekvencii linkeru (Vimberg et al., 2020). Predpokladáme, že práve táto časť linkeru môže zohrávať významnú rolu v celkovej afinite a stabilite proteínu k bakteriálnemu ribozómu.

5.3.3.2.2. Kopurifikácia Lmr(C) proteínu s bakteriálnymi ribozómami a ich imunodetekcia

V BGC (biosyntetický génový klaster) pre syntézu linkomycínu u *Streptomyces lincolnensis* sa vyskytujú tri rezistenčné proteíny. Jedným z nich je ABC-F proteín, Lmr(C), ktorý je najlepšie charakterizovaný (Koberska et al., 2021). Bolo ukázané, že tento proteín vykazuje LS_AP rezistenčný fenotyp, ale udeľuje len nízku rezistenciu. Čo sa týka ochrany producenta pred toxicitou linkomycínu, je Lmr(C) postradateľný, z toho dôvodu, že za rezistenciu sú zodpovedné zvyšné dva rezistenčné proteíny z BGC -Lmr(A) -MFS transportér a Lmr(B) – monometyl transferáza. Naopak Lmr(C) zohráva rolu v regulácii začiatkovej fázy produkcie linkomycínu, cez ovplyvnenie LmbU (Koberska et al., 2021). Vieme, že regulácia expresie *lmr(C)* je riadená mechanizmom atenuácie transkripcie, podobne ako u *vga(A)_{LC}* (Koberska et al., 2021; Vimberg et al., 2020). Predpokladali sme, že pre lepšie pochopenie jeho funkcie, nám bude nápomocná jeho kopurifikácia. Spolu s Mgr. Ludmilou Veselou, sme demonštrovali experiment, u ktorého sme kopurifikovali Lmr(C) spolu s bakteriálnymi ribozómami. Mgr. Veselá pripravila všetky bakteriálne kmene na analýzu. Príprava lyzátu prebiehala za identických podmienok ako sú popísané v kapitole 4.2.15.7. s tým rozdielom, že výsledné pH roztokov bolo upravené na hodnotu 8. Kmeň *S. coelicolor* exprimujúci *lmr(C)* a jeho mutantu neschopnú hydrolýzy ATP *lmr(C)_{EQ1+2}* sme kultivovali za dvoch rôznych podmienok, s linkomycínom 0,25 µg/ml a bez linkomycínu. Expresia oboch génov *lmr(C)* a *lmr(C)_{EQ1+2}* bola riadená pomocou inducibilného riboswitch indukovaného pomocou 6mM teofilínu. V prípade, že bol kmeň kultivovaný v prítomnosti linkomycínu, všetky pufry, ktoré boli použité pri jeho analýze, obsahovali rovnakú koncentráciu linkomycínu.

Je nutné konštatovať, že interakciu s ribozómom sme testovali v heterolognom hostiteli *S. coelicolor* M1154, ktorý je citlivý k linkozamidom. V *S. lincolnensis*, kde je *Imr(C)* súčasťou BCG pre linkomycín, je prítomný taktiež rezistenčný gén *Imr(B)*, ktorý je zodpovedný za metyláciu ribozómov (homológ s *erm*). Ako je viditeľné z obrázku 42B, len *Lmr(C)*_EQ bol detegovaný v ribozómalných frakciách a to nezávisle na prítomnosti linkomycínu. WT *Lmr(C)* nebol s ribozómami kopurifikovaný. To sa líši od *Vga(A)*_{LC}, u ktorého sme detegovali interakciu aj s nemutovaným proteínom. U nemutovaného *Lmr(C)* nedošlo k imunodetekcii ani v prípade, že bakteriálny kmeň bol inkubovaný v prítomnosti linkomycínu. Následným ribozómalným profilovaním sme vo frakcii č. 27,28 (obr. 42A) detegovali 70S ribozómy a ich 50S a 30S podjednotky (obr. 42C). Imunodetekciu *Lmr(C)* demonštrovala Mgr. Ludmila Veselá.



Obrázok 42. – Porovnanie kopurifikácie u kmeňoch *S. coelicolor* exprimujúcich rôzne varianty Lmr(C) v prítomnosti/absencii linkomycínu.

- chromatografický záznam kopurifikácie jednotlivých kmeňov
- imunohistochemická detekcia Lmr(C) pomocou anti-Lmr(C) a S7 proteínu anti-S7
- záznam ribozómalného profilovania, zobrazujúceho 70S bakteriálne ribozómy a ich 50S a 30S podjednotky

5.4. Štúdium interakcie rezistenčných mechanizmov pôsobiacích na ribozóm

Mechanizmus rezistencie ochranou ribozómu, ktorá je udeľovaný ABC-F proteínmi spočíva vo fyzickom odstránení antibiotika z ribozómu. Naopak rezistencia kódovaná génmi *erm* spočíva v dimetylácii adenínu v pozícii 2085 v 23S rRNA. Zaujímalo nás, ako ovplyvní fitness baktérií prítomnosť týchto dvoch rezistenčných mechanizmov pôsobiacích na ribozóme. Konkrétne sme testovali vplyv ARE ABC-F proteínov Msr(A) a Vga(A)_{LC} spolu s Erm(C), alebo Erm(B). Hlavne kombinácia génov *erm(C)* a *msr(A)* sa často vyskytuje u klinických izolátov koaguláza-negatívnych stafylokokov (G. Novotna et al., 2005).

Pre štúdium interakcie rezistencie udeľovanej ABC-F proteínmi a Erm metyltransferázy sme použili jednak klinické izoláty kmeňa *S. haemolyticus* s charakterizovaným rezistenčným genotypom (G. Novotna et al., 2005), alebo *S. aureus* JE2 s vloženým transpozómom s génom *erm(B)* a konjugovanými plazmidmi nesúcimi *vga(A)_{LC}*, alebo *msr(A)*.

U kmeňov sme porovnávali úroveň rezistencie a rast v komplexnom médiu s prídavkom antibiotík.

5.4.1. Stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií a analýza rastových vlastností

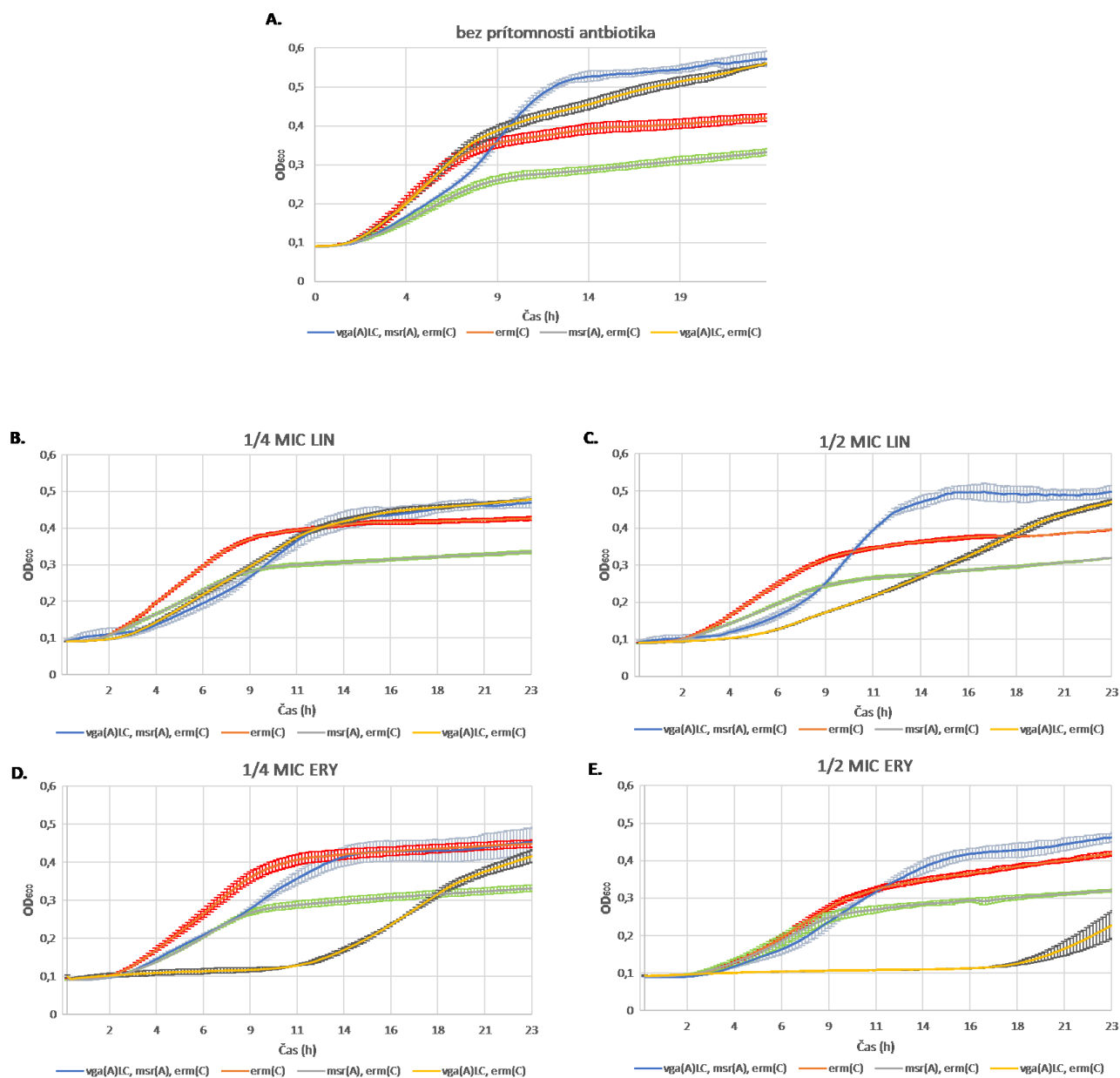
Staphylococcus haemolyticus s rôznymi rezistenčnými mechanizmami

U klinických izolátov *S. haemolyticus* kodujúcich rezistenčné gény samostatne 134PL (*erm(C)*), 1051UL (*msr(A)*), 140OL (*vga(A)_{LC}*), alebo v kombinácii 65OL (*vga(A)_{LC}*, *erm(C)*), 131UL (*msr(A)*, *erm(C)*) a 64BB (*msr(A)*, *vga(A)_{LC}*, *erm(C)*) bola stanovená MIC pre linkomycín a erytromycín pomocou mikrodilučnej metódy (tab. 21) a bol porovnaný rast v komplexnom médiu (obr. 43) Postup prípravy a testovania je popísaný v kapitolách 4.2.10. Kmene kodujúce *erm(C)* samostatne (134PL), alebo v kombinácii s *msr(A)* (131UL a 64BB) udeľujú rezistenciu k linkomycínu a erytromycínu vyššiu než 512 mg/l (tab. 2), čo je v súlade s mechanizmom, ktorý zabraňuje väzbe antibiotika do zásahového miesta nezávisle na jeho koncentrácii. Tieto kmene sa však významne líšili rastom v komplexnom médiu bez antibiotík (obr. 43A) a aj s antibiotikami (obr. 43B-E), kedy najhoršie rastol kmeň 131UL s *erm(C)* a *msr(A)*. Najlepšie rastol kmeň 64BB so všetkými génmi a to nezávisle na prídavku antibiotík. Prekvapivo kmeň 65OL kodujúci kombináciu *erm(C)* s *vga(A)_{LC}* vykázal zníženú hladinu rezistencie pre

erytromycín (64 mg/l) (tab. 21). Zároveň sme u tohto kmeňa pozorovali výrazne zhoršený rast v prítomnosti erytromycínu o koncentrácii odpovedajúcej 0,25 MIC a 0,5 MIC (obr. 43B-E). Bez antibiotík a v prítomnosti 0,25 MIC pre linkomycín tento kmeň rastol podobne ako kmeň 64BB so všetkými tromi génmi. Tieto výsledky naznačujú, že niektoré kombinácie rezistenčných génov môžu mať skutočne negatívny vplyv na bakteriálny fitness. Avšak pre tento experiment boli použité klinické izoláty, rôzneho pôvodu, ktoré sa môžu líšiť v rastových vlastnostiach nezávisle na prítomnosti antibiotík (obr. 43A).

Tabuľka 21. – Minimálne inhibičné koncentrácie linkomycínu a erytromycínu u klinických izolátov kmeňa *Staphylococcus haemolyticus*

<i>S. haemolyticus</i>	genotyp	linkomycín ug/ml	erytromycín ug/ml
64 BB	<i>vga(A)_{LC}, msr(A), erm(C)</i>	1024	1024-2048
65OL	<i>vga(A)_{LC}, erm(C)</i>	512	64
131UL	<i>msr(A), erm(C)</i>	1024	1024-2048
134PL	<i>erm(C)</i>	1024	1024-2048
1050UL	<i>msr(A)</i>	2	64
140UL	<i>vga(A)_{LC}</i>	64	1



Obrázok 43. – Porovnanie rastových vlastností klinických izolátov *S. haemolyticus* s rôznymi kombináciami rezistenčných génov.

Kmeň 131UL s *msr(A)* a *erm(C)* zelene, kmeň 134PL s *erm(C)* červene, kmeň 65OL s *vga(A)_{LC}* a *erm(C)* žlte, kmeň 64BB s *vga(A)_{LC}+msr(A)+erm(C)* modře.

- Sledovanie rastu kmeňov bez prítomnosti antibiotika
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,25 MIC pre linkomycín
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,5 MIC pre linkomycín
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,25 MIC pre erytromycín
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,5 MIC pre erytromycín

5.4.2. Stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií a analýza rastových vlastností

Staphylococcus aureus JE2 s rôznymi rezistečnými mechanizmami

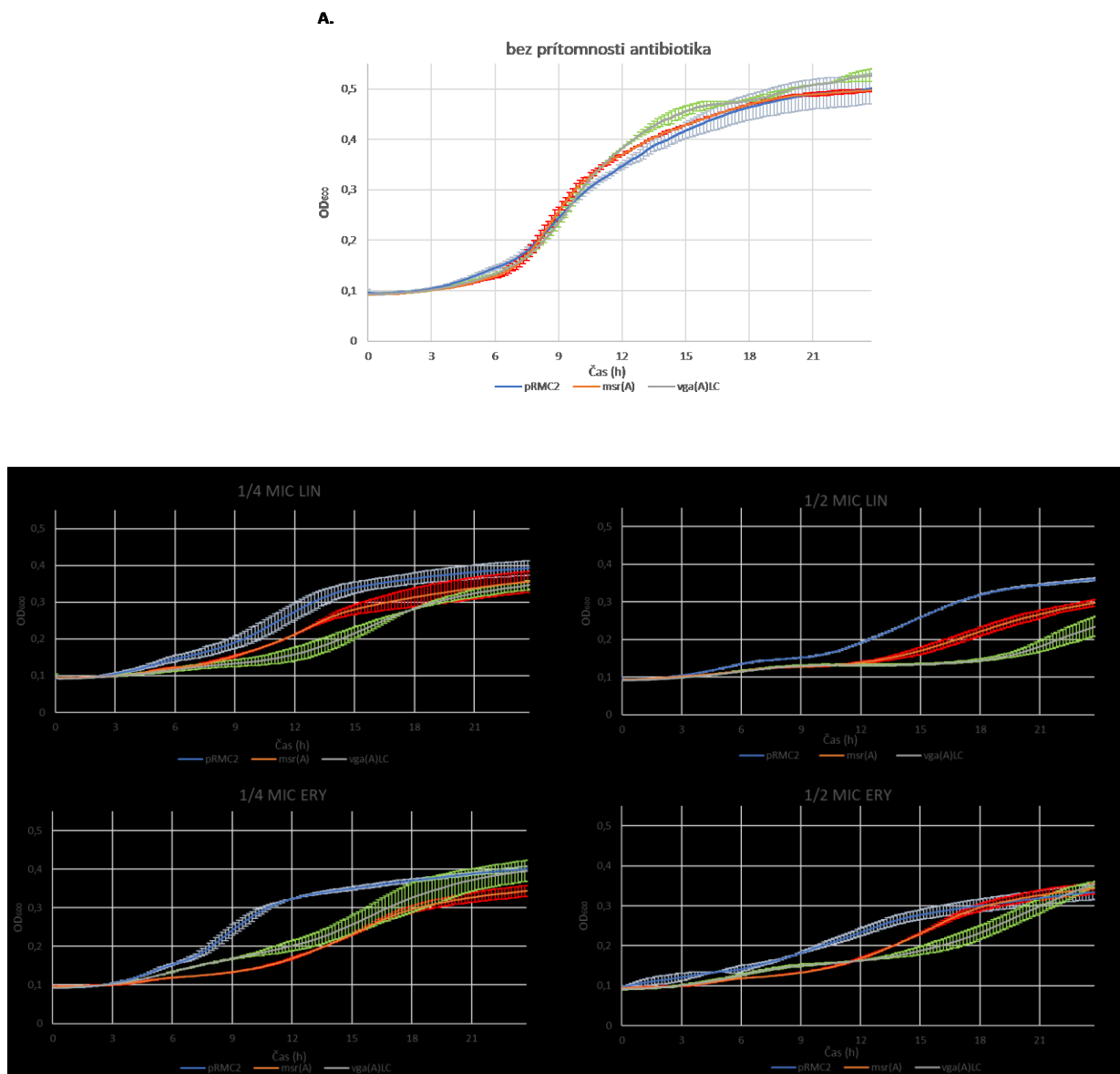
V predchádzajúcej kapitole sme sledovali ko-expresiu *vga(A)_{LC}*, resp. *msr(A)* spolu s *erm(C)* v klinických izolátoch kmeňa *S. haemolyticus*. Všimli sme si, že v prípade kombinácie dvoch rezistenčných mechanizmov *Vga(A)_{LC}* a *Erm(C)*, dochádza k rastovým defektom v bakteriálnych bunkách. Vzhľadom k tomu, že klinické izoláty nedisponujú rovnakým genetickým pozadím, rozhodli sme sa tento experiment demonštrovať u laboratorného kmeňa.

Pre testovanie vplyvu rezistenčných mechanizmov na rast buniek sme využili transpozónovú mutantu kmene *S. aureus* JE2, ktorá nesie transpozón Himar1 s génom *erm(B)* ako selekčným markerom. Pre testovanie sme z knižnice transpozónových mutantov vybrali mutantu NE1858, ktorá nesie transpozón v *stpC* géne, ktorý kóduje ABC transpotér, ktorý nemá vplyv na funkciu ABC-F proteínov (Jeremy I. Ross et al., 1996).

Do kmeňa NE1858 (JE2::*ermB*) sme transformovali prázdny vektor pRMC2 a konštrukty pRMC2::*vgaA_{LC}* a pRMC2::*msrA*. U transformantov obsahujúcich jednotlivé kombinácie vektorov bola stanovená MIC pomocou štandardnej mikrodilúčnej metódy v prítomnosti selekčného markera (chloramfenikol 25mg/l) pre pRMC2. Postup testovania je identický ako v predchádzajúcich kapitolách. Postup prípravy je v kapitole 4.2.10. Výsledky testovania citlivosti k linkomycínu (tab. 22) naznačujú, že prítomnosť *msr(A)* zlepšuje rezistenciu k linkomycínu a k erytromycínu o jedno riedenie, zatiaľ čo hodnoty MIC pre kmeň koexprimujúci *erm(C)* s *vga(A)_{LC}* sú podobné hodnotám pre kmeň s prázdny plazmidom. Nedošlo tak k výraznému zníženiu MIC tak ako bolo zistené pre kmeň 65OL (tab. 21). Všetky tri kmene sa nelíšili v raste bez prídavku antibiotík (obr. 44A), čo odpovedá tomu, že sa jedná o izogénne kmene. Avšak v prítomnosti linkomycínu alebo erytromycínu o koncentráciách odpovedajúcich 0,25 alebo 0,5 MIC pre každý kmeň pozorujeme zhoršenie rastu u kmeňov koexprimujúcich *erm(B)* s *vga(A)_{LC}* alebo *msr(A)* (obr. 44B-E). Tieto dáta naznačujú, že kombinácia rezistencie udeľovanej génmi *erm* s pôsobením ARE ABC-F proteínov môže mať negatívny vplyv na fitness buniek a to aj napriek tomu, že sa MIC pre linkomycín a erytromycín mení len minimálne.

<i>S. aureus</i>	linkomycín ug/ml			erytromycín ug/ml		
	<i>vga(A)_{LC}</i>	pRMC2	<i>msr(A)</i>	<i>vga(A)_{LC}</i>	pRMC2	<i>msr(A)</i>
JE2:: <i>erm(B)</i>	512-1024	1024	2048	256	256-512	1024
JE2	32	1	1	0,25	0,25	32

Tabuľka 22. – Minimálna inhibičná koncentrácia kmeňa *S. aureus* JE2 koexprimujúceho Erm(C) metylázu spolu s jedným rezistenčným proteínom Msr(A), resp. Vga(A)_{LC}. Kmeň USA300 bol použitý ako kontrolný kmeň, bez prítomnosti génu kodujúceho *erm(C)*. Ako induktor bol použitý anhydrotetracyklín (100ng/ml).



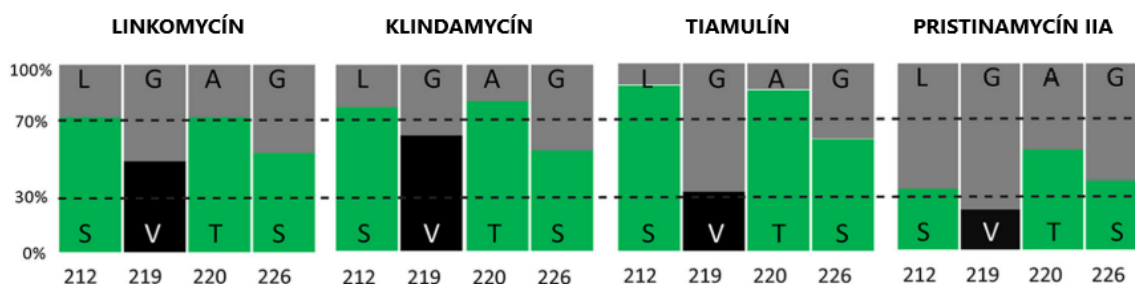
Obrázok 44. – Porovnanie rastových vlastností kmeňov *S. aureus* JE2::*ermC* exprimujúcich *erm(B)* + *vga(A)* (zelené), *erm(B)* + *msr(A)* (červene), alebo s prázdny m vektorom pRMC2 – *erm(B)* (modré)

- Sledovanie rastu kmeňov bez prítomnosti antibiotika
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,25 MIC pre linkomycín
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,5 MIC pre linkomycín
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,25 MIC pre erytromycín
- Zmena rastu kmeňa v prítomnosti 0,5 MIC pre erytromycín

6. Diskusia

Predložená dizertačná práca nadväzuje na poznatky získané v laboratóriu dr. Balíkovej Novotnej, ktoré sa zaoberá štúdiom rezistenčných a regulačných ABC-F proteínov u klinických izolátov a producentov antibiotík.

Modelovým proteínom pre štúdium mechanizmu rezistencie udeľovanej ABC-F proteínmi je proteín Vga(A)_{LC} a jeho varianty, ktoré udeľujú rôznu hladinu rezistencie k linkozamidom, streptogramínom A a pleuromutilínom, antibiotikám viažucich sa do PTC bakteriálneho ribozómu. Aminokyseliny uprostred linkra sú zodpovedné za určenie antibiotickej špecificity Vga(A) proteínov (G. Novotna & Janata, 2006). Cielenou mutagenézou aminokyselín uprostred linkra v pozíciách 212, 219, 220, 226 som určil dôležitosť jednotlivých aminokyselín pre určenie rezistenčného fenotypu. Zistil som, že polárne aminokyseliny serín a treonín v pozíciách 212 a 220 sú dôležité pre vysokú hladinu rezistencie k linkozamidom. Naopak glycín v pozícii 219 je dôležitý pre rezistenciu k streptogramínom A (obr. 45). Pre rezistenciu k pleuromutilínom sú však dôležité ako serín a treonín v pozíciách 212 a 220, tak aj glycín v pozícii 219 (Lenart et al., 2015). Kryoelektronová mikroskopická štruktúra Vga(A)_{LC} v komplexe s ribozómom ukazuje, že okrem valínu v pozícii 219, ktorý sa čiastočne prekrýva s väzobným miestom pre linkomycín, sa žiaden z aminokyselinových zbytkov Vga(A)_{LC} linkeru neprekrýva s väzobným miestom pre LS_{AP} antibiotika (Crowe McAuliffe et al., 2021). To naznačuje, že k odstráneniu LS_{AP} antibiotík z ribozómu nedochádza v dôsledku stérického prekryvu aminokyselín Vga(A)_{LC} linkeru s antibiotikmi, ale najskôr konfiguračnou zmenou väzobného miesta pre antibiotika.



Obrázok 45. – Vplyv jednotlivých pozíc na úroveň rezistencie na konkrétne antibiotika – linkomycín, klindamycín, tiamulín a pristinamycín IIA. Vytvorené pomocou štatistickej analýzy rozptylu (ANOVA). Výsledky sú vyjadrené ako relatívny pomer priemernej MIC pre varianty s konkrétnym zvyškom.

Mutagenéza aminokyselinových zbytkov Vga(A)_{LC} v pozícii Val219, Tyr223 a Phe224 za alanín (Crowe McAuliffe et al., 2021) ukázala dôležitosť týchto aminokyselín pre schopnosť Vga(A)_{LC} udeľovať rezistenciu. Zatiaľ čo zámenou V219A bola rezistencia k LS_{AP} antibiotikám zachovaná, pričom došlo k miernemu zvýšeniu rezistencie k pleuromutilínom, mutácie Y223A a F224A viedli k strate schopnosti udeľovať rezistenciu. Y223 tvorí v štruktúre Vga(A)_{LC} s ribozómom interakciu s U2585 23S rRNA, čím mení jeho konformáciu v dôsledku čoho dochádza k zmene väzobného miesta pre LS_{AP} antibiotika (Crowe McAuliffe et al., 2021). Ako je patrne z obrázku 46, ktorý porovnáva aminokyselinovú sekvenciu prirodzene sa vyskytujúcich Vga(A) variant, aminokyseliny v pozíciách 223 a 224 sú konzervované, zatiaľ čo v pozícii 219 je prítomný valín alebo s menšou frekvenciou glycín (Vimberg et al., 2020).

	NBD1						Linker						Špička linkru						NBD2							
Variant	4	9	24	36	41	113	150	163	165	173	176	212	215	216	218	219	220	226	247	323	342	344	383	428	474	494
Vga(A)	M	N	R	I	S	N	D	N	V	H	E	L	G	K	K	G	A	G	S	P	T	E	S	K	K	T
Vga(A) _{LC}	L	H	R	I	S	N	D	N	V	H	E	S	G	K	K	V	T	S	R	P	T	E	S	K	K	T
Vga(A) _{NEW}	M	H	R	V	N	S	E	N	V	Q	E	S	S	R	K	G	A	G	S	H	I	D	N	R	N	A
Vga(A) _{LIKE1}	M	H	H	V	N	N	E	K	I	H	D	S	G	R	K	V	T	G	S	P	T	E	N	K	K	T
Vga(A) _{LIKE2}	M	H	H	V	N	N	E	K	V	H	D	S	G	R	K	V	T	G	S	P	T	E	N	K	K	T
Vga(A) _V *	L	H	Q	V	S	N	K	D	I	R	Q	S	A	K	K	V	A	N	K	P	I	E	N	E	K	T

Obrázok 46. – Variabilita aminokyselinovej sekvencie v oblasti linkru zodpovedná za pravdepodobnú stabilitu Vga(A) variant v bakteriálnom ribozóme.

Zavedením mutácie K218T do Vga(A), ktorý neudeľuje rezistenciu k linkozamidom (G. Novotna & Janata, 2006) vznikla varianta Vga(A), ktorá bola najúčinnjšou pripravenou variantou udeľujúcou vysokú hladinu rezistencie ako k linkozamidom a pleuromutilínom, tak aj k streptogramínom (obr. 27) (Lenart et al., 2015). Avšak zámenou lyzínu za alanín v rovnakej pozícii (K218A) v proteíne Vga(A)_{LC} zostal rezistenčný fenotyp proteínu zachovaný (Crowe McAuliffe et al., 2021). Je pravdepodobné, že variabilné aminokyseliny v špičke linkeru sa rôznym spôsobom podieľajú na konformačných zmenách väzobného miesta pre antibiotika, čo sa prejavuje rôznou schopnosťou mutovaných variant udeľovať rezistenciu k jednotlivým skupinám antimikrobiálnych látok.

Je zaujímavé, že posun v antibiotickej špecificite v dôsledku aminokyselinovej variability špičky linkra nie je spoločný pre všetky ARE ABC-F proteíny. Msr(A), ktorý udeľuje rezistenciu

k makrolidom a k streptogramínom B, má malú schopnosť udeľovať rezistenciu k novej generácii makrolidových antibiotík, ku ketolidom. Selekciou rezistentných mutant kmeňa exprimujúceho *msr(A)*, na ketolidové antibiotikum telitromycín, došlo síce k zvýšenej rezistencii k telitromycínu, avšak nie v dôsledku mutácii v *Msr(A)* linkeru (Vimberg et al., 2015). Tomu zodpovedá aj skutočnosť, že *Msr(A)* linker nie je prirodzene variabilný. Dôvodom môže byť to, že makrolidy a streptogramíny B sa viažu hlbšie do ribozómu, čo pravdepodobne obmedzuje možnosti, akým spôsobom dochádza k zmene väzobného miesta v dôsledku pôsobenia *Msr(A)* a to aj napriek tomu, že *Msr(A)* linker je dlhší (Crowe McAuliffe et al., 2021; Su et al., 2018).

Znížená akumulácia antibiotika v dôsledku pôsobenia ARE ABC-F proteínov je daná znížením množstva väzobných miest na ribozóme, avšak nie transportom, ako bolo skôr predpokladané. To som dokázal tým, že som testoval akumuláciu [3H]-linkomycínu v bunkách *S. haemolyticus* s metylovanými ribozómami v dôsledku expresie rezistenčného génu *erm(C)*. Výsledná akumulácia [3H]-linkomycínu v kmeni s *vga(A)_{LC}* spolu s *erm(C)* sa nelíšila od kmeňa so samotným *erm(C)*, navyše bola podobná akumulácii v kmeni exprimujúceho iba *vga(A)_{LC}* (obr. 32). V prípade, že by sa *Vga(A)_{LC}* podieľal na effluxe antibiotik, kmeň exprimujúci *erm(C)* spolu s *vga(A)_{LC}* by akumuloval nižšiu koncentráciu [3H]-linkomycínu v bunkách v porovnaní s kmeňom exprimujúcim rezistenčné gény *vga(A)_{LC}*, a *erm(C)* samostatne. Naopak *S. haemolyticus* citlivý k linkozamidom akumuloval viac [3H]-linkomycínu v dôsledku pasívnej difúzie antibiotika do vnútra buniek a jeho naviazaním na nechránené ribozómy (obr. 32). Tento experiment by bolo vhodné doplniť nadväzujúcim experimentom, kedy by sa zisťovalo množstvo linkomycínu naviazaného na ribozómoch. Taktiež by bolo vhodnejšie testovať akumuláciu [3H]-linkomycínu u isogénnych derivatov kmeňa *S. aureus* JE2 s rôznymi rezistenčnými mechanizmami (kap. 5.4.2.). Avšak tieto kmene neboli v čase testovania akumulácie [3H]-linkomycínu k dispozícii.

Napriek tomu že je momentálne nespochybniteľné, že ARE ABC-F proteíny fungujú na ribozóme, existuje práca, ktorá ukazuje, že *Msr(D)* môže fyzicky interagovať s makrolidovým MefE transportérom z MFS superrodiny (Nunez-Samudio & Chesneau, 2013). Oba tieto gény sú kódované v operóne mobilného genetického elementu u streptokokov (Gay & Stephens, 2001) a ich účinok na rezistenciu je synergistický. V tomto prípade je možné, že antibiotikum odstránené pôsobením *Msr(D)* je okamžite transportované von z bunky čím sa znižuje

pravdepodobnosť, že sa naviaže späť do ribozómu. Napriek tomu nie je možné vylúčiť, že aj funkcia ostatných ARE ABC-F vyžaduje aktívny transport antibiotík uvoľnených z ribozómu von z bunky, avšak žiaden gén pro transportér sa okrem *Msr(D)*, v tesnom susedstve génov pro ARE ABC-F nevyskytuje. Naviac distribúcia fluorescenčne značených proteínov *Vga(A)_{LC}*, *Msr(A)* a *Vml(R)* je v bunke difúzna, z čoho vyplýva, že sa vyskytujú v cytoplazme, nie na membráne (Nguyen Thi Ngoc, 2018; M. Novotna, 2021). Zdanlivá membránová lokalizácia proteínu *Vga(A)* v membránovej frakcii (Chesneau et al., 2005) môže byť daná tým, že sa proteín vyzráža behom frakcionácie bunkového lyzátu centrifugáciou.

Je známe, že konštitutívna exprese genov *erm*, môže viesť k zhoršeniu fitness buniek a to v dôsledku deregulácie translácie niektorých proteínov ribozómami s metylovaným adenínom na 23S rRNA (Gupta et al., 2013). Na druhej strane bolo také pozorované, že prítomnosť metylácii pomocou *Erm(C)* po pridaní antibiotika zlepšuje rast (Poehlsgaard & Douthwaite, 2005; Rowe et al., 2020). Nikde nebolo testované, aký vplyv na fitness buniek má prítomnosť *ermC* spolu s génmi kódujúcimi ARE ABC-F.

Testovaním úrovne rezistencie k linkomycínu a erytromycínu a porovnaním rastu klinických izolátov *S. haemolyticus* s rôznou kombináciou rezistenčných génov *vga(A)_{LC}*, alebo *msr(A)* a *erm(C)* sme zistili, že kmeň 65OL s kombináciou *erm(C)* a *vga(A)_{LC}* vykazuje zníženú rezistenciu k erytromycínu v porovnaní s kmeňmi kódujúcimi *erm(C)* samostatne, alebo v kombinácii s *msr(A)* a to nezávisle na tom, či bol prítomný aj gén *vga(A)_{LC}* (tab. 21). Tento kmeň taktiež vykazoval znížený rast v prítomnosti subinhibičných koncentrácií erytromycínu v porovnaní s rastom bez antibiotík (obr. 43). Toto pozorovanie sa však nepotvrdilo v prípade testovania rekombinantného *S. aureus* JE2::*erm(B)*, ktorý ko-exprimoval *vga(A)_{LC}* spolu s konštitutívnym *erm(B)*. Tento kmeň vykazoval len nepatrné zníženie rezistencie k obom antibiotikám (tab. 22). Taktiež aj v tomto prípade bol zaznamenaný zhoršený rast v prítomnosti subinhibičných koncentrácií erytromycínu a linkomycínu (obr. 44), čo by mohlo naznačovať negatívny efekt pôsobenia ARE ABC-F proteínov na transláciu metylovanými ribozómami. V prípade testovania rekombinantných proteínov, bol použitý anhydratetetracyklin, ako induktor exprese *vga(A)_{LC}* naklonovaným pod *tetO* promotórom a taktiež chloramfenikol pre udržanie pRMC2 plazmidu nesúceho *vga(A)_{LC}*. V tomto prípade bol gén *vga(A)_{LC}* s najväčšou pravdepodobnosťou exprimovaný. Avšak v prípade klinického izolátu 65OL sa je možné domnievať, že expresia *vga(A)_{LC}* je riadená mechanizmom atenuácie

transkripcie, ktorá vyžaduje väzbu antibiotika do ribozómu (Vimberg et al., 2020). Nie je jasné, či je *vga(A)_{LC}* v prítomnosti antibiotík exprimovaný. Rovnako tak nie je zrejmé, ako efektívne bol gén *erm(C)* exprimovaný a aké percento ribozómov je v tomto kmeni metylované. Znížený pomer metylovaných ribozómov by mohol mať za následok zníženú MIC k erytromycínu avšak nie k linkomycínu, ku ktorému udeľuje rezistenciu aj gén *vga(A)_{LC}*. To by bolo možné posúdiť testovaním pomeru metylovaných a nemetylovaných ribozómov metódou predlžovania primeru, ako bolo popísané skôr (Gupta et al., 2013). Nízka frekvencia kombinácie *erm* génov s *vga(A)_{LC}* (G. Novotna & Janata, 2006) oproti pomerne častému výskytu kombinácie génov *erm* a *msr(A)* (Cavanagh et al., 2014; G. Novotna & Janata, 2006) naznačuje, že by v skutočnosti kombináciou génov *vga(A)* a *erm(C)* mohlo dochádzať k vyššej fitness záťaži. Aby to však bolo možné potvrdiť, bolo by potrebné analyzovať viac kmeňov kódujúcich *erm* spoločne s *vga(A)_{LC}*. Takéto kmene však nemáme k dispozícii.

Rovnako ako *erm* gény tak aj gény pre ARE ABC-F proteíny sú exprimované inducibilne (Koberska et al., 2021; Vimberg et al., 2020). Indukcia *vga(A)_{LC}* závisí na schopnosti proteínu udeľovať rezistenciu. Z toho dôvodu dochádza k „vyladeniu“ expresie, čo znamená, že sa produkuje len toľko Vga(A), koľko bunka reálne potrebuje k ochrane ribozómov (Vimberg et al., 2020). Aký je vplyv konštitutívnej produkcie ARE ABC-F proteínov na fitness buniek však nebolo v tejto práci zistené.

Pomocou ribozomálneho profilovania v sacharózovom gradiente sa nám podarilo lokalizovať Vga(A)_{LC} a ATPáza defektnú mutantu Vga(A)_{LC}_EQ v ribozomálnych frakciách (obr. 37). Zatiaľ čo Vga(A)_{LC}_EQ bola detegovaná taktiež na polyzómoch, nemutovaný Vga(A)_{LC} bol prítomný len v 50S a 70S frakciách (obr. 37). Pevnejšia a najskôr aj nešpecifická väzba mutanty Vga(A)_{LC}_EQ, ktorá viaže ATP, ale nie je už schopná jeho hydrolýzy. Predpokladá sa totiž, že hydrolýza ATP je spojená s konformačnou zmenou, ktorá vedie k uvoľneniu ABC-F proteínov z ribozómu. Je zaujímavé, že na rozdiel od EQ mutant ABC-F proteínov EttA, Uup, YbitT, Msr(D) (Boel et al., 2014; Chen et al., 2014; Murina et al., 2019; Su et al., 2018) Vga(A)_{LC}_EQ neinhibovala rast. To najskôr naznačuje, že väzba Vga(A)_{LC}_EQ na ribozóm nie je tak stabilná aby došlo k inhibícii proteosyntézy. Avšak na rozdiel od VImR (Murina et al., 2019) a Lsa (Crowe McAuliffe et al., 2021) som bol schopný v ribozomálnej frakcii detegovať taktiež plne funkčný nemutovaný proteín. Dôvodom by mohol byť fakt, že Vga(A)_{LC} zostalo naviazané na ribozóme vďaka permanentnej prítomnosti linkomycínu behom centrifugácie za súčasnej absencie ATP.

Bolo by zaujímavé zistiť ako by bola ovplyvnená väzba nemutovaného Vga(A)_{LC} proteínu v prítomnosti ATP. U Vga(A)_{LC}_EQ mutanty došlo k zvýšeniu väzby v prítomnosti ATP (Crowe McAuliffe et al., 2021). Je možné predpokladať, že v prítomnosti ATP v pufri behom ultracentrifugácie by Vga(A)_{LC} na ribozóme nebol pravdepodobne detegovaný a to z toho dôvodu, že hydrolýzou ATP by opakovane dochádzalo k uvoľňovaniu Vga(A)_{LC} z ribozómu.

Lokalizácia nemutovaného Vga(A)_{LC} v ribozomálnych frakciách bola závislá na prítomnosti linkomycínu, ale aj chloramfenikolu v médiu behom centrifugácie a to nezávisle na tom, či k danému antibiotiku proteín udeľuje rezistenciu (obr. 38). To nasvedčuje faktu, že nemutovaný Vga(A)_{LC} rozpoznáva ribozóm zastavený vplyvom antibiotika, avšak nie behom iniciácie translácie, kedy je taktiež E miesto prázdne, kam sa ABC-F proteíny viažu. Týmto sa nám naskytuje otázka, ako by vyzerala lokalizácia v prípade použitia erytromycínu? V tomto smere by bolo na mieste rozšírenie experimentov u ktorých by bolo možné sledovať interakciu Vga(A)_{LC} a ribozómov za použitia antibiotík viažucich sa do 30S ribozomálnej podjednotky. Z týchto experimentov by sa dalo vyvodiť v akom stave musí byť ribozóm aby došlo k detegovateľnej interakcii s Vga(A)_{LC} proteínom.

Kopurifikáciou ABC-F proteínov a bakteriálnych ribozómov pomocou iónexovej chromatografie na monolitovej kolóne sme detegovali interakciu s nemutovaným Vga(A)_{LC} (obr. 40). Avšak sme ju nedokázali preukázať v prípade iných variant Vga(A) proteínov (obr. 41). Tieto varianty sa okrem sekvencie špičky linkeru líšia aj vo zvyšnej časti linkeru, ktorý je zodpovedný za väzbu na ribozóm (obr. 46) (Crowe McAuliffe et al., 2021; Vimberg et al., 2020) a môžu mať teda nižšiu afinitu k ribozómu než Vga(A)_{LC}, v dôsledku čoho nie je táto interakcia detekovateľná. Dôvodom by taktiež mohol byť fakt, že tieto varianty udeľujú nižšiu hladinu rezistencie k linkozamidom, avšak vysokú hladinu rezistencie ku streptogramínom (Vimberg et al., 2020). Preto by bolo možno vhodnejšie pre frakcionáciu ribozómov s týmito variantami použiť iné antibiotikum.

Lmr(C) z producenta linkomycínu *Streptomyces lincolnensis* je radený medzi ARE ABC-F proteíny (Murina et al., 2019), avšak jeho primárnou funkciou je regulácia expresie BGC pre linkomycín (Koberska et al., 2021). Pomocou kopurifikácie ribozómov sme preukázali interakciu Lmr(C) s ribozómami, rovnako ako u iných ABC-F proteínov. Oproti Vga(A)_{LC} sme boli schopní kopurifikovať iba EQ mutantu a to nezávisle na prítomnosti linkomycínu v médiu. To

nasvedčuje tomu, že regulačná funkcia Lmr(C) musí byť riadená prostredníctvom ribozómu. Mechanizmus však nie je zatiaľ známy.

7. Súhrn

- Vytvorením mutovaných proteínov kombinujúcich aminokyseliny Vga(A) a Vga(A)_{LC} v oblasti špičky linkra som určil dôležitosť jednotlivých aminokyselín, ktoré sú zodpovedné za zmenu rezistenčného fenotypu. Zistil som, že polárne aminokyseliny serín a treonín pozíciách 212 a 220 sú dôležité pre vysokú hladinu rezistencie k linkozamidom. Naopak glycín v pozícii 219 je dôležitý pre rezistenciu k streptogramínom A. Pre rezistenciu k pleuromutilínom sú však dôležité ako serín a treonín v pozíciách 212 a 220, tak aj glycín v pozícii 219.
- Súčasná ko-expressia *vga(A)_{LC}* a *erm(C)* v kmeni *S. haemolyticus* v bakteriálnej bunke neznižuje množstvo intracelulárneho [3H]-linkomycínu oproti kmeňu len s *erm(C)*. Tento experiment potvrdil, že Vga(A)_{LC} sa nepodieľa na transporte a rovnako ako Erm(C) udeľuje rezistenciu prostredníctvom modifikácie väzobného miesta antibiotík na ribozóme.
- Ko-expressia *vga(A)_{LC}*, alebo *msr(A)* a *erm(C)* u laboratórneho kmeňa *S. aureus* JE2 a klinického izolátu *S. haemolyticus* vedie k zhoršeniu rastu bakteriálnych kmeňov aj v prípade, že je rezistenčný fenotyp zachovaný.
- Pomocou ribozomálneho profilovania a špecifických polyklonálnych protilátok proti Vga(A)_{LC}-6His a S7 ribozomálneho proteínu som dokázal detegovať nemutovaný Vga(A)_{LC} v ribozomálnych frakciách. Pre túto interakciu bola dôležitá prítomnosť antibiotík linkomycínu, alebo chloramfenikolu v médiu a behom ultracentrifugácie v sacharózovom gradiente.
- Kopurifikáciou ribozómov s Lmr(C) sme preukázali, že tento ARE ABC-F proteín reguluje génovú expresiu prostredníctvom ribozómu.

8. Zoznam literatúry

- Ackermann, G., & Rodloff, A. C. (2003). Drugs of the 21st century: Telithromycin (HMR 3647) - The first ketolide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(3), 497–511. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg123>
- Alihodzic, S., Bukvic, M., Elenkov, I. J., Hutinec, A., Kostrun, S., Pesic, D., Saxty, G., Tomaškovic, L., & Zihner, D. (2018). Current trends in macrocyclic drug discovery and beyond-Ro5. *Progress in Medicinal Chemistry*, *57*(1), 113–233. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2018.01.002>
- Allignet, J., Loncle, V., & 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*(1), 45–51. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90488-B](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90488-B)
- Antonelli, A., D'Andrea, M. M., Brenciani, A., Galeotti, C. L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P. E., & Rossolini, G. M. (2018). Characterization of poxtA, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(7), 1763–1769. <https://doi.org/10.1093/jac/dky088>
- Auer, P., Burgsteiner, H., & Maass, W. (2008). A learning rule for very simple universal approximators consisting of a single layer of perceptrons. *Neural Networks*, *21*(5), 786–795. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2007.12.036>
- Bae, T., Class, E. M., Schneewind, O., & Missiakas, D. (2007). Generating a collection of insertion mutations in the *Staphylococcus aureus* genome using *bursa aurealis*. *Methods in Molecular Biology*, *416*(7), 103–116. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-321-9_7
- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J. P., & Roy, P. H. (1991). Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (cmlA) gene of the In4 integron of Tn1696: Similarity of the product to transmembrane transport proteins. *Journal of Bacteriology*, *173*(14), 4493–4502. <https://doi.org/10.1128/jb.173.14.4493-4502.1991>
- Bockstael, K., & Van Aerschot, A. (2009). Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine*, *4*(2), 141–155. <https://doi.org/10.2478/s11536-008-0088-9>
- Boel, G., Smith, P. C., Ning, W., Englander, M. T., Chen, B., Hashem, Y., Testa, A. J., Fischer, J. J., Wieden, H.-J., Frank, J., Gonzalez, R. L., & Hunt, J. F. (2014). The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(2), 143–151. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2740>
- Bolton, L. F., Kelley, L. C., Lee, M. D., Fedorka-Cray, P. J., & Maurer, J. J. (1999). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(5), 1348–1351. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.5.1348-1351.1999>
- Cavanagh, J. P., Hjerde, E., Holden, M. T. G., Kahlke, T., Klingenberg, C., Flægstad, T., Parkhill, J., Bentley, S. D., & Ericson Sollid, J. U. (2014). Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* in European hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(11), 2920–2927. <https://doi.org/10.1093/jac/dku271>
- Chen, B., Boël, G., Hashem, Y., Ning, W., Fei, J., Wang, C., Gonzalez, R. L., Hunt, J. F., & Frank, J. (2014). EttA regulates translation by binding the ribosomal e site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nature Structural and Molecular Biology*, *21*(2), 152–159. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2741>
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 973–980. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.973-980.2005>
- Chesneau, O., Tsvetkova, K., & Courvalin, P. (2007). Resistance phenotypes conferred by macrolide phosphotransferases. *FEMS Microbiology Letters*, 269(2), 317–322. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00643.x>
- Choi, J., Marks, J., Zhang, J., Chen, D.-H., Wang, J., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., & Puglisi, J. D. (2020). Dynamics of the context-specific translation arrest by chloramphenicol and linezolid. *Nature Chemical Biology*, 16(3), 310–317. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0423-2>
- Chowdhury, S. A., Arias, C. A., Nallapareddy, S. R., Reyes, J., Willems, R. J. L., & Murray, B. E. (2009). A trilocus sequence typing scheme for hospital epidemiology and subspecies differentiation of an important nosocomial pathogen, *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 2713–2719. <https://doi.org/10.1128/JCM.00667-09>
- Clemett, D., & Markham, A. (2000). Linezolid. *Drugs*, 59(4), 815–827. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059040-00007>
- Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E., & Vannuffel, P. (1997). Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(SUPPL. A), 7–13. https://doi.org/10.1093/jac/39.suppl_1.7
- Crowe-McAuliffe, C., Graf, M., Huter, P., Takada, H., Abdelshahid, M., Nováček, J., Murina, V., Atkinson, G. C., Haurlyliuk, V., & Wilson, D. N. (2018). Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(36), 8978–8983. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808535115>
- Crowe-McAuliffe, C., Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Turnbull, K. J., Polikanov, Y. S., Sundsfjord, A., Hegstad, K., Atkinson, G. C., & Wilson, D. N. (2021). Structural basis for PoxTA-mediated resistance to Phenicol and Oxazolidinone antibiotics. *BioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.06.18.448924>
- Crowe McAuliffe, C., Murina, V., Turnbull, K. J., Kasari, M., Mohamad, M., Polte, C., Takada, H., Vaitkevicius, K., Johansson, J., Ignatova, Z., Atkinson, G. C., O’Neill, A. J., Haurlyliuk, V., & Wilson, D. N. (2021). Structural basis of ABCF-mediated resistance to pleuromutilin, lincosamide, and streptogramin A antibiotics in Gram-positive pathogens. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23753-1>
- Dahlquist, K. D., & Puglisi, J. D. (2000). Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site. *Journal of Molecular Biology*, 299(1), 1–15. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3672>
- Das, B., Rajarao, A. V. S., Rudra, S., Yadav, A., Ray, A., Pandya, M., Rattan, A., & Mehta, A. (2009). Synthesis and biological activity of novel oxazolidinones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(22), 6424–6428. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.054>
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 317–364. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00031-07>
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42(7), 1007–1017. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>
- Del Grosso, M., Iannelli, F., Messina, C., Santagati, M., Petrosillo, N., Stefani, S., Pozzi, G., & Pantosti,

- A. (2002). Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(3), 774–778. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.774-778.2002>
- Dinos, G., Kalpaxis, D. L., Wilson, D. N., & Nierhaus, K. H. (2005). Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic Acids Research*, *33*(16), 5291–5296. <https://doi.org/10.1093/nar/gki833>
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, *174*(18), 2967–2983. <https://doi.org/10.1111/bph.13936>
- Doherty, J., & Guo, M. (2016). *Encyclopedia of Cell Biology*. *1*, 309–340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10039-2>.
- Fitton, J. E., & Shaw, W. V. (1979). Comparison of chloramphenicol acetyltransferase variants in staphylococci. Purification, inhibitor studies and N-terminal sequences. *Biochemical Journal*, *177*(2), 575–582. <https://doi.org/10.1042/bj1770575>
- Fostier, C. R., Ousalem, F., Leroy, E. C., Saravuth, NgoSoufari, H., Innis, A. C., Hashem, Y., & Boël, G. (2021). Regulation and mechanistic basis of macrolide resistance by the ABC-F ATPase MsrD. *BioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.11.29.470318>
- Frank, J. (2003). Electron microscopy of functional ribosome complexes. *Biopolymers*, *68*(2), 223–233. <https://doi.org/10.1002/bip.10210>
- Gabashvili, I. S., Gregory, S. T., Valle, M., Grassucci, R., Worbs, M., Wahl, M. C., Dahlberg, A. E., & Frank, J. (2001). The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Molecular Cell*, *8*(1), 181–188. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00293-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00293-3)
- Gay, K., & Stephens, D. S. (2001). Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Infectious Diseases*, *184*(1), 56–65. <https://doi.org/10.1086/321001>
- Gaynor, M., & Mankin, A. (2005). Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *3*(9), 949–960. <https://doi.org/10.2174/1568026033452159>
- Gentry, D. R., McCloskey, L., Gwynn, M. N., Rittenhouse, S. F., Scangarella, N., Shavar, R., & Holmes, D. J. (2008). Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(12), 4507–4509. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-08>
- Giessing, A. M. B., Jensen, S. S., Rasmussen, A., Hansen, L. H., Gondela, A., Long, K., Vester, B., & Kirpekar, F. (2009). Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria. *Rna*, *15*(2), 327–336. <https://doi.org/10.1261/rna.1371409>
- Green and, R., & Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annual Review of Biochemistry*, *66*(1), 679–716. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.679>
- Gupta, P., Sothiselvam, S., Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S. (2013). Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why *erm* genes are inducible. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms2984>
- Hancock, R. E. W. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infectious Diseases*, *5*(4), 209–218. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70051-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70051-7)

- Hisanaga, T., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. (2005). Mechanisms of resistance to telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(3), 447–450. <https://doi.org/10.1093/jac/dki249>
- Hot, C., Berthet, N., & Chesneau, O. (2014). Characterization of sal(A), a Novel Gene Responsible for Lincosamide and Streptogramin a resistance in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(6), 3335–3341. <https://doi.org/10.1128/AAC.02797-13>
- Jacquet, E., Girard, J. M., Ramaen, O., Pamard, O., Lévaïque, H., Betton, J. M., Dassa, E., & Chesneau, O. (2008). ATP hydrolysis and pristinamycin IIA inhibition of the *Staphylococcus aureus* Vga(A), a dual ABC protein involved in streptogramin A resistance. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(37), 25332–25339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800418200>
- Janosi, L., & Ban, E. (1982). Localization of genes coding for macrolide resistance on the penicillinase plasmid of isolates of an epidemic *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, *29*(3), 187–200.
- Jensen, W. D., Thakker-Varia, S., Dubin, D. T., & Weinstein, M. P. (1987). Prevalence of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance and erm gene classes among clinical strains of staphylococci and streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *31*(6), 883–888. <https://doi.org/10.1128/AAC.31.6.883>
- Johnston, N., Mukhtar, T., & Wright, G. (2005). Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Current Drug Targets*, *3*(4), 335–344. <https://doi.org/10.2174/1389450023347678>
- Kaji, A., Kiel, M. C., Hirokawa, G., Muto, A. R., Inokuchi, Y., & Kaji, H. (2001). The fourth step of protein synthesis: Disassembly of the posttermination complex is catalyzed by elongation factor G and ribosome recycling factor, a near-perfect mimic of tRNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *66*, 515–529. <https://doi.org/10.1101/sqb.2001.66.515>
- Kamenik, Z., Kadlcik, S., Radojevic, B., Jiraskova, P., Kuzma, M., Gazak, R., Najmanova, L., Kopecky, J., & Janata, J. (2016). Deacetylation of mycothiol-derived “waste product” triggers the last biosynthetic steps of lincosamide antibiotics. *Chemical Science*, *7*(1), 430–435. <https://doi.org/10.1039/c5sc03327f>
- Kannan, K., Kanabar, P., Schryer, D., Florin, T., Oh, E., Bahroos, N., Tenson, T., Weissman, J. S., & Mankin, A. S. (2014). The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(45), 15958–15963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417334111>
- Kihira, K., Shimizu, Y., Shomura, Y., Shibata, N., Kitamura, M., Nakagawa, A., Ueda, T., Ochi, K., & Higuchi, Y. (2012). Crystal structure analysis of the translation factor RF3 (release factor 3). *FEBS Letters*, *586*(20), 3705–3709. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.029>
- Koberska, M., Vesela, L., Vimberg, V., Lenart, J., Vesela, J., Kamenik, Z., Janata, J., & Novotna, G. B. (2021). Beyond self-resistance: ABCF ATPase LmrC is a signal-transducing component of an antibiotic driven signaling cascade hastening the onset of lincomycin biosynthesis. *MBio*, *12*(5). <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.343517>
- La Teana, A., Gualerzi, C. O., & Brimacombe, R. (1995). From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. *RNA*, *1*(8), 772–782.
- Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., & Sperling-Petersen, H. U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *69*(1), 101–123. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.101>

- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482–492. <https://doi.org/10.1086/324626>
- Lenart, J. (2012). Vliv aminokyseliny variability na rezistenční fenotyp u ARE podrodiny ABC proteinů. *Diplomová Práce*.
- Lenart, J., Vimberg, V., Vesela, L., Janata, J., & Novotná, G. B. (2015). Detailed mutational analysis of Vga(A) interdomain linker: Implication for antibiotic resistance specificity and mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1360–1364. <https://doi.org/10.1128/AAC.04468-14>
- Licht, A., & Schneider, E. (2011). ATP binding cassette systems: Structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology*, 6(5), 785–801. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0054-4>
- Livermore, D. M. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 9ii-ii16. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg249>
- Long, K. S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., & Vester, B. (2006). The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7), 2500–2505. <https://doi.org/10.1128/AAC.00131-06>
- Lozano, C., Aspiroz, C., Rezusta, A., Gómez-Sanz, E., Simon, C., Gómez, P., Ortega, C., Revillo, M. J., Zarazaga, M., & 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. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(4), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.009>
- Marchese, A., & Schito, G. C. (2001). The oxazolidinones as a new family of antimicrobial agent. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(4), 66–74. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00060.x>
- Marshall, S. H., Donskey, C. J., Hutton-Thomas, R., Salata, R. A., & Rice, L. B. (2002). Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3334–3336. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3334-3336.2002>
- Matsuoka, M., Inoue, M., Endo, Y., & Nakajima, Y. (2003). Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 287–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00134-4)
- McGehee, R., Smith, C., Wilcox, C., & Finland, M. (1968). Comparative studies of antibacterial activity in vitro and absorption and excretion of lincomycin and clindamycin. *The American Journal of the Medical Sciences*, 256(5), 279–292. <https://doi.org/10.1097/00000441-196811000-00002>
- Morar, M., Bhullar, K., Hughes, D. W., Junop, M., & Wright, G. D. (2009). Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenyltransferase LinB. *Structure*, 17(12), 1649–1659. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.10.013>
- Morar, M., Pengelly, K., Koteva, K., & Wright, G. D. (2012). Mechanism and diversity of the erythromycin esterase family of enzymes. *Biochemistry*, 51(8), 1740–1751. <https://doi.org/10.1021/bi201790u>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

- Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinnu, M., Saha, C. K., Grimshaw, J. W., Seki, T., Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., Strahl, H., Haurlyuk, V., & Atkinson, G. C. (2019). ABCF ATPases involved in protein synthesis, ribosome assembly and antibiotic resistance: structural and functional diversification across the tree of life. *Journal of Molecular Biology*, *431*(18), 3568–3590. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.013>
- Nguyen Thi Ngoc, B. (2018). Buněčná lokalizace rezistentních proteinů Vga(A)LC a Msr(A) prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. *Diplomová Práce*.
- Novotna, G., Adamkova, V., Janata, J., Melter, O., & Spizek, J. (2005). Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(8), 3586–3589. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3586-3589.2005>
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(12), 4070–4076. <https://doi.org/10.1128/AAC.00799-06>
- Novotna, M. (2021). Mechanismus inducibilní genové exprese rezistenčního proteinu VgaALC ze *Staphylococcus haemolyticus*. *Diplomová Práce*.
- Nunez-Samudio, V., & 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*. *Research in Microbiology*, *164*(3), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.12.003>
- Oldham, M. L., & Chen, J. (2011). Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(37), 15152–15156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108858108>
- Orelle, C., Alvarez, F. J. D., Oldham, M. L., Orelle, A., Wiley, T. E., Chen, J., & Davidson, A. L. (2010). Dynamics of α -helical subdomain rotation in the intact maltose ATP-binding cassette transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(47), 20293–20298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006544107>
- Pape, T., Wintermeyer, W., & Rodnina, M. V. (1998). Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. *The EMBO Journal*, *17*(24), 7490–7497. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7490>
- Pechere, J. C. (1999). Current and future management of infections due to methicillin-resistant staphylococci infections: the role of quinupristin/dalfopristin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *44*(90001), 11–18. https://doi.org/10.1093/jac/44.suppl_1.11
- Petrelli, D., La Teana, A., Garofalo, C., Spurio, R., Pon, C. L., & Gualerzi, C. O. (2001). Translation initiation factor IF3: Two domains, five functions, one mechanism? *EMBO Journal*, *20*(16), 4560–4569. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4560>
- Pilehvar, S., Dardenne, F., Blust, R., & De Wael, K. (2012). Electrochemical sensing of phenicol antibiotics at gold. *International Journal of Electrochemical Science*, *7*(6), 5000–5011.
- Poehlsgaard, J., & Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(11), 870–881. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1265>
- Qin, X., Poon, B., Kwong, J., Niles, D., Schmidt, B. Z., 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. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(1), 81–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.007>
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108(4), 557–572. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00619-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00619-0)
- Reynolds, E., Ross, J. I., & Cove, J. H. (2003). Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(3), 228–236. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00218-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00218-8)
- Rezanka, T., Spizek, J., & Sigler, K. (2007). Medicinal use of lincosamides and microbial resistance to them. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 6(2), 133–144. <https://doi.org/10.2174/187152107780361670>
- Roberts, M. C. (2008). Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), 147–159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x>
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., & Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/aac.43.12.2823>
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Cunliffe, W. J., Baumberg, S., & Wootton, J. C. (1990). Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Molecular Microbiology*, 4(7), 1207–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00696.x>
- Ross, Jeremy I., Eady, E. A., Cove, J. H., & Baumberg, S. (1996). Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by msrA in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Gene*, 183(1–2), 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00541-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00541-0)
- Rowe, S. J., Mecaskey, R. J., Nasef, M., Talton, R. C., Sharkey, R. E., Halliday, J. C., & Dunkle, J. A. (2020). Shared requirements for key residues in the antibiotic resistance enzymes ErmC and ErmE suggest a common mode of RNA recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 295(51), 17476–17485. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014280>
- Savir, Y., & Tlusty, T. (2013). The ribosome as an optimal decoder: A lesson in molecular recognition. *Cell*, 153(2), 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.032>
- Scangarella-Oman, N. E., Shawar, R. M., Bouchillon, S., & Hoban, D. (2009). Microbiological profile of a new topical antibacterial: Retapamulin ointment 1%. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(3), 269–279. <https://doi.org/10.1586/ERI.09.7>
- Schentag, J. J., & Ballow, C. H. (1991). Tissue-directed pharmacokinetics. *The American Journal of Medicine*, 91(3A), 5–11. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90394-d](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90394-d)
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., & Doudna Cate, J. H. (2005). Structure of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 310(5749), 827–834. <https://doi.org/10.1126/science.1117230>
- Sharkey, L. K. R., Edwards, T. A., & O'Neill, A. J. (2016). ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *MBio*, 7(2), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01975-15>
- Sharkey, L. K. R., & O'Neill, A. J. (2018). Antibiotic resistance ABC-F proteins: bringing target protection into the limelight. *ACS Infectious Diseases*, 4(3), 239–246.

<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00251>

- Singh, K. V., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(6), 1845–1850. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1845-1850.2002>
- Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Howard, J., & Woodford, N. (2000). Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in western Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(2), 433–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.2.433-436.2000>
- Sood, S. (2016). Chloramphenicol – A potent armament against multi-drug resistant (MDR) gram negative bacilli? *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *10*(2). <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/14989.7167>
- Steitz, T. A., & Moore, P. B. (2003). RNA, the first macromolecular catalyst: The ribosome is a ribozyme. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(8), 411–418. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00169-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00169-5)
- 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., & Gao, Y. G. (2018). Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(20), 5157–5162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803313115>
- Svetlov, M. S., Syroegin, E. A., Aleksandrova, E. V., Atkinson, G. C., Gregory, S. T., Mankin, A. S., & Polikanov, Y. S. (2021). Structure of Erm-modified 70S ribosome reveals the mechanism of macrolide resistance. *Nature Chemical Biology*, *17*(4), 412–420. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00715-0>
- Syroegin, E. A., Flemmich, L., Klepacki, D., Vazquez-Laslop, N., Micura, R., & Polikanov, Y. S. (2021). Structural basis for the context-specific action of classic peptidyl transferase inhibitors. *BioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.06.17.448903>
- 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. *Journal of Molecular Biology*, *330*(5), 1005–1014. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00662-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00662-4)
- Ter Beek, J., Guskov, A., & Slotboom, D. J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *Journal of General Physiology*, *143*(4), 419–435. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>
- Vannuffel, P., & Cocito, C. (1996). Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, *51*, 20–30. <https://doi.org/10.2165/00003495-199600511-00006>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, *3*(3), 281–290. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
- Vimberg, V., Cavanagh, J. P., Novotna, M., Lenart, J., Ngoc, B. N. T., Vesela, J., Pain, M., Koberaska, M., & Novotna, G. B. (2020). Ribosome-mediated attenuation of *vga(A)* expression is shaped by the antibiotic resistance specificity of *Vga(A)* protein variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00666-20>
- Vimberg, V., Lenart, J., Janata, J., & Novotna, G. B. (2015). ClpP-independent function of ClpX interferes with telithromycin resistance conferred by *Msr(A)* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(6), 3611–3614. <https://doi.org/10.1128/AAC.04367-14>

- Vimberg, V., Xiong, L., Bailey, M., Tenson, T., & Mankin, A. (2004). Peptide-mediated macrolide resistance reveals possible specific interactions in the nascent peptide exit tunnel. *Molecular Microbiology*, *54*(2), 376–385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04290.x>
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., Wang, D., Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Feßler, A. T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., & Shen, J. (2015). A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(8), 2182–2190. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv116>
- Washington, J. A., & Wilson, W. R. (1985a). Erythromycin: A microbial and clinical perspective after 30 years of clinical use (first of two parts). *Mayo Clinic Proceedings*, *60*(3), 189–203. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)60219-5](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)60219-5)
- Washington, J. A., & Wilson, W. R. (1985b). Erythromycin: A microbial and clinical perspective after 30 years of clinical use (second of two parts). *Mayo Clinic Proceedings*, *60*(4), 271–278. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)60322-X](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)60322-X)
- Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, *7*(14). <https://doi.org/10.12703/P7-14>
- Williams, J. D., & Sefton, A. M. (1993). Comparison of macrolide antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *31*, 11–26. https://doi.org/10.1093/jac/31.suppl_C.11
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Jr, W. M. C., Morgan-warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, *407*(6802), 327–339. <https://doi.org/10.1038/35030006>
- Woodford, N. (2005). Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology and Infection*, *11*(3), 2–21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01140.x>
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(10), 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>
- Yan, K., Madden, L., Choudhry, A. E., Voigt, C. S., Copeland, R. A., & Gontarek, R. R. (2006). Biochemical characterization of the interactions of the novel pleuromutilin derivative retapamulin with bacterial ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(11), 3875–3881. <https://doi.org/10.1128/AAC.00184-06>
- Yang, L. P. H., & Keam, S. J. (2008). Retapamulin: A review of its use in the management of impetigo and other uncomplicated superficial skin infections. *Drugs*, *68*(6), 855–873. <https://doi.org/10.2165/00003495-200868060-00008>
- Yonath, A. (2005). Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism and cellular regulation. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 649–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133130>
- Zaher, H. S., & Green, R. (2011). A primary role for release factor 3 in quality control during translation elongation in *Escherichia coli*. *Cell*, *147*(2), 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.045>
- Zhang, C., Liu, L., Zhang, P., Cui, J., Qin, X., Ma, L., Han, K., Wang, Z., Wang, S., Ding, S., & Shen, Z.

(2021). Characterization of a novel gene, *srpA*, conferring resistance to streptogramin A, Pleuromutilins, and Lincosamides in *Streptococcus suis*. *Engineering*.
<https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.12.015>

Zhong, P., & Shortridge, V. D. (2000). The role of efflux in macrolide resistance. *Drug Resistance Updates*, 3(6), 325–329. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0175>

9. Prílohy

Zoznam publikácií:

- **Lenart, J.,** Vimberg, V., Vesela, L., Janata, J., & Novotna, G. B. (2015). Detailed mutational analysis of Vga(A) interdomain linker: Implication for antibiotic resistance specificity and mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1360–1364. <https://doi.org/10.1128/AAC.04468-14>
- Vimberg, V., **Lenart, J.,** Janata, J., & Novotna, G. B. (2015). ClpP-independent function of ClpX interferes with telithromycin resistance conferred by Msr(A) in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3611–3614. <https://doi.org/10.1128/AAC.04367-14>
- Vimberg, V., Cavanagh, J. P., Novotna, M., **Lenart, J.,** Ngoc, B. N. T., Vesela, J., Pain, M., Koberska, M., & Novotna, G. B. (2020). Ribosome-mediated attenuation of vga(A) expression is shaped by the antibiotic resistance specificity of Vga(A) protein variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00666-20>
- Koberska, M., Vesela, L., Vimberg, V., **Lenart, J.,** Vesela, J., Kamenik, Z., Janata, J., & Novotna, G. B. (2021). Beyond self-resistance: ABCF ATPase LmrC is a signal-transducing component of an antibiotic driven signaling cascade hastening the onset of lincomycin biosynthesis. *MBio*, 12(5). <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.343517>