

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

# **Genová výbava producentů biologicky aktivních látek v půdních bakteriálních společenstvech**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D  
Školitel-specialista: Ing. Jan Kopecký

Hradec Králové 2010

Petra Šanderová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

.....

Tato diplomová práce vznikla ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v. v. i. na oddělení bakteriologie v letech 2008 – 2010.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na mé diplomové práci. Velmi děkuji mému školiteli Ing. Janu Kopeckému za ochotu, trpělivost a cenné rady. Velký dík patří též RNDr. Markétě Marečkové, Ph. D za konzultace a odbornou pomoc. Dále děkuji pracovníkům Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i., jmenovitě Mgr. Ladislavu Čermákovi, Mgr. Jitce Novotné Ph. D a Ivetě Slaninové za příjemné prostředí a drobné pomoci během laboratorní práce. Děkuji také Doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph. D za vstřícné jednání a umožnění vypracování této práce.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Petra Šanderová

Školitel: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph. D, specialista: Ing. Jan Kopecký

Název diplomové práce: Genová výbava producentů biologicky aktivních látek  
v půdních bakteriálních společenstvech

Tato diplomová práce je součástí projektu detekce a izolace vybraných genů sekundárního metabolismu jako markerů přítomnosti biosyntetických drah podobných antibiotik. Mým úkolem bylo objevit a popsat určené geny ve sbírce kmenů aktinomycet izolovaných z rozdílných půd. Jako vhodné byly vybrány geny homologní ke genu *lmrC* pocházejícímu z biosyntetické dráhy linkosamidového antibiotika linkomycinu, protože jejich přítomnost v genových klastrech je poměrně častá. Využila jsem k tomu metody polymerázové řetězcové reakce, elektroforézy, štípání restrikčními enzymy a Southern blot. Výsledkem je kolekce kmenů nesoucích homology genu *lmrC*. Porovnáním s fylogramem známých sekvencí jsme se pokusili odhadnout, v jaké souvislosti se v genomu každý nalezený gen vyskytuje.

## **ABSTRACT**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Petra Šanderová

Supervisor: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph. D, specialist: Ing. Jan Kopecký

Title of diploma thesis: Genetic apparatus of biologically active compounds producers in soil bacterial communities

The thesis aims in selecting one possible marker indicating the presence of antibiotic biosynthetic pathways in studied strains. My specific task was to identify and describe certain genes in a collection of actinomycete strains isolated from different soils. As the most suitable were chosen genes homologous to gene *lmrC* originating from biosynthetic pathway of a lincosamid antibiotic lincomycin because of their relatively high incidence in antibiotic gene clusters. The employed methods were polymerase chain reaction, electrophoresis, restriction fragment length polymorphism and Southern blot. The results are presented as a collection of strains carrying *lmrC* gene homologues. The context in which each of the identified genes occurs in the respective genome was estimated by comparison with known sequences of the respective genes using a phylogram.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	8
<b>2</b>	<b>Literární přehled</b> .....	11
2.1	Antibiotika.....	11
2.1.1	Linkosamidy .....	17
2.2	Rezistence .....	25
2.2.1	Rezistence na linkomycin a klindamycin .....	27
2.3	Rod <i>Streptomyces</i> .....	29
2.3.1	Vývojový cyklus streptomycet .....	32
2.3.2	Sekundární metabolity streptomycet .....	34
2.4	ABC transportéry .....	35
2.4.1	Struktura ABC transportéru .....	37
2.5	Základní principy používaných metod.....	40
2.5.1	PCR (= Polymerase Chain Reaction).....	40
2.5.2	Elektroforéza.....	41
2.5.3	Ligace.....	42
2.5.4	Hybridizace.....	43
2.6	Cíle diplomové práce .....	45
<b>3</b>	<b>Metody</b> .....	46
3.1	Materiál .....	46
3.1.1	Bakteriální kmeny.....	46
3.1.2	Plasmidy.....	46
3.1.3	Kultivační média.....	46
3.1.4	Pufry.....	47
3.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	48
3.2.1	Amplifikace fragmentu genu <i>lmrB</i> .....	49
3.2.2	Amplifikace fragmentu genu <i>lmrC</i> .....	50
3.2.3	PCR se zaligovaným vzorkem 118.....	52
3.3	Elektroforéza DNA .....	54
3.3.1	Analytická elektroforéza DNA v agarózovém gelu.....	54
3.3.2	Elektroforéza DNA v agarózovém gelu pro účely hybridizace.....	54
3.4	Příprava genomové DNA ze studovaných kmenů .....	55
3.5	Ligace.....	56
3.5.1	Ligace DNA.....	56
3.6	Transformace buněk <i>E. coli</i> tepelným šokem .....	58
3.7	Precipitace DNA isopropylalkoholem .....	60

3.8	Štěpení genomické DNA a hybridizace .....	61
3.8.1	Štěpení DNA restrikčními enzymy .....	61
3.8.2	Přenos DNA z gelu na membránu - <i>Southern blot</i> .....	62
3.8.3	Značení sond a vlastní hybridizace .....	62
3.9	Hledání homologních sekvencí ABC transportéru v databázi GenBank .....	65
4	Výsledky .....	66
4.1	Vyhledávání homologních genů <i>lmrC</i> ve sbírce kmenů .....	66
4.1.1	Primery .....	70
4.2	Analýza sekvenovaných kmenů .....	74
4.3	Genová výbava vybraných kmenů .....	78
5	Diskuse .....	81
6	Závěr .....	86
7	Seznam literatury .....	87

# 1 Úvod

Během 20. století poznatky o sekundárních metabolitech mikrobus a rostlin pomohly k prodloužení střední délky života o polovinu, snížily bolestivost nemocí a posunuly vpřed celou lékařskou vědu. Jak se zvyšoval počet rezistentních kmenů na stávající antibiotika, bylo nutné nalézt nové cesty k léčení: nová antibiotika, semisyntetické deriváty. Také se rozšířilo pole působnosti antibiotik. Již se nepoužívají pouze jako protimikrobní léčiva, ale také jako protinádorové látky, enzymové inhibitory nebo imunosupresivní látky (ZHANG et al., 2005).

Za jednu z nadějných cest k rozšíření spektra antimikrobních látek jsou dnes považovány cílené zásahy do biosyntetických drah antibiotik pomocí metod molekulární biologie – kombinatoriální genetika (COATES a HU, 2007). Tak lze vytvářet nové kombinace genů pocházejících z různých genových shluků *in vivo*, které vedou k produkci hybridních látek s novými biologickými aktivitami. Úspěšné použití této strategie je však podmíněno detailní znalostí biosyntetických drah antibiotik a také enzymů, které katalyzují jejich jednotlivé reakce (WEBER et al., 2003).

V dnešní době se zdá, že jsou potřeba nové látky, které by byly schopné bojovat se současným problémem antibiotické rezistence, výskytem nových nemocí nebo nemocí, na které zatím neexistují léky (ZHANG et al., 2005).

Důležitý koncept pro další vývoj přírodních produktů vychází z možností antibiotik vyvíjet další aktivity. Kombinatorní biosyntéza produkuje nové sloučeniny buď modifikací genů, nebo jejich záměnou a tím vytváří hybridní molekuly. Produkty vznikající kombinatorní biosyntézou jsou založeny na malé změně přírodní molekuly existující léčivé látky (ZHANG et al., 2005).

Další možností je využívat tzv. vzácné aktinomycety. Ty produkují snad nejrozmanitější a nejvíce unikátní, někdy velmi složité sloučeniny. Vykazují vynikající antibakteriální účinnost a obvykle nízkou toxicitu. V současné době je více než 50 vzácných aktinomycet známých jako producenti 2500 bioaktivních látek. V roce 1970 bylo známo pouze 11 vzácných aktinomycet produkujících celkem 50 sloučenin. Relativně nízký výskyt vzácných aktinomycet oproti druhům rodu *Streptomyces* je odvozen od skutečnosti, že je těžké je izolovat z přirozeného životního prostředí, pěstovat a udržovat v rámci běžných laboratorních podmínek. To jsou důvody, proč



jsou tyto druhy stále považovány za vzácné. Počet všech taxonomicky popsáných vzácných aktinomycet se dnes blíží téměř 100, ale toto číslo, vzhledem k nedávno vyvinutým genetickým a izolačním technikám, se bude rychle zvyšovat (BÉRDY, 2005).

Mikroby se rychle adaptují na prostředí a to také díky produkci sekundárních metabolitů, které jim umožňují přežít. Sekundární metabolity jsou produkovány především v době, kdy jsou mikroorganismy vystavené stresu. Z toho vyplývá, že je důležité nejenom jaké sekundární metabolity, ale i za jakých podmínek je mikroorganismy produkovány. Prostředí určuje složení sekundárních metabolitů (ZHANG et al., 2005).

Další hledání přírodních produktů je nutné kvůli dosud neléčitelným onemocněním a hledání odlišných struktur. Byly vytvořeny nové a citlivější testovací metody k izolaci, čištění a charakterizaci včetně nových metod výroby (CLARK, 1996). 95-99,9% mikroorganismů, které existují v přírodě, zatím nebylo kultivováno a pouze malá část bakterií a hub byla zkoumána pro produkci sekundárních metabolitů (TORSVIK et al. 1996). Přestože počet nově objevených látek neustále roste, farmaceutické firmy nechtějí investovat do zkoumání nových látek. Z 5 000 až 10 000 látek, které vstoupí do předklinického a klinického výzkumu, se pouze jedna látka stane léčivem (WILSON, 2002). Antibiotika se používají především k léčbě infekčních stavů, někdy však též preventivně (tzv. antibiotická profylaxe). V současnosti je však velkým problémem chybné použití antibiotik - zvláště pak použití nevhodného antibiotika (proti rezistentnímu původci) nebo předepsání antibiotik při léčbě virových onemocnění, jako je rýma nebo chřipka. Při nedodržení celé předepsané dávky antibiotik, obvykle pro pacientův subjektivní pocit zlepšení, nejsou patogenní mikroorganismy zcela zničeny. Kromě selhání léčby vede toto chování k rozvoji antibiotické rezistence u neúplně zahubených populací bakterií (LF HK).

V dnešní době je předepisování antibiotik založeno především na empirii. Volí se antibiotikum, které nejvíce odpovídá očekávanému spektru patogenních mikroorganismů a má potřebné farmakokinetické vlastnosti. Například u infekcí horních cest dýchacích se jako antibiotika první volby podávají betalaktámová antibiotika a makrolidy, u infekcí močových cest pak trimetoprim, cefalosporiny. Naopak jako rezervní antibiotika by měly zůstat fluorochinolony. Dalšími rezervními

antibiotiky jsou i linkosamidy. Využívají se jako alternativa u pacientů, kteří jsou alergičtí na penicilin, ale mají i své další indikace. Používají se při léčbě infekcí kostí a měkkých tkání. Účinná jsou především proti stafylokokům a *Bacteroides* spp. Možné využití mají také při terapii parazitárních onemocnění, jako je toxoplasmóza, babesióza nebo malárie (LF HK, LINCOVÁ et al., 2005).

Tato diplomová práce je součástí projektu detekce a izolace vybraných rezistenčních genů jako markerů přítomnosti biosyntetických drah podobných antibiotik. Naším úkolem bylo objevit a popsat geny pro rezistenci vycházející z genů příbuzných rezistencím k linkosamidovému antibiotiku linkomycinu. Zatím nepopsané organismy, které nesou příbuzné rezistenční geny, by mohly mít ve své genové výbavě biosyntetické dráhy sekundárních metabolitů podobné vlastnosti nebo jiné zajímavé geny, vhodné k modifikaci stávajících linkosamidových antibiotik. Poznání nových genů, jejich vzájemného uspořádání a celých genových shluků nám může odhalit nové, zajímavé enzymatické aktivity. V budoucnu by bylo možno tyto aktivity využít při přípravě účinnějších léčiv.

Organismy, které jsme používali pro detekci a izolaci, byly z různých lokalit. Tyto lokality jsou dlouhodobě předmětem studia laboratoře. Půda je vybrána tak, aby pokryla co nejširší spektrum půd (nejen flory, ale i chemické složení včetně pH viz tab. 4.1). Z půd byla izolována sbírka aktinomycet. Tyto aktinomycety byly nejprve testovány na aktivity proti *Micrococcus* spp. a *E. coli* (viz tab. 4.3). Dalším krokem v analýze těchto kmenů je detekce a charakterizace rezistenčních genů doprovázejících geny biosyntetické.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Antibiotika

Název „antibiotika“ vznikl v době, kdy antimikrobiálně účinné látky byly produktem jiných druhů mikroorganismů. Tento fenomén *antibiosy* již v současnosti nevyhovuje, protože vedle semisyntetických postupů jsou celé skupiny antimikrobiálně účinných látek připravovány i čistě synteticky. Přesto se tento termín nadále používá pro všechny antimikrobiálně účinné látky včetně chemoterapeutik (LINCOVÁ et al. 2005).

Chemická definice antibiotik stanoví, že jde o nízkomolekulární organické přírodní produkty (sekundární metabolity) produkované mikroorganismy. Tyto látky jsou často i v malé koncentraci aktivní proti ostatním mikroorganismům. Z 12000 známých antibiotik v roce 1995 bylo 55% produkováno vláknitými bakteriemi (aktinomycety z rodu *Streptomyces*), 11% dalšími aktinomycetami, 12% nevláknitými aktinomycetami a 22% pocházelo z vláknitých hub (ZHANG et al., 2005).

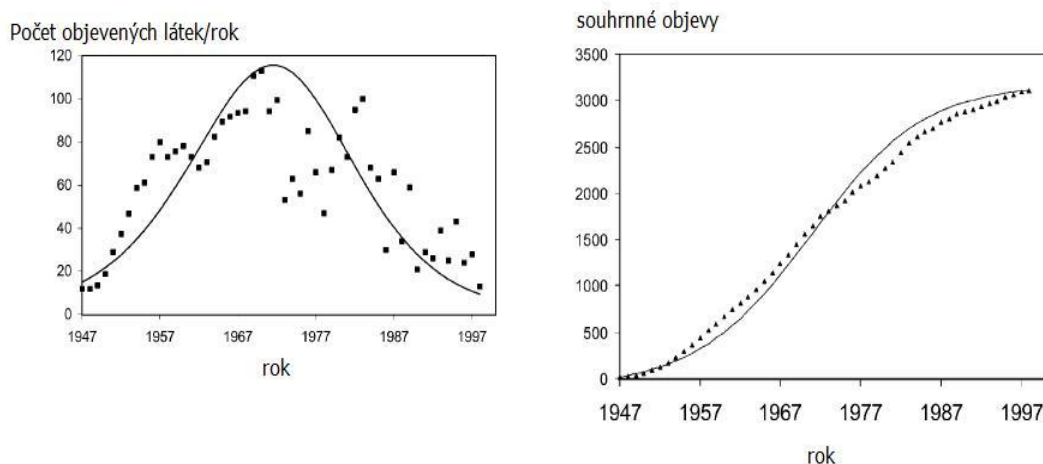
Spektrum účinku antibiotik již také nezahrnuje pouze bakterie a plísně. U některých antibiotik byly zjištěny protinádorové (doxorubicin, cyklosporin) a antivirové účinky, některá fungují jako enzymové inhibitory (statiny) (BERDY, 2005). Antibiotika mohou být buď širokospektrá nebo úzkospektrá. Mezi širokospektrá se řadí ta, která jsou účinná jako proti Gram-pozitivním tak proti Gram-negativním kmenům. Patří sem například sulfonamidy, cefalosporiny, karbapenemy, tetracykliny, chloramfenikol a trimetoprim. Výhodnější je využívat ale ta úzkospektrá, při jejichž použití se snižuje riziko rozvoje rezistence. Úzkospektrá antibiotika se dělí na účinné proti Gram-pozitivním a Gram-negativním kmenům. Do skupiny antibiotik proti Gram-pozitivním bakteriím patří peniciliny, makrolidy, linkosamidy, vankomycin, bacitracin. Proti Gram-negativním kmenům jsou potom účinné aminoglykosidy, fluorochinolony, monobaktamy, polymyxin B (LINCOVÁ et al., 2005).

Ze všech známých antibiotik (22500) je méně než 1% (okolo 150 látek) přímo užíváno v humánní a veterinární medicíně (BERDY, 2005).

Antibiotické látky představují jednu z nejdůležitějších skupin farmak, protože v celé řadě ohledů mají zvláštní postavení ve farmakoterapii. Pro svoji účinnost a

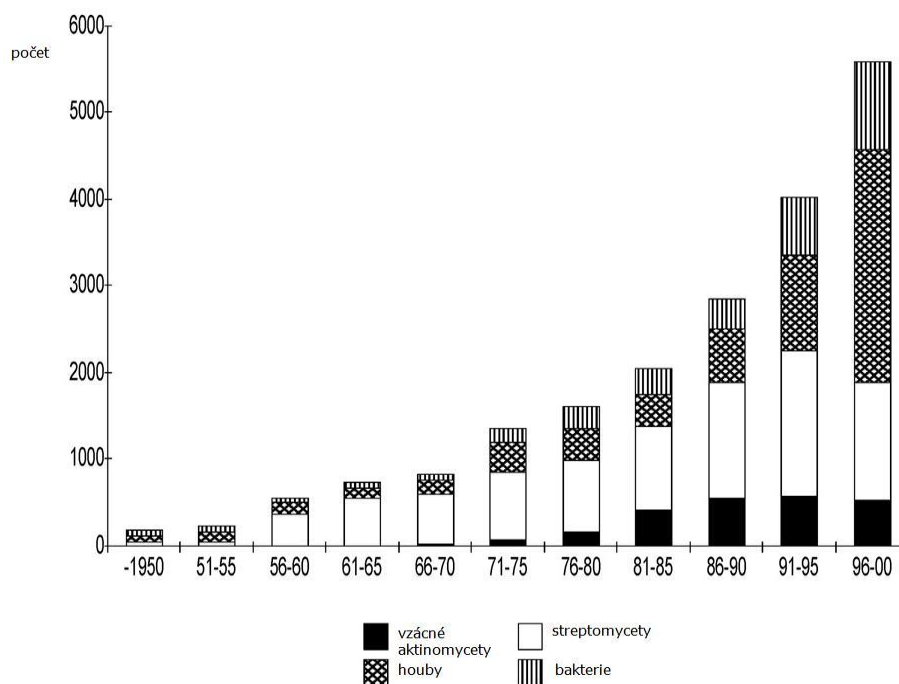
relativní neškodnost jsou často ordinovány, ale v mnoha případech zbytečně. Léčba antibiotiky je kauzální, a přesto jsou lékaři nuceni postupovat empiricky. Hlavně v důsledku nedostatku času pro testování na původce onemocnění. Mimořádný význam racionální léčby antibiotickými látkami spočívá hlavně v tom, že nesprávná léčba je nejenom neúčinná, ale dokonce škodlivá. Nadměrný selekční tlak přispívá k šíření rezistentních mikrobů, zároveň nákladná a přitom zbytečná léčba antibiotiky představuje plýtvání finančními zdroji (LINCOVÁ et al., 2005).

Z pohledu historie bylo nejvíce důležitých antibakteriálních látek (tetracykliny, cefalosporiny, aminoglykosidy, makrolidy) objeveno ve 40. a 50. letech. V 50. a 60. letech se vyřešily základní problémy s chemoterapií. Antibiotika objevená v této době byla především produkována rodem *Streptomyces*, a představovala asi 70 - 80% izolovaných látek. Jejich aktivita byla zaměřena především na bakterie a houby. V tomto období také začíná objevování protinádorových látek, antivirotik a enzymových inhibitorů. V následujících obdobích až do 90. let se význam výzkumu snižoval. Náklady na výzkum rostly, a přestože počet nově objevených látek neustále rostl, jednalo se hlavně o analogy již objevených látek. Nejvíce nově objevených látek produkovaly stále aktinomycety (65-70%), ale se zlepšujícími se izolačními technikami se začaly prosazovat „vzácné aktinomycety“ (30%) (BÉRDY, 2005). Podle rychlosti objevů nových látek byl připraven model, ve kterém je popsáno, že se sice nové látky neustále objevují, ale není jich tolik, jak jich bývalo v tzv. zlaté éře (70. léta) (viz obr. 2.1)



**Obr 2.1: Četnost nově objevených látek (WATVE et al., 2001)**

Převažující část známých bioaktivních mikrobiálních metabolitů (45%, což je více než 10 000) je izolováno z různých druhů aktinomycet, 34% ze *Streptomyces* a 11% ze vzácných aktinomycet (BÉRDY, 2005).



**Obr. 2.2: Distribuce objevených antibiotik podle původu (BÉRDY, 2005)**

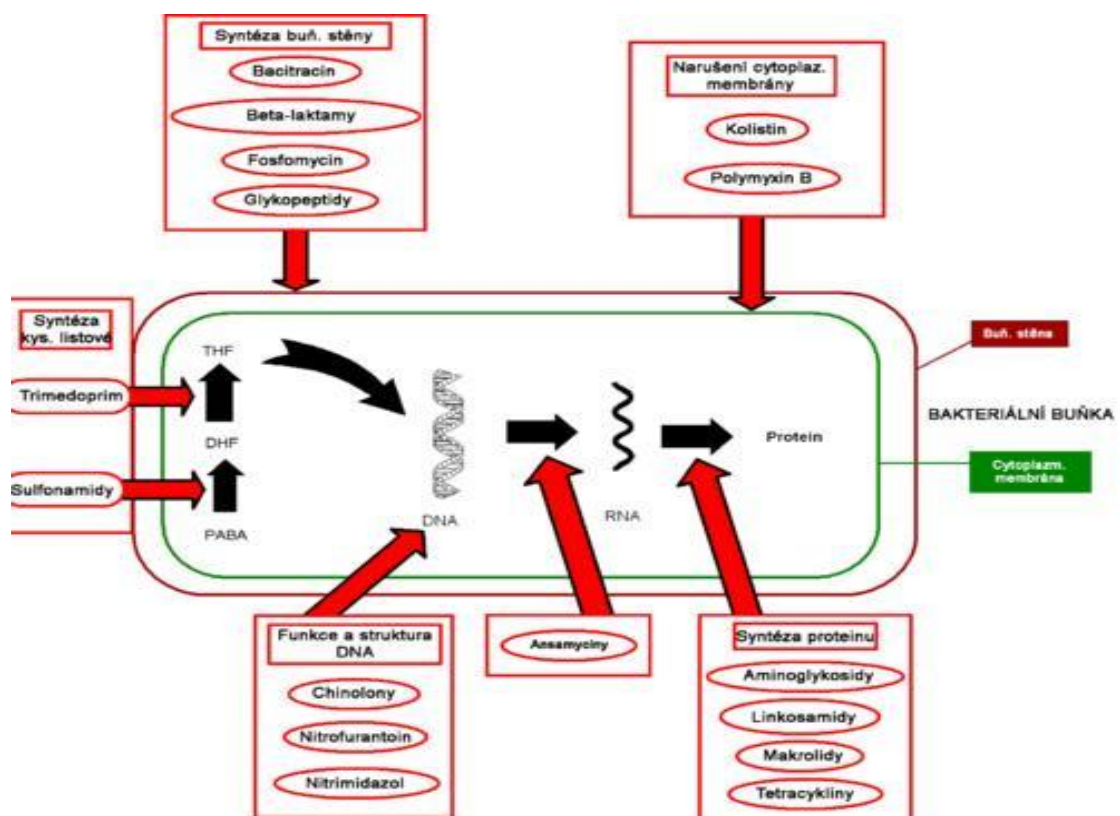
V posledních dvaceti letech došlo ke znepokojivému snížení rychlosti vývoje nových antibiotik (CHARLES a GRAYSON, 2004). Např. během let 1983-2002 poklesl počet nových antimikrobních agens povolených FDA (US Food and Drug Administration) o 56% a v letech 2004 - 2006 byla FDA povolena pouze 3 nová antimikrobní agens (MUKHOPADHYAY a PETERSON, 2006; <http://www.fda.gov/cder/rdmt/default.htm>). Tento pokles produktivity lze připsat na vrub jednak tomu, že mnohé velké farmaceutické firmy pod tlakem trhu ustoupily od výzkumu antibiotik a orientovaly se na vývoj léčiv s jinou indikací vykazující větší návratnost investic (CHARLES a GRAYSON, 2004; LUZHETSKYY et al., 2007), jednak i špatné volbě strategií při hledání nových antibiotik (BALZ, 2006). V posledních 10-20 letech byla v programech hledání nových antibiotik pro generování chemické diverzity např. patrná tendence upřednostňovat kombinatoriální chemii. Šíří

se ale názor, že kombinatoriální chemie nedokáže zastoupit jako primární zdroj chemické diverzity přírodní produkty, jejichž hlavní výhodou je často velmi složitá struktura a chirální povaha (LARSEN et al., 2005).

Mechanismus účinku antibiotika charakterizuje způsob zásahu antibiotika do syntézy makromolekul bakteriální buňky. Přes značnou variabilitu účinných látek lze počet zásahových míst, a tím i způsobů účinku antibiotik rozdělit jen do několika málo skupin:

1. **Inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny** je podkladem baktericidního účinku antibiotika. V důsledku vazby antibiotika na enzymy bakteriální buňky podílející se na syntéze stěny buňky se bakteriální buňka přestane dělit a hyne. ( *$\beta$ -laktámová antibiotika* se vážou na své receptory – enzymy penicillin-binding-proteins – a inhibují syntézu blokadou transpeptidačních reakcí konstituujících a zpevňujících peptidoglukan; *glykopeptidová antibiotika* interferují se syntézou stěny bakterií vazbou na prekurzor stěnového pentapeptidu; *bacitracin* inhibuje defosforylaci undecaprenylfosfátu)
2. **Porušení buněčné cytoplazmatické membrány** antibiotiky způsobuje ztrátu selektivní permeability a integrity buněk a tím jejich zánik. Účinek však není specifický a může být u člověka podkladem pro nefrotoxicitu. (*polyenová antibiotika* se vážou na steroly v membráně kvasinkových mikroorganismů, detergentním účinkem porušují cytoplazmatickou membránu a tím způsobí lýzu; *imidazoly* inhibují enzymy konečné fáze syntézy ergosterolu v membráně hub)
3. **Inhibice syntézy bílkovin** vzniká zásahem na různých místech ribozomu (*tetracykliny* se vážou reversibilně na receptor umístěný na podjednotce 30S a blokují vazbu aminoacyl-tRNA na akceptorové místo na komplexu mRNA s ribozomem; *aminoglykosidy* se ireversibilně vážou na 30S podjednotce; *chloramfenikol* se váže reversibilně na receptor umístěný na 50S podjednotce a blokuje působení peptidyltransferázy; *makrolidy* se vážou poblíž receptorového místa pro chloramfenikol na 50S podjednotce ribozomu; *linkosamidy* inhibují syntézu proteinů vazbou na 50S podjednotce ribozomu; *mupirocin* inhibuje syntézu bílkovin vazbou na bakteriální isoleucin-tRNA-syntetázu.

4. **Inhibice syntézy nukleových kyselin** může probíhat při replikaci DNA nebo transkripci (*chinolinová antibiotika* jsou inhibitory topoizomeráz – DNA-gyrázy a topoisomerázy IV; *rifampicin* inhibuje DNA-dependentní RNA-polymerázu bakterií)
5. **Inhibice metabolismu bakteriální buňky** je podkladem bakteriostatického účinku sulfonamidů, trimetoprimu nebo pyrimethaminu. Principem je zamezení tvorby bakteriální kyseliny listové (LINCOVÁ et al., 2005).



**Obr. 2.3: Schematický náčrt mechanismu účinku některých antibiotik** (PABA = paraaminobenzoová kyselina, DHF = dihydrolistová kyselina, THF = tetrahydrolistová kyselina); převzato z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum> a upraveno

Omezený počet míst zásahu antibiotik způsobuje poměrně snadný vznik rezistencí u původně citlivých mikrobů. Rezistence na antibiotika vzniká obecně několika mechanismy (tab. 2.1) (LINCOVÁ et al., 2005).

**Tab. 2.1: Mechanismus rezistence bakterií vůči antibiotikům**

Mechanismus rezistence	Příklady
Snížení intracelulární koncentrace antibiotika	
○ Snížení efluxu	Tetracykliny, chinolinová antibiotika
○ Snížení permeability zevní membrány	$\beta$ -laktámová, chinolonová antibiotika
○ Snížení transportu cytoplazmatickou membránou	Aminoglykosidy
Inaktivace antibiotika (reverzibilně nebo ireverzibilně)	$\beta$ -laktámová antibiotika, aminoglykosidy, chloramfenikol
Modifikace cílového místa	$\beta$ -laktámová, chinolonová antibiotika, makrolidy, glykopeptidy, rifampicin
Obchvat cílového místa	trimethoprim



### 2.1.1 Linkosamidy

Linkosamidy jsou antibiotika se zvláštní chemickou strukturou. Používají se nejčastěji jako alternativa v léčbě grampozitivních a anaerobních infekcí u nemocných s hypersenzitivitou na peniciliny. Starší linkomycin byl již téměř ve všech indikacích nahrazen novějším klindamycinem (LINCOVÁ et al., 2005). Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin, která vzniká vazbou linkosamidu na 50S podjednotku ribozomu (LINCOVÁ et al., 2005).

Antimikrobiální spektrum linkosamidů zahrnuje *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, koagulasa-negativní stafylokoky, streptokoky skupiny B, C, G, nesporulující anaerobní koky (*Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp.), anaerobní grampozitivní tyčinky (*Actinomyces* spp., *Propionibacterium acnes*, *Eubacterium* spp.) a gramnegativní tyčinky (*Bacteroides fragilis* a další, *Fusobacterium* spp.), *Clostridium perfringens*, *Pneumocystis carinii*, *Babesia* spp., *Plasmodium* spp. Rezistentní je pak *Clostridium difficile*, *Enterococcus* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. (LINCOVÁ et al., 2005).

Vznik rezistence je podmíněn modifikací ribozomů (fenotyp MLSb) a úzce souvisí se způsobem jejich klinického používání (LINCOVÁ et al., 2005).

Z pohledu farmakokinetiky se klindamycin výborně vstřebává i v přítomnosti potravy. Biologická dostupnost se uvádí až 90 %. Distribuční objem klindamycinu je relativně velký, vysoce se váže na plazmatické bílkoviny. V dostatečných koncentracích proniká do většiny biologických tekutin, proniká i do kostí, ale průnik do cerebrospinální tekutiny není dostatečný. Klindamycin se metabolizuje v játrech a vylučuje se ledvinami. Biologický poločas je asi 3 hodiny (LINCOVÁ et al., 2005).

Z farmakodynamického hlediska patří klindamycin mezi antibiotika s účinkem nezávislým na koncentraci. Cílem dávkování je dostatečně dlouhé udržování účinných koncentrací nad minimálními inhibičními koncentracemi citlivých patogenů alespoň po dobu 50 % dávkovacího intervalu (LINCOVÁ et al., 2005).

Pokud jsou použity obvyklé dávky, a to jak u linkomycinu tak u klindamycinu, je dosaženo bakteriostatické aktivity. Při vyšších koncentracích, kterých je ještě možné dosáhnout *in vivo*, může být jejich účinek i baktericidní (viz. tab. 2.2). Nástup

baktericidního účinku je pomalejší a méně kompletní než například u  $\beta$ -laktamových antibiotik. Účinek se zvyšuje souběžně s rostoucí koncentrací antibiotik, a dokonce v tomto ohledu je klindamycin účinnější. Na druhé straně, hlavní výhodou linkomycinu je, že jej lze aplikovat v podstatně širším koncentračním rozmezí léčebné dávky. Makrolidy a linkosamidy jsou první volbou bakteriostatických antibiotik používaných ve veterinární dermatologii. Hlavní antibiotika této třídy jsou erytromycin, linkomycin, klindamycin a tylosin. Jsou dobře absorbovány, pokud jsou podávány ústy, stejně jako jsou schopny proniknout i do infikované rány. Jejich spektrum účinku zahrnuje bakterie běžně spojené s kožní infekcí, včetně stafylokoků. Jejich hlavní nevýhodou je, že rychlý rozvoj rezistence bakterií a příležitostné gastrointestinální obtíže omezují jejich užití v praxi (SPÍŽEK a ŘEZANKA, 2004).

**Tab. 2.2: Účinné dávky linkomycinu a klindamycinu na některé běžné patogenní bakterie (SPÍŽEK a ŘEZANKA, 2004)**

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Linkomycin	Klindamycin
Gram-pozitivní	citlivost	citlivost
<i>Bacillus anthracis</i>	0.25–8.0	0.25–5.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2–3.2	0.04–1.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.4–1.8	0.1–0.2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.1–0.2	0.02–0.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.01–0.8	0.002–0.1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.04–0.8	0.01–0.2
<i>Streptococcus viridans</i>	0.02–1.0	0.005–0.2
Gram-negativní	běžně rezistentní	běžně rezistentní
<i>Escherichia coli</i>	1000	64
<i>Haemophilus influenzae</i>	4–16	0.5–16.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	125
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	8–64	0.5–4.0
<i>Neisseria meningitis</i>	>32	4
<i>Proteus vulgaris</i>	1000	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1000	1000
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	125	64

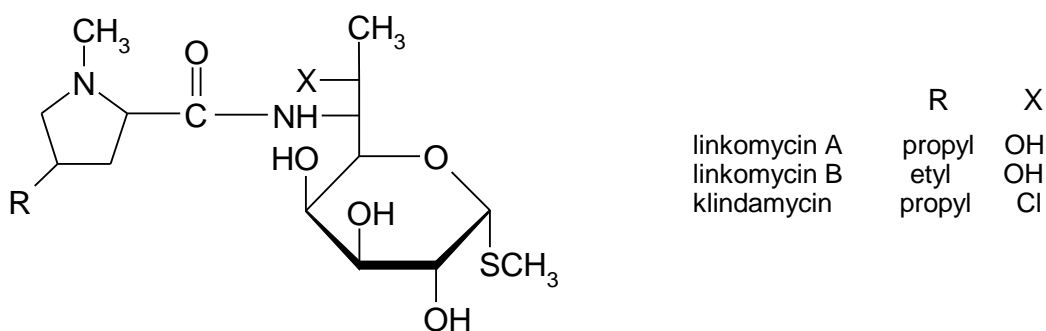
Klindamycin není nikde indikován jako antibiotikum první volby nebo jako preferenční v empirické terapii, ale je to důležité antibiotikum další volby v celé řadě situací v nemocniční i ambulantní praxi.

Nejčastější klinické indikace klindamycinu:

- Infekce pánevní a nitrobřišní infekce (peritonitida, absces, septický abort) s předpokládanou účastí anaerobů, zejména *Bacteroides fragilis*
- Osteomyelitida způsobená *Staphylococcus aureus*
- Diabetická osteomyelitida
- Infekce diabetické nohy (v kombinaci s antibiotiky proti aerobním gramnegativním tyčkám)
- Infekce způsobené invazivními kmeny *Streptococcus pyogenes* (nekrotizující fasciitida, myozitida, toxický šok, bakteriémie)
- Těžká stafylokoková a streptokoková celulitida
- Sinusitida, chronická otitida a sinusitida
- Posttraumatická endoftalmitida způsobená *Bacillus cereus*
- Těžké orofaciální infekce včetně retrofaryngeálního abscesu
- Acne vulgaris

### 2.1.1.1 Linkomycin

Linkomycin, první ze dvou linkosamidových antibiotik, byl izolován v roce 1962 z půdy v blízkosti města Lincoln (Nebraska), podle něho také nese název. Druh, ze kterého bylo antibiotikum izolováno, byl klasifikován jako *Streptomyces lincolnensis* var. *Lincolnensis*. Linkomycin má dobré vlastnosti *in vitro* a *in vivo* proti různým gram-pozitivním mikroorganismům. Nevykazuje zatím zkřížené rezistence se známými antibiotiky a má nízký stupeň toxicity. Linkomycin získal klinické uznání jako hlavní antibiotikum pro léčbu chorob způsobených gram-pozitivními mikroby (SPÍŽEK et al., 2004). Linkomycin se skládá z cukerné a aminokyselinové složky spojené peptidovou vazbou. Cukernou složku představuje metyl-6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erytro- $\alpha$ -D-galaktooktopyranóza (methylthiolinkosamid, MTL) a aminokyselinovou složku trans-N-methyl-4-n-propyl-L-prolin (propylprolin, PPL) (SPÍŽEK et al., 2004) (viz obr. 2.4).



**Obr. 2.4: Struktura linkomycinu a klindamycinu**

#### 2.1.1.1.1 Biosyntéza linkomycinu

##### 2.1.1.1.1.1 Biosyntéza aminokyselinové složky propylprolinu (PPL)

Aminokyselinová podjednotka propylprolin obsahuje devět atomů uhlíku. Sedm z nich má původ v aminokyselině L-tyrosinu, což prokázaly pokusy s radioaktivně značeným L-[U-<sup>14</sup>C]tyrosinem (WITZ et al. 1971). Kombinací metody dvojího značení

a hmotnostní spektroskopie bylo dále zjištěno, že zbylé dva atomy uhlíku (N-metyl a koncový metyl postranního řetězce) mají svůj původ v metylových skupinách S-adenosylmethioninu (ARGOUDELIS et al. 1969).

L-tyrosin je přeměňován na L-DOPA, pak následuje 3,4-intradiolové štěpení a následná metylace (BRAHME et al. 1984). Podobná přeměna tyrosinu přes DOPA byla popsána i v biosyntéze antibiotik antramycinu, tomaymycinu a sibiromycinu (HURLEY et al., 1979; HURLEY, 1980) (viz obr. 2.5).

V závěrečných krocích biosyntézy PPL v *S. lincolnensis* se uplatňuje redoxní kofaktor, zvaný linkomycinový kosyntetický faktor (LCF; COATS et al., 1989; KUO et al., 1989, 1992). Tato látka, jejíž chemická struktura byla pomocí metody nukleární magnetické rezonance určena jako 7,8-didemetyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, je známa i v sekundárním metabolismu jiných streptomycet (např. biosyntéza tetracyklinu u *Streptomyces aureofaciens*; MCCORMICK a MORTON, 1982).

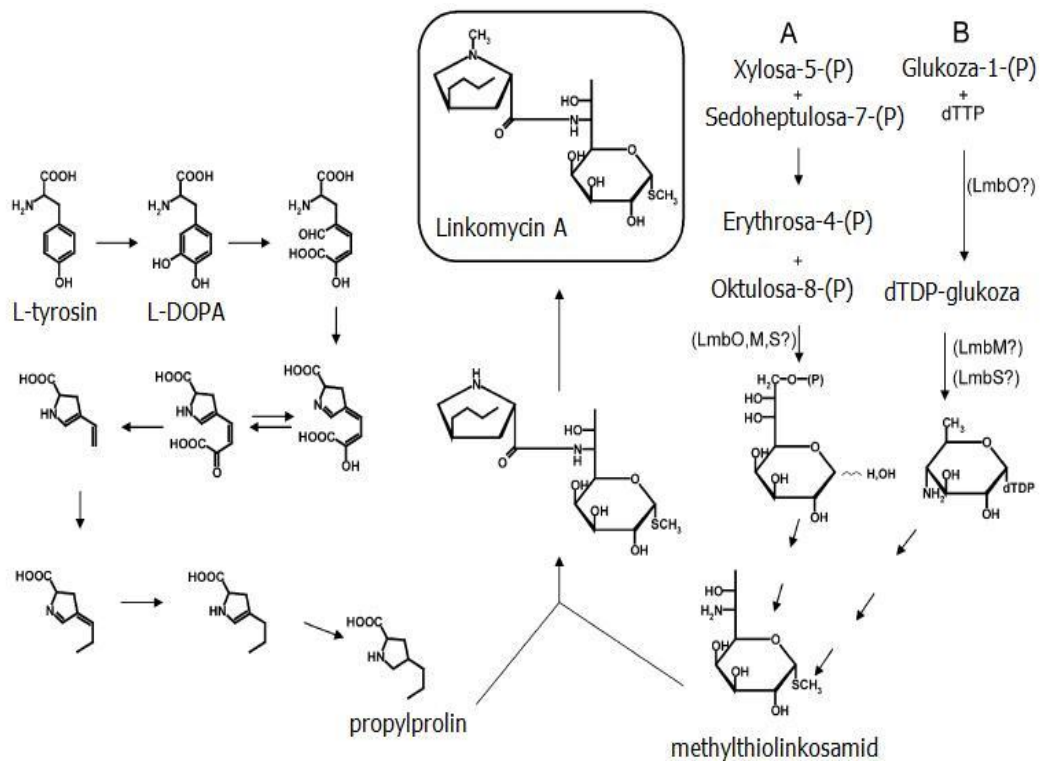
#### 2.1.1.1.2 Biosyntéza cukerné složky metylthiolinkosamidu (MTL)

BRAHME et al. (1984) použili pro studium biosyntézy MTL radioaktivní  $^{13}\text{C}$  zabudovaný do prekurzoru D- $^{13}\text{C}_6$ -glukózy. Takto upravená glukóza byla přidávána do reakce a byla měřena aktivita izotopu  $^{13}\text{C}$ . Dle jejich hypotézy vznikl osmiuhlíkatý MTL kondenzací pentózy a triózy. Pentózová jednotka pravděpodobně pochází buď z glukózy, nebo vznikla kondenzací glycerinaldehyd-3-fosfátu s  $\text{C}_2$  jednotkou z  $\text{C}_2$  donoru, kterým může být např. sedoheptulóza-7-fosfát. Donorem triózy může být také sedoheptulóza-7-fosfát. Následně dochází k izomerizaci oktulózy na októzu, defosforylace a redukce na uhlíku  $\text{C}_8$ . Dále dochází k transaminaci prekurzoru 6-ketooktózy. Biosyntézu ukončuje závěrečný krok thiometylace na  $\text{C}_1$  (BRAHME et al. 1984) (viz obr. 2.5 – cesta A).

Druhý a novější popis biosyntézy je následující: Dochází ke vzniku dTDP-aktivované glukózy, která je následně konvertovaná na dTDP-deoxyamino intermediát, z něhož glykosylací vzniká osmiuhlíkatá cukerná složka (PESCHKE et al., 1995). S-metylová skupina na  $\text{C}_1$  pochází z S-adenosylmethioninu (CHUNG et al., 1997). (viz obr. 2.5 – cesta B)

### 2.1.1.1.3 Kondenzace PPL a MTL

Předposledním krokem biosyntézy linkomycinu je tvorba peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou propylprolinu a aminoskupinou metylthiolinkosamidu. Vytvoření vazby katalyzuje ATP-dependentní na ribozomu nezávislá N-demetyllinkomycinsyntetáza (ARGOUEDELIS et al., 1965, CHUNG et al., 1997). N-demetyllinkomycinsyntetáza vyžaduje ATP a  $Mg^{2+}$  ionty a je teplotně labilní. Optimální podmínky pro kondenzační reakci byly stanoveny na pH 8,0 a teplotu 30 °C. Aktivita enzymu se po purifikaci na chromatografické koloně ztrácí, ale po spojení určitých frakcí se znovu objevuje (CHUNG et al., 1997). Očekává se proto, že se jedná o enzymový komplex několika disociovatelných neidentických podjednotek.



**Obr. 2.5: Biosyntetická dráha pro linkomycin A (převzato ze SPÍŽEK et al., 2004)**

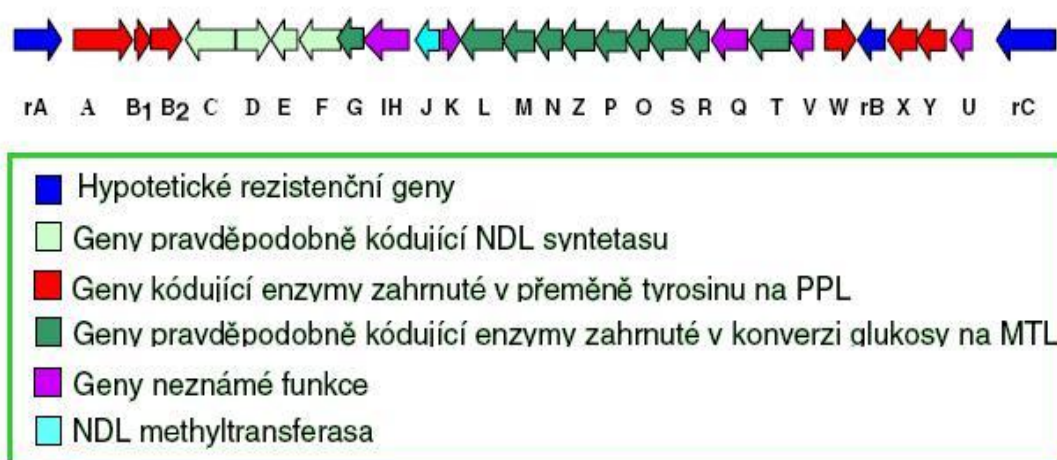
### 2.1.1.1.2 Geny kódující biosyntézu linkomycinu

Stejně jako u jiných antibiotik produkovaných aktinomycetami geny kódující linkomycin potřebné pro biosyntézu jsou seskupené do jediné oblasti genomu a úzce spojeny s geny odpovědnými za rezistenci.

Podobně jako biosyntetické geny řady jiných antibiotik jsou geny řídící biosyntézu linkomycinu uspořádány ve shluku společně s geny rezistenčními. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu je lokalizován chromozomálně, jeho délka je *cca* 35 kb a je v něm sdruženo 29 otevřených čtecích rámců (viz obr. 2.6), jež jsou pravděpodobně organizovány v dvanácti transkripčních jednotkách (PESCHKE et al., 1995; JANATA et al., 2001).

Úplná sekvence linkomycinového shluku průmyslového nadprodukčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 je známa (PESCHKE et al., 1995) již od roku 1995, funkce však byly experimentálně přiřazeny jen nemnohým čtecím rámcům; funkce ostatních jsou doposud pouze dedukovány na základě podobnosti jejich sekvence. V rámci shluku jsou sdruženy tři geny kódující rezistenci k linkomycinu (dále jen *lmr* geny). Gen *lmrA* kóduje pravděpodobně integrální membránový protein (protogradient-dependentní exportér) účastnící se transportu linkomycinu z buňky (ZHANG et al., 1992; PESCHKE et al., 1995). Gen *lmrB* vykazuje (na úrovni proteinového produktu) podobnost s 23S rRNA metyltransferázami a zajišťuje tedy rezistenci k linkomycinu nejspíše formou modifikace (metylace) zásahového místa (ZHANG et al., 1992). Poslední z trojice rezistenčních genů, *lmrC*, vykazuje (na úrovni proteinového produktu) podobnost s ABC transportéry a pravděpodobně tedy kóduje další protein s transportní funkcí (PESCHKE et al., 1995). Kromě rezistenčních genů obsahuje shluk 26 dalších genů (dále jen *lmb* geny), u nichž je předpokládána funkce biosyntetická či regulační. Zvláštní postavení v rámci této skupiny genů zaujímají geny tvořící tzv. cukerný shluk. Jsou to geny označované jako *lmbQRSOPZNML* (PESCHKE et al., 1995). Homology těchto genů lze nalézt v tzv. „cukerných shlucích“, které kódují enzymy biosyntézy deoxy(amino)cukrů, začleňovaných mikroorganismy do antibiotik. Typickými enzymovými aktivitami, které jsou kódovány geny sdruženými v takových „cukerných shlucích“, jsou dehydratasy, isomerasy, aminotransferasy, metyltransferázy a glykosyltransferasy (NEDAL a ZOTCHEV, 2004).

Předpokládané proteiny LmbO, LmbM a LmbS vykazují podobnost s enzymy, podílející se na centrálních pochodech mnohých NDP-6-deoxyhexóz (STOCKMANN a PIEPERSBERG), včetně syntázy NDP-hexózy (LmbO), dehydratázy NDP-hexózy (LmbM) a (NDP-) aminotransferázy keto-sacharidu (LmbS). Genetický záznam vedl PESCHKE et al. (1995) k závěru, že methylthiolinkosamidová biosyntéza pravděpodobně potřebuje pro zahájení aktivační energii (pravděpodobně dTDP) a dále sérii modifikací pro dNTP-aktivované cukerné meziproducty.



**Obr. 2.6:** Schéma genového shluku pro biosyntézu linkomycinu (PESCHKE et al. 1995)

Předpokládá se, že geny kódující enzymy podílející se na syntéze propylprolinu se nachází v blízkosti *lmrA* genu, zatímco geny kontrolující syntézu methylthiolinkosamidu se nachází dále od ní. Biosyntetické geny se zdají být organizovány podle funkčních drah v oblasti genového shluku, ale stejné pokusy naznačují, že geny kódující podjednotky NDL-syntetázy, klíčového enzymu katalyzujícího kondenzaci propylprolinu a methylthiolinkosamidu, jsou umístěny na třech oddělených místech (CHUNG et al., 1997).



## 2.2 Rezistence

Rezistence vůči známým antibiotikům začíná být vážným problémem a je třeba počítat s jejím omezujícím vlivem. Problematika antibiotické rezistence získala pozornost kvůli vzniku a rozšíření rezistentních patogenních bakterií. Rezistence bakteriálních klonů se potom šíří mechanismy, které jsou založené na změnách cílových molekul v důsledku mutací. Ve většině vzniklých rezistencí se jedná o případy rezistence získané přes laterální přenos genů z jiných ekologicky a taxonomicky vzdálených bakterií. Zřejmým evolučním faktorem, který přispívá k šíření antibiotické rezistence genů, je výroba a spotřeba antibiotik nejen pro účely léčení, ale i prevence nebo jako přídavek do krmiv pro zvířata, jejichž produkty jsou využívány jako potraviny (AMINOV et al., 2007).

Horizontální genový přenos je významným procesem v životě bakterií i archebakterií rozšiřujícím jejich adaptabilitu. Je ale také důvodem, jak mohou patogenní bakterie získávat rezistenci k antibiotikům. Význam nabyl po roce 1950, kdy se začala objevovat rezistence k určitým antibiotikům. Rozeznáváme tři základní mechanismy horizontálního přenosu rezistence:

- transformace - příjem DNA z okolního prostředí
- konjugace - výměna DNA mezi bakteriemi pomocí speciálních struktur, tzv. pilusů
- transdukce - výměna DNA pomocí virů, které ji mezi jednotlivými jedinci přenášejí (OCHMAN et al., 2000).

Minulé horizontální přenosy genů mezi taxonomicky vzdálenými bakteriemi je těžké reprodukovat experimentálně, protože není známo, která bakterie a jaké genetické mechanismy byly zapojeny, jaké byly podmínky životního prostředí v době přenosu, a jednoduše proto, že přenosová frekvence může být příliš nízká, aby mohla být uskutečněna v laboratorním měřítku (AMINOV et al., 2007).

Existuje předpoklad, že pokud buňka obsahuje gen antibiotické rezistence, zvyšují se její nároky na metabolismus (KERR, 1999), a proto tento tlak selektuje bakterie nesoucí rezistenční geny. Resistenční geny by tedy měly být eliminovány samotnou buňkou, ale ukazuje se, že jednou získané rezistenční geny, i přestane-li selekční tlak působit, nejsou z populace bakterií eliminovány tak rychle, jak se původně očekávalo. Šíření antibiotické rezistence se stává samoudržovacím procesem, který

nahrazuje citlivý genotyp i při absenci selektivního tlaku. Zlepšení přenosu antibiotické rezistence může být jedním z důvodů, proč geny rezistence vůči antibiotikům jsou perzistentní i při zjevné absenci antibiotika, například u volně žijících zvířat. Naproti tomu v oblastech s historicky nízkou úrovní používání antibiotik v zemědělství, je frekvence genu antibiotické rezistence také velmi nízká (AMINOV et al., 2007). S rezistencemi přenášenými mezi klinickými kmeny se pravděpodobně nemísí velmi rozmanitý výběr rezistenčních genů, např. i vůči linkomycinu a příbuzným antibiotikům (ČERMÁK et al., 2008), udržovaných v přírodním prostředí a pocházejících nejspíše z producentů (AMINOV et al., 2007).

## 2.2.1 Rezistence na linkomycin a klindamycin

Hlavním typem rezistence na klindamycin a linkomycin je tzv. MLSb rezistence, společná pro makrolidy, linkosamidy a streptogramin B. Tento typ rezistence je spojen s geny kódující metyltransferázy, které modifikují společná cílová místa na ribozomu (SPÍŽEK et al., 2004).

Linkomycinová rezistence v klinických izolátech stafylokoků a streptokoků se vyskytuje po několik desetiletí. Tato rezistence je zprostředkována plasmidem a je kódována v transpozónech. Rezistence často není konstitutivní a účinnost indukce se liší druh od druhu. Ve většině gram-pozitivních druhů je erytromycin více efektivní induktor rezistence než klindamycin. Plasmidy mohou zprostředkovat linkomycinovou rezistenci jak u streptokoků tak stafylokoků, které jsou strukturálně velmi podobné (SPÍŽEK et al., 2004).

### 2.2.1.1 Mechanismus rezistence k linkomycinu

Dosud byly popsány tři mechanismy rezistence k linkosamidům:

- 1) Modifikace cílového místa. Jedná se o tzv. MLSb rezistenci, kterou linkosamidy sdílejí s makrolidy a streptograminem B a která spočívá v metylaci N6 specifického adeninového zbytku (A2058; číslování dle *E. coli*) molekuly 23S rRNA metyltransferázami dvou typů. Monometyltransferázami, jejichž příkladem je *lmrA*, kódovaná genem linkomycinového biosyntetického shluku *S. lincolnensis* (PESCHKE et al., 1995) a dimetyltransferázami, jejichž příkladem je *erm(C)* stafylokoků (SHIVAKUMAR a DUBNAU, 1981). Zatímco monometylace zmíněného adeninového zbytku zajišťuje rezistenci k vysokým (>1000 µg/ml) koncentracím linkosamidů a nižším (>50-200 µg/ml) koncentracím erythromycinu, tylosinu a karbomycinu, dimetylace udělí rezistenci k vysokým (>1000 µg/ml) koncentracím všech pěti antibiotik (CALCUTT a CUNDLIFFE, 1990; BURIANKOVA et al., 2004).
- 2) Modifikace antibiotika samotného. Jedná se o inaktivaci antibiotika fosforylací nebo nukleotidylací jeho hydroxylové skupiny v poloze 3, která byla detekována u některých druhů streptomycet (ARGOUDELIS et al., 1977; MARSHALL et al., 1989). Nukleotidyltransferasy linkosamidů, kódované *lnu* geny (dříve *lin*)

byly popsány u grampozitivních i gramnegativních mikroorganismů (HEIR et al., 2004; ACHARD et al., 2005) a katalyzují adenylaci linkosamidů.

- 3) Aktivní eflux antibiotika. Jedná se o aktivní odstranění antibiotika z buňky, které zprostředkovávají proteiny příslušející k dvěma nadrodinám: K nadrodině MFS (major facilitator superfamily) transportních proteinů, které pro export látek využívají protonový gradient, patří proteinový produkt genu *lmrA* (ZHANG et al., 1992), který je součástí linkomycinového biosyntetického shluku producenta linkomycinu *S. lincolnensis*. K nadrodině ABC (ATP binding cassette) transportérů, které získávají energii pro transport hydrolyzou ATP, je řazen proteinový produkt genu linkomycinového biosyntetického shluku *lmrC* (PESCHKE et al., 1995). U klinických izolátů byly popsány i další členové rodiny ABC transportérů zprostředkovávající aktivní eflux linkosamidů. Jako příklad může sloužit *vgaALC*, který zprostředkovává aktivní eflux streptograminu A a linkosamidů u *Staphylococcus haemolyticus* (NOVOTNA a JANATA, 2006).

## 2.3 Rod *Streptomyces*

Streptomycety odvozující svůj název z latinského streptos = vláknitý, myces = houby, jedná se o relativně velký rod gram-pozitivních bakterií zahrnující přes 370 druhů (Bergey's manual of systematic bacteriology, 2001). Jsou to převážně saprofyty a striktní aerobové obývající půdní ekosystémy. Jako takoví produkují extracelulární enzymy hydrolyzující některé organické polymery (např. škrob, celulózu, lignin a chitin) na jednodušší rozpustné látky a ty poté přijímají. Streptomycety jsou vláknité půdní bakterie vytvářející mycelium z vícebuněčných hyf. Růst probíhá prodlužováním hyf v terminálních částech nebo větvením (NEZBEDOVÁ, 2002).

Rod *Streptomyces* je definován na základě fenotypových a genotypových znaků. Nejvýznamnějším nástrojem taxonomie streptomycet se nyní vedle původní analýzy složení buněčné stěny a profilů mastných kyselin, stala sekvenční analýza 16S rRNA (WILLIAMS et al., 1989; WELLINGTON et al., 1992; KIESER, 2000; ANDERSON a WELLINGTON, 2001). Právě touto metodou se podařilo prokázat, že aktinomycety, ačkoli mají složitou morfologii a komplikovaný životní cyklus, nejsou skupinou oddělenou od ostatních bakterií, ale jsou fylogeneticky příbuzné gram-pozitivním tyčinkám a kokům (*Micrococcus*, *Arthrobacter*) (Atlas of actinomycetes, 1997). Dnes je rod *Streptomyces* taxonomicky řazen (Bergey's manual of systematic bacteriology, 2001) do:

- říše: *Bacteria*
- kmene: *Actinobacteria*
- třídy: *Actinobacteria*
- podtřídy: *Actinobacteridae*
- řádu: *Actinomycetales*
- podřádu: *Streptomycineae*
- čeledi: *Streptomycetaceae*

Fylogeneticky jsou streptomycety součástí aktinobakterií, mají DNA bohatou na nukleotidy G a C. Mezi běžně se vyskytujícími aktinobakteriemi se obsah G+C pohybuje od 54% v některých korynebakteriích do více než 70% v rodě *Streptomyces*. (CHATER a CHANDRA, 2006) Zástupci rodu *Streptomyces* obsahují 69-78% G+C párů v DNA a od jiných aktinomycet je lze odlišit typem buněčné stěny. Ta obsahuje kyselinu L,L-diaminopimelovou a glycin, neobsahuje některé charakteristické cukry

(arabinosu, galaktosu nebo xylosu) a acyl jejich muramylových zbytků je acetyl (ANDERSON a WELLINGTON, 2001; SEDLÁČEK, 2007).

Dalším pozoruhodným rysem chromozomů *Streptomyces* je jejich linearita, což je struktura, jejíž popis nevyplývá ani z rozsáhlého mapování genetických spojení *S. coelicolor*. Linearita byla prokázána u několika různých myceliálních aktinobakterií, včetně druhů *Saccharopolyspora*, *Actinoplanes*, *Micromonospora* a *Nocardia*, ale nebylo prokázáno, že je spojena s myceliovým růstem (VENTURA et al., 2007).

Streptomycety produkují více než 10 000 známých bioaktivních látek, ale jejich taxonomie je komplikovaná. Je to především proto, že různorodost morfologických, kulturních, fyziologických a biochemických vlastností je pozorována jak na vnitrodruhové tak mezidruhové úrovni (ANDERSON a WELLINGTON, 2001).

Geny související s primárním metabolismem jsou udržovány v rámci všech stanovovaných bakteriálních genomů, i když jejich funkce zůstávají někdy neobjasněny. Naopak některé geny nebo seskupení genů jsou vysoce specifické pro konkrétní taxony a žádné analogy nenalezneme u blízkých příbuzných druhů, někdy dokonce ani v jiných kmenech téhož taxonu. Tyto speciální části genomů upravují další vlastnosti organismu, např. patogenitu, biosyntézu sekundárních metabolitů nebo samotné antibiotické rezistence. Geny biosyntetických drah sekundárních metabolitů spolu s geny rezistence obvykle tvoří genové shluky (SPÍŽEK et al., 1998). Organizace shluku usnadňuje horizontální přenos mezi fylogeneticky nezávislými skupinami mikroorganismů. Horizontální přenos může vysvětlit velmi neobvyklé, odlišné a někdy dokonce i jedinečné charakteristiky sekundárních metabolitů v porovnání s primárními. Vzhledem k tomu, že sekvenování DNA bakteriálního genomu může přinést úplný nebo téměř kompletní soubor společných genů zapojených do primárního metabolismu, genofond související se sekundárními metabolity není snadné získat, protože geny jsou rozděleny mezi různé taxony organismů. Producenti sekundárních metabolitů jsou rozšířeni v přírodě podle odlišných pravidel než neproducenti, a proto představují jiný pohled na bakteriální rozmanitost.

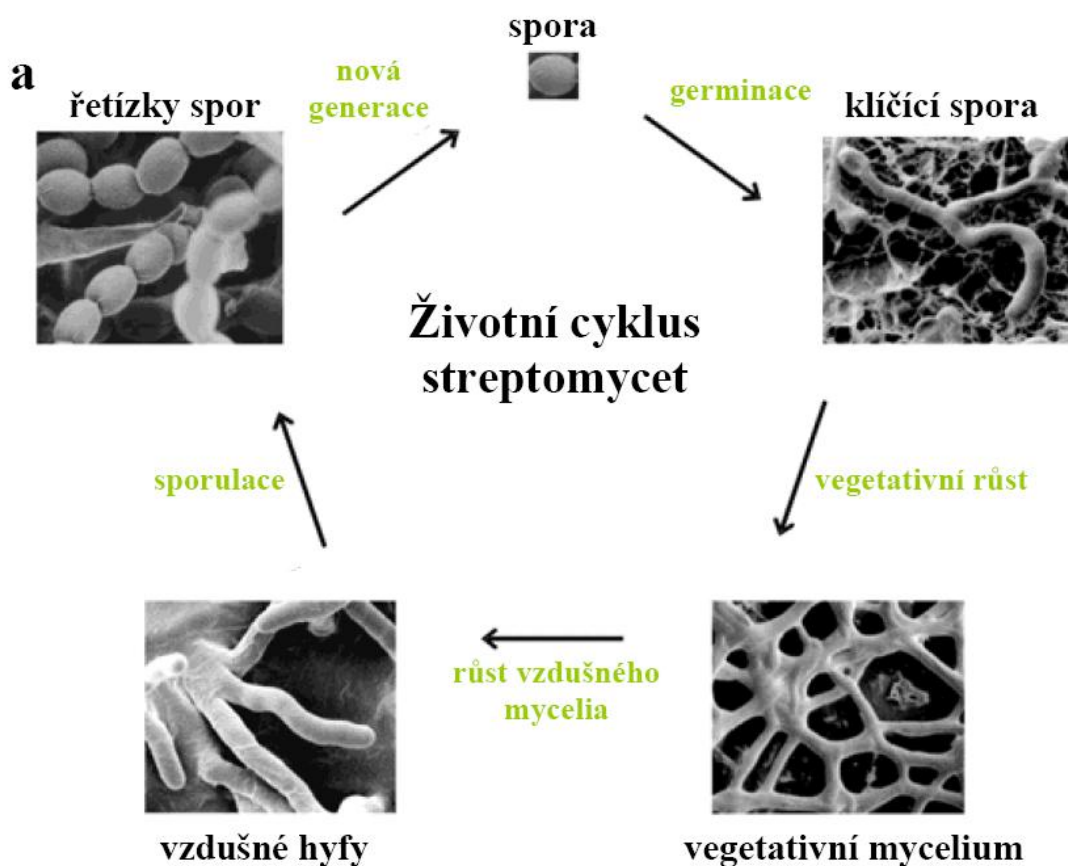
Aktinomycety jsou známé pro jejich biotechnologické vlastnosti a až do nedávné doby se vědecká pozornost zaobírala pouze jejich sekundárními metabolity, které se používají jako léky v humánní i ve veterinární medicíně. Teprve nedávno se zjistilo, že

rozmanitost je mnohem širší, než byly první odhady. Aktinomycety byly nalezeny v mořském prostředí ve spojení s vodními makrofyty, v podzemní vrstvě půd a půdě v různých prostředích, jako jsou tropický deštný les, kyselé a alkalické půdy nebo písečné duny. Tyto studie se často provádí pouze pomocí kultivačních metod, takže velká část informací o rozmanitosti a počtu aktinomycet, ale i jejich funkci v přírodním prostředí stále chybí.

### 2.3.1 Vývojový cyklus streptomycet

Streptomycety mají relativně složitý životní cyklus, na kterém se podílí velký počet genů. Tento fakt koreluje se skutečností, že mají jeden z největších genomů mezi bakteriemi - 8.6 Mb u *Streptomyces coelicolor* (*E. coli* má 4.6 Mb) (NEZBEDOVÁ, 2002). Vývojový cyklus streptomycet, nejlépe prostudovaný u modelového organismu *S. coelicolor*, začíná na pevné půdě klíčením spor, které dávají vznik spleti dlouhých větvených vláken nazývaných vegetativní mycelium. Vegetativní hyfy jsou multinukleoidální syncytia, jen nepravidelně rozdělená často neúplnými přepážkami (WILDERMUTH, 1970). Po vytvoření vegetativního mycelia se přechodně snižuje akumulace biomasy. Zároveň dochází k lýze některých kompartmentů vegetativního mycelia, v hyfách na povrchu kolonie se ukládají zásobní látky, zvyšuje se produkce vybraných extracelulárních proteinů a začíná syntéza sekundárních metabolitů i tvorba nevětveného vzdušného mycelia. Vzdušné hyfy mají hydrofobní povrch a vykazují typický spirálový způsob růstu (KIESER, 2000; VAN WEZEL a VIJGENBOOM, 2004). Vzdušné hyfy se nakonec mění na řetízky spor nesoucích jedinou kopii chromozomu (viz obr. 2.7). Spory jsou uloženy v tenké pochvě a v jednom řetízku jich bývá 5 až 50. Jsou často pigmentované u některých druhů hladké u jiných chlupaté či s ostrými výběžky. Kromě stádia spory mají tedy tyto bakterie mnohobuněčný životní cyklus (NEZBEDOVÁ, 2002).





**Obr. 2.7: Životní cyklus streptomycet na pevné půdě.** Převzato z

[http://opennetware.org/wiki/Streptomyces:Other\\_Bits/An\\_Introduction\\_to\\_Streptomyces](http://opennetware.org/wiki/Streptomyces:Other_Bits/An_Introduction_to_Streptomyces)

Pokud hyfy nepřijímají dostatek potravy z půdy, dojde ke dvěma jevům: produkci antibiotik nebo jiných sekundárních metabolitů a formaci reprodukčních hyf, které částečně parazitují na myceliu. Spory viditelně nevykazují odolnost vůči teplotě, ale dobře přežívají v suchých podmínkách a pravděpodobně usnadňují rozptýlení větrem, vodou nebo prostřednictvím zvířat (CHATER a CHANDRA, 2006).

Životní cyklus začíná klíčením spory v tzv. substrátové mycelium, což jsou uvnitř nedělená vlákna prorůstající směrem do substrátu a na povrchu substrátu. Po určité době začne ze substrátového mycelia vyrůstat směrem nad substrát tzv. vzdušné mycelium, které se později diferencuje v řetízky nepohlavních spor. Za vhodných podmínek se spory z řetízků uvolňují a cyklus se uzavírá. V pozdních fázích růstu vzdušného mycelia ještě před sporulací dochází k produkci antibiotik (NEZBEDOVÁ, 2002).

### 2.3.2 Sekundární metabolity streptomycet

Geny pro produkci jednotlivých sekundárních metabolitů jsou, až na výjimky (BIBB, 2005), uspořádány ve shlucích (HOPWOOD et al., 1995), jejichž velikost se pohybuje od několika málo do více než 100 kb (BENTLEY et al., 2002). Geny kódující biosyntetické enzymy jsou ve shlucích doprovázeny geny pro rezistenci k produkovanému antibiotiku a někdy také geny regulačními, tzv. druhově specifickými regulátory. Tyto genové shluky, označované jako ostrůvky sekundárního metabolismu (secondary metabolic islands, SMILE) (THOMPSON et al., 2002), jsou obvykle lokalizovány na chromozomu, jsou koregulované a funkční v heterologních druzích. SMILE byly pravděpodobně získány horizontálním přenosem.

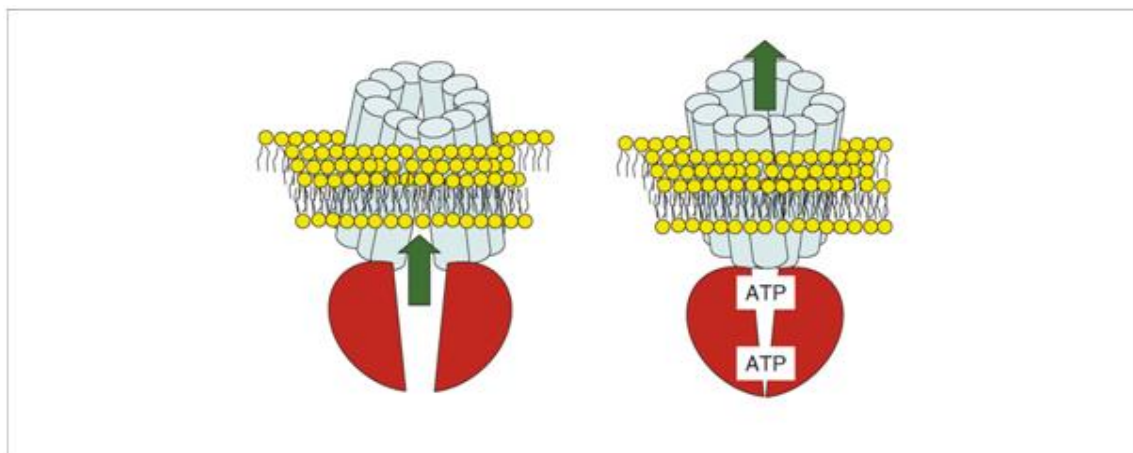
Charakteristickými rysy regulace sekundárního metabolismu streptomycet jsou pestrost a komplikovanost. Sekundární metabolity udělují adaptivní výhody, jejichž podstata není zatím popsána. Antibiotická aktivita nemusí být totiž primární funkcí těchto látek v přírodě (BIBB, 2005). Různé genové shluky sekundárního metabolismu tedy pravděpodobně reagují na stres a pestré soubory fyziologických a environmentálních signálů. Navíc je sekundární metabolismus obvykle koordinován s fází životního cyklu, která podléhá vlastním regulačním prvkům, což regulaci dále komplikuje.

## 2.4 ABC transportéry

ABC transportéry patří k ATP-vázající nadrodině, která používá hydrolyzu ATP pro přenos různých látek přes biologické membrány. Podílejí se na importu a exportu široké škály substrátů od malých iontů po makromolekuly. ABC transportéry lze rozdělit do tří hlavních funkčních skupin. *Dovozci* (třída 1) zprostředkovávají příjem živin v prokaryotách. Mezi substráty, které jsou schopné přepravovat, patří mono- a oligosacharidy, organické a anorganické ionty, aminokyseliny, peptidy, kovů, polyaminové kationty i vitamíny. *Vývozci* (třída 2) se podílejí na vylučování jednotlivých molekul, jako jsou peptidy, lipidy, hydrofobní drogy, polysacharidy a proteiny, včetně toxinů jako je hemolyzin. Do této skupiny patří i námi studovaný transportér *ImrC*. Třetí kategorie (třída 3) není přímo zapojena do transportu, ale podílí se na překlada mRNA a opravách DNA (DAVIDSON et al., 2008).

Je zajímavé, že značný počet ABC transportérů třídy 2 byl nalezen v organismech produkující antibiotika, zejména aktinomycetách. Tyto organismy potřebují účinný obranný mechanismus, aby byly chráněny proti antibiotikům, které produkují (DAVIDSON et al., 2008).

Nacházejí se jak v prokaryotách tak eukaryotách. Jejich čtyři konstitutivní domény jsou obvykle kódovány nezávislými polypeptidy. Prokaryotické transportéry vyžadují další extracytoplasmatické vazebné bílkoviny (jedna nebo více za systému) pro funkci. Naproti tomu exportní systémy vynášejí škodlivé látky a extracelulární toxiny. Nacházejí se ve všech živých organismech (DEAN et al. 2001).



**Obr. 2.8: Schéma ABC transportéru, převzato ze SZAKACS et al. 2008**

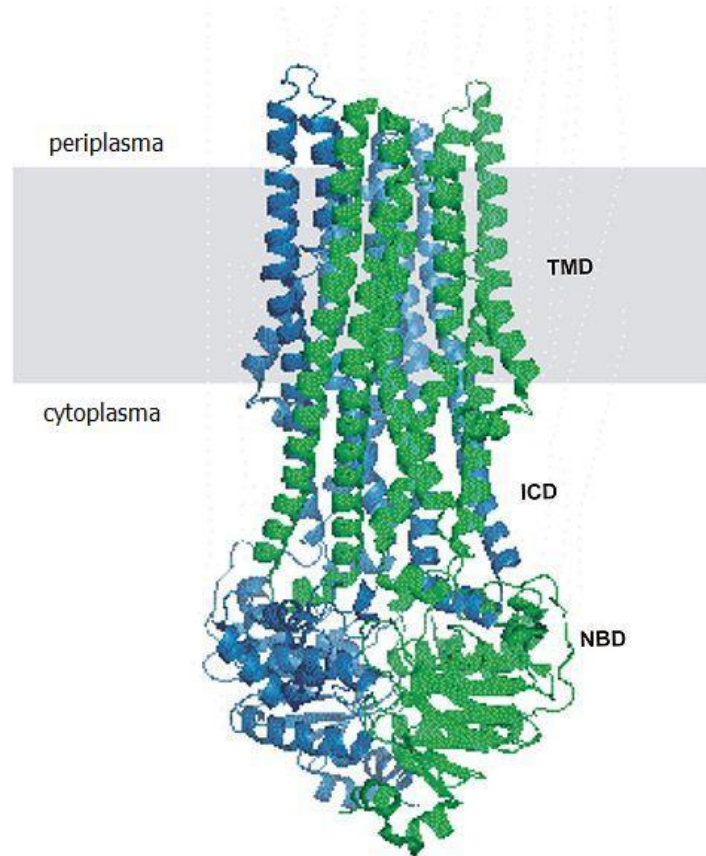
Bakteriální transportéry jsou závislé na proteinech, a to jak konstrukčně, tak funkčně a evolučně. Tyto transportéry můžeme najít nejen u bakterií, ale také v kvasinkách, rostlinách a živočiších včetně člověka, a zahrnují import i export látek do systému. Přestože každý jednotlivý systém je poměrně specifický, různé systémy přenášejí různé substráty. Některé mají značný zdravotní význam včetně mnohočetné rezistence (multidrug resistance) (HIGGINS et al. 1990).

### 2.4.1 Struktura ABC transportéru

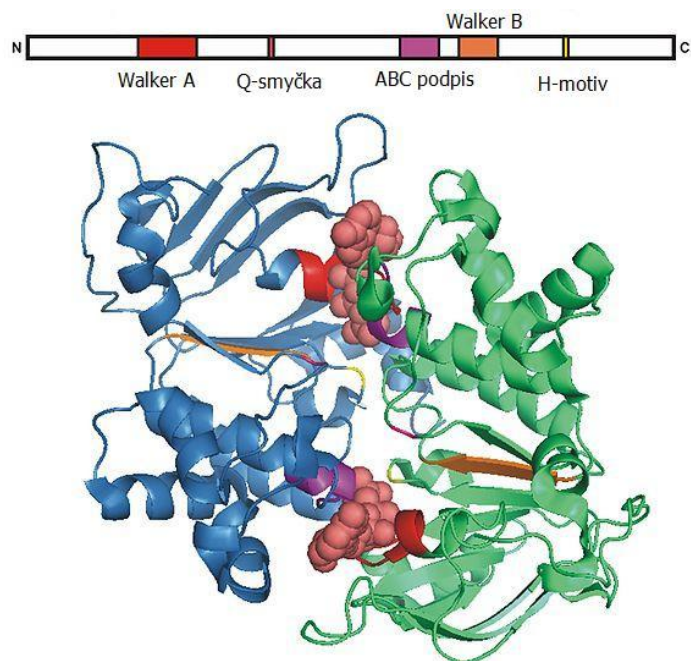
ABC transportéry obsahují pár ATP-vazebných domén, známé jako nukleotid-vázané domény (nukleotide binding domains, NBD), a ze dvou sad transmembránových domén (TMD), obvykle obsahující šest membránových  $\alpha$ -šroubovic. NBD obsahuje tři oblasti: domény Walker A a B, které nalezneme ve všech ATP-vázajících proteinech, a podpis (C-doména), který se nachází mezi nimi. C doména je specifická pro ABC transportéry, odlišuje je od ostatních ATP-vázajících proteinů. TMD je obsažena ve všech ABC transportérech, jen v různých kombinacích. Některé transportéry mohou mít všechny čtyři oblasti na stejném polypeptidovém řetězci. Prototyp ABC proteinu obsahuje dvě NBD a dvě TMD domény. NBD se nachází v cytoplasmě. Molekuly čerpají substráty v jednom směru, obvykle z cytoplasmy. Pro hydrofobní sloučeniny je tento pohyb často z vnitřní vrstvy přes dvojvrstvu na vnější membránu nebo příjemce molekuly. ABC geny jsou organizovány buď jako úplné transportéry, které obsahují dvě TMD a dvě NBD, nebo jako poloviční transportéry, které obsahují jeden z každé domény. Polovina transportéru je pak sestavena jako homodimer nebo heterodimer a vytváří funkční transportér. Geny, které kódují ABC proteiny, jsou rozptýleny v genomu a vykazují vysoký stupeň shody se sekvencí aminokyselin v eukaryotách (DEAN et al. 2001).

Většina transportérů je tvořena homodimery, které se skládají ze dvou polovin transportérů, nebo TMD zabudované do NBD. ICD (intracelular domain) je zodpovědný za komunikaci mezi TMD a NBD. Typickým představitelem takového transportéru je pak Sav1866 z *Staphylococcus aureus*. (viz obr. 2.9) Většina transmembránových domén transportérů se skládá z celkem 12  $\alpha$ -šroubovic se 6  $\alpha$ -šroubovicemi na monomeru. Doména ABC se skládá ze dvou domén, katalytické jádro domény jako motor ATPasy a menší, strukturálně různé  $\alpha$ -šroubovice, která jsou charakteristické pro ABC transportéry. Větší oblast se obvykle skládá ze dvou  $\beta$ -skládaných listů a šesti  $\alpha$ -šroubovic, kde se nachází motiv Walker A (GXXGXGKS / T, kde X je nějaká aminokyselina), označovaný také P-smyčka, a motiv Walker B ( $\Phi\Phi\Phi\Phi$ D, z nichž  $\Phi$  jsou hydrofobní zbytky). Šroubovicová doména se skládá ze tří nebo čtyř šroubovic a podpisem ABC motivu, známý též jako motiv LSGGQ, linker peptid nebo C motiv. Doména ABC také obsahuje glutamin, který je umístěn v pružné Q-smyčce, a  $\gamma$ -fosfátový spínač, který spojuje TMD a ABC. O Q-smyčce se předpokládá, že se podílí na interakci NBD a TMD. H-motiv obsahuje velmi

konzervativní rezidua histidinu, která jsou důležitá v interakci domény ABC s ATP (viz obr. 2.10).



**Obr. 2.9: Struktura ABC transportéru Sav 1866; převzato z [http://en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding\\_cassette\\_transporter](http://en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding_cassette_transporter) a upraveno (TMD = transmembránová doména, ICD = intracelulární doména pro komunikaci mezi NBD a TMD, NBD = nukleotid vázající doména)**



**Obr. 2.10: Struktura NBD**, lineární proteinová sekvence nahoře ukazuje relativní pozice aminokyselin ve struktuře (barvy souhlasí s 3D strukturou); převzato z [http://en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding\\_cassette\\_transporter](http://en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding_cassette_transporter) a upraveno

Spektra substrátů se často mezi různými transportéry překrývají, navíc exogenní substráty mohou o transportéry soutěžit jak mezi sebou, tak i se substráty endogenními. Klíčová role je rodině efluxních ABC transportérů přisouzena v ovlivnění absorpce, distribuce a exkrece toxických substancí. Tato funkce ABC transportérů je podporována přítomností biotransformačních enzymů, které přeměňují látky na metabolity, jež jsou dále substráty pro efluxní přenašeče (FUKSA et al., 2006).

## 2.5 Základní principy používaných metod

### 2.5.1 PCR (= Polymerase Chain Reaction)

Jedná se o jednoduchou enzymatickou metodu, během níž dochází k amplifikaci požadovaného fragmentu DNA.

PCR je syntéza definovaných sekvencí DNA. Dva oligonukleotidové primery jsou komplementární k opačným řetězcům a ohraničují cílovou sekvenci DNA. Reakce probíhá ve třech krocích:

1. denaturace templátu
2. nasednutí primerů (annealing)
3. prodlužování nasednutých primerů termostabilní polymerázou. (extenze)

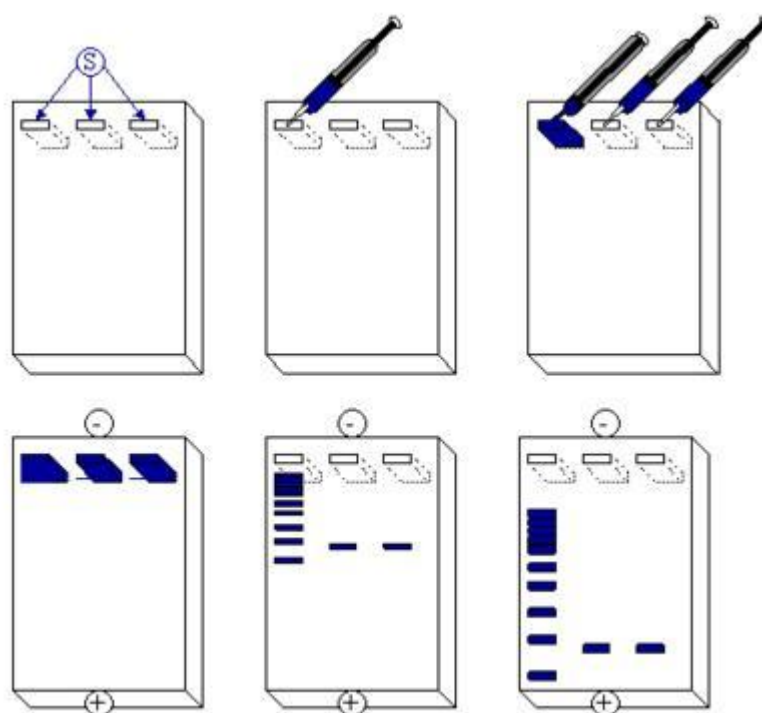
Produktem je dvouřetězcová DNA, definovaná 5'konci primerů a délkou vzdáleností mezi primery. Počet kopií cílové DNA se v každém cyklu zdvojuje a akumuluje se specifický fragment DNA.

Primery jsou jednovláknové oligonukleotidy běžně 20 – 30 bp dlouhé. Ohraničují replikovaný úsek, to znamená, že musí účinně hybridizovat s okolím cílové sekvence. Vzdálenost primerů je variabilní. Primery by měly obsahovat shodný obsah G a C bazí, což zajistí i podobnou  $T_{\text{anneal}}$ . Také by neměly tvořit dimery.



## 2.5.2 Elektroforéza

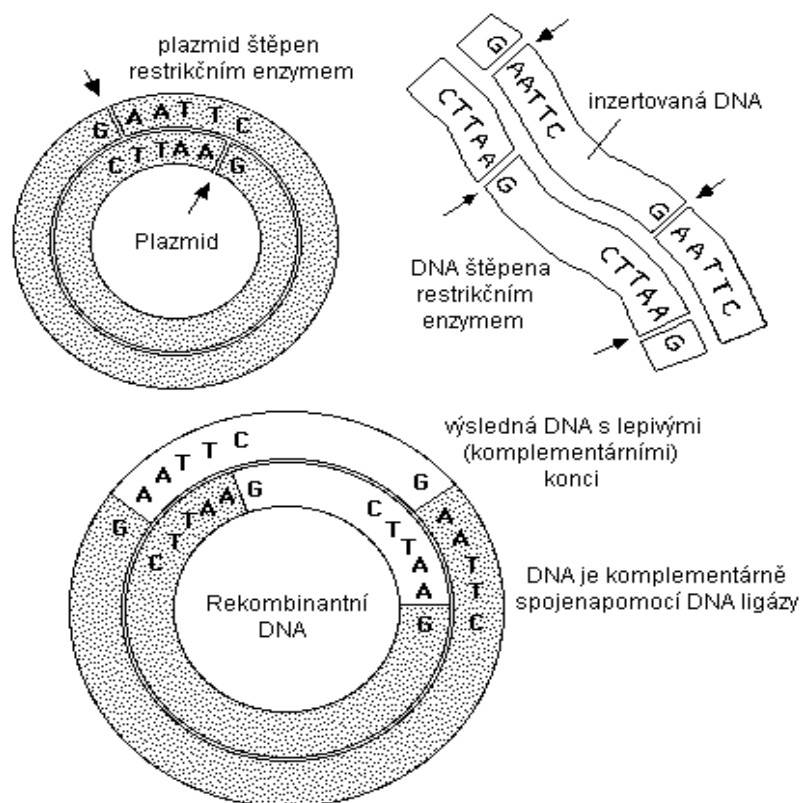
Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje DNA jsou záporně nabitě fosfátové skupiny. Tento náboj je rovnoměrně rozložen a jeho velikost je na jednotku molekuly stejná. Proto je pohyblivost molekul DNA v gelu určena jejich velikostí (objemnější fragmenty se pohybují gelem pomaleji). Elektroforéza se provádí na nosičích, kterými jsou nejčastěji gely z agarózy.



Obr. 2.11: Princip elektroforézy

### 2.5.3 Ligace

Ligací se rozumí vzájemné spojování dvou (a více) molekul DNA nebo cirkulace lineárních molekul (viz obr. 2.12). Ligace se provádí pomocí ligáz (enzymy katalyzující tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5' fosfátovou skupinou a 3'OH skupinou nukleotidů spojované DNA). Největší praktické využití má T4 DNA ligáza, která spojuje nejen kohezivní (přecházející nebo komplementární), ale i tupé, zarovnané konce.



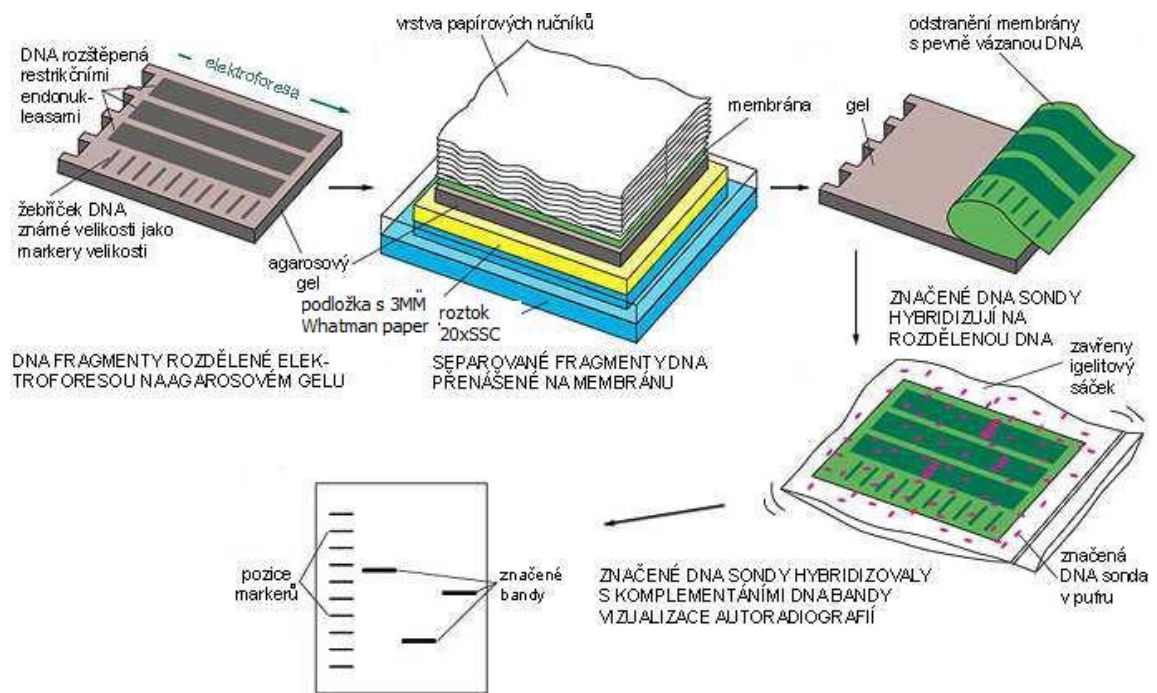
**Obr. 2.12: Ligace do plazmidu; převzato z**

[http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap08/week08b\\_files/mit-insert.gif](http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap08/week08b_files/mit-insert.gif) a upraveno

#### 2.5.4 Hybridizace

Hybridizací se rozumí tvorba dvouřetězcových hybridů ze dvou komplementárních jednořetězcových molekul. Je založena na principu denaturace a následné renaturace. Působením vysoké teploty nebo změnou pH dojde k oddělení komplementárních vláken nukleových kyselin a při následné renaturaci dojde k obnovení dvouřetězcových struktur při postupném snižování teploty.

Hybridizační metodu, kterou jsme využili, je hybridizace DNA s jinou molekulou DNA - komplementární a značenou sondou, Southern blotting. Hybridizace se provádí na pevných nosičích, na kterých je DNA fixována tak, aby byla současně schopna hybridizace. Kinetika této reakce je pomalá a relativně málo efektivní. Imobilizace vzorků se provádí nejčastěji na membrány z nitrátu celulosy nebo nylonu. Přenosu DNA na pevný nosič předchází depurinace, alkalická denaturace a neutralizace. Přenos se uskuteční buď prostou difuzí na podkladě kapilárních sil za pomoci vakua, nebo působením elektrického proudu. Malé fragmenty (do 1500 bp) se přenesou na membránu při použití difuze kapilární silou do 2 hodin, větší fragmenty (nad 15 kb) vyžadují i více než 15 hodin. Permanentní fixace na membránu se docílí např. působením UV světla. Vlastní hybridizace znamená reasociaci příslušných dvojic bazí podle specifického pořadí nukleotidů se sondou značenou radioaktivním nebo neradioaktivním markerem. Jde buď o úseky DNA (dvou nebo jednovláknové) klonované pomocí bakteriálního vektoru nebo syntetické oligonukleotidy. Méně často se používají tzv. ribosondy (cRNA). Senzitivita hybridizace závisí na čtyřech hlavních faktorech: délce (počtu bazí) a komplementaritě sondy, koncentraci sondy (a potlačení nescifických vazeb), specifické aktivitě sondy dané aktivitou (koncentrací) navázaného markeru, koncentraci testované DNA přenesené a fixované na membráně. Reakční směs a kinetika hybridizační reakce jsou stanoveny obvykle empiricky. Po hybridizační reakci ve speciálním inkubátoru s termostatem následuje vymývání pufrům SSC o různé koncentraci. Tento pufr odstraní všechny nescificky vázané molekuly. (*Hybridizační metody*: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa4.htm>)



**Obr. 2.13: Southern blotting;** převzato z

<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/oldnalanguage.html> a

upraveno

## 2.6 Cíle diplomové práce

- Detekce homologů vybraného rezistenčního genu *lmrC* účastnícího se syntézy linkosamidových antibiotik ve sbírce kmenů, které byly vyizolovány z půd různých stanovišť. Stanoviště se odlišovala složením hornin, vegetací i rozdílným pH půdy.
- Sekvence těchto genů a na základě podobnosti se známými rezistenčními geny stejného typu odhad funkce a souvislostí jejich umístění v genomu.

## 3 Metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Bakteriální kmeny

*Escherichia coli* **JM109**: *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta(\text{lac-proAB})$ . Tento kmen byl použit jako recipientní kmen pro transformaci vektorem pGEM-T.

*Streptomyces lincolnensis* **DSM40355** je typový kmen produkující linkomycin. Kmen byl získán ze sbírky Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH a byl používán jako pozitivní kontrola přítomnosti genu *lmrC*.

#### 3.1.2 Plasmidy

**pGEM-T** vektor je linearizovaný vektor s tymidinem na obou 3'-koncích. Tymidinové konce brání recirkulaci vektoru a poskytují kompatibilní konce pro produkty PCR. Vektor má několik restrikčních míst pro endonukleázy *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *AvaI*, *SmaI*, *XbaI*, *BamHI*, *SalI*, *AccI*, *HincII*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*.

#### 3.1.3 Kultivační média

##### LB médium

trypton	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	5 g

destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit na objem 1000ml

upravit pH na 7,5

### **LB agar**

Agar	15 g
LB médium	1 l

### **GYM médium**

Yeast extract	4 g
Malt extract	10 g
Glukóza	4 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml, pH 7,2

### **GYM agar**

Yeast extract	4 g
Malt extract	10 g
Glukóza	4 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
agar	12 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml, pH 7,2

### **3.1.4 Pufry**

**TE pufyr:** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

**TE<sup>-1</sup> pufyr:** 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0

**TAE pufyr:** 40 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; pH 8,0

## 3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Všechny reakce probíhaly v celkovém objemu 50  $\mu$ l na přístroji C1000 Thermal Cycler (Biotech).

**Tab. 3.1: Používané primery pro PCR**

Název	Sekvence 5' - 3'
rB1f	ARC-WCG-GYC-AGA-AYT-TYC-T
rB1r	CGS-GCS-ACY-TCC-CAY-TG
rC4f	CTS-GAC-GAR-CCS-ACY-AA
rC4r	GKY-SGT-SGG-CTC-GTC
118f	GCC-GGT-CAG-AAT-TTC-CT
118r	ATC-TCG-ATG-CCC-GTC-AG
pUCM13f	GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-AC
pUCM13r	CAG-AGG-AAA-CAG-CTA-TGA-C



### 3.2.1 Amplifikace fragmentu genu *lmrB*

1. příprava reakčního mixu (premix) – celkový objem 50  $\mu$ l

**Tab 3.2: Složení premixu pro PCR s primery pro amplifikaci části genu *lmrB***

Složka reakční směsi	Množství roztoku ( $\mu$ l)
DNA templát	10
Pufř taq obyč	5
100x BSA	3
MgCl <sub>2</sub>	3
118f	2
118r	2
DNTPs	1
DMSO	2,5
H <sub>2</sub> O	20,5
Taq polymerasa	1

- a. DNA templát – přímo bakteriální kolonie v 10  $\mu$ l vody, z které se DNA uvolňuje po první denaturaci
  - b. 100x BSA – stabilizace/zlepšení polymerázové aktivity
  - c. DMSO – zlepšuje denaturaci a rozpustnost DNA při změnách teploty
  - d. Pozitivní kontrola – DNA + univerzální primery (MBcl HCl, uni t83p) vše po 1  $\mu$ l + 40  $\mu$ l premixu
  - e. Negativní kontrola – univerzální primery (MBcl HCl, uni t83p) po 1  $\mu$ l + 40  $\mu$ l premixu
2. naprogramování thermocycleru

**Tab. 3.3: Nastavení thermocycleru pro PCR s primery pro amplifikaci části genu *lmrB***

Krok	Teplota	Doba trvání/opakování
První denaturace	94°C	5 min
Hot Start	94°C	1 min
Nasednutí primerů	56°C	30 sec/34x
Prodlužování primerů	72°C	30 sec
Závěrečné prodlužování primerů	72°C	5 min
Závěrečné chlazení	4°C	

- a) Hot Start se provádí po přidání termostabilní DNA polymerázy po prvním denaturačním kroku. Prevence nespecifických amplifikací.
3. analýza **elektroforézou** v agarózovém gelu.

### **3.2.2 Amplifikace fragmentu genu *lmrC***

1. příprava reakčního mixu (premix) – celkový objem 50 µl

**Tab 3.4: Složení premixu pro PCR s primery na *lmrC***

Složka reakční směsi	Množství roztoku (μl)
DNA templát	10
Pufir taq obyč	5
MgCl <sub>2</sub>	2
rC4f	4
rC4r	2
DNTPs	1
Taq polymerasa	1

- DNA templát – přímo bakteriální kolonie v 10 μl vody, z které se DNA uvolňuje po první denaturaci
2. naprogramování thermocycleru

**Tab. 3.5: Nastavení thermocycleru pro PCR s primery *lmrC***

Krok	Teplota	Doba trvání/opakování
Hot Start	95°C	1 min
Nasednutí primerů	62°C	1 min/30x
Prodlužování primerů	72°C	1 min
Závěrečné prodlužování primerů	72°C	5 min
Závěrečné chlazení	4°C	

3. analýza **elektroforézou** v agarózovém gelu.

### 3.2.3 PCR se zaligovaným vzorkem 118

Chromozomální DNA kmene 118 byla štěpena restričními endonukleázami *Bgl*III, *Sac*I, *Kpn*I. Po ligaci adaptérů byl fragment amplifikován PCR. Primery byly vybrány podle tab. 3.6.

**Tab. 3.6: Vzorek 118 a pro něj vybrané primery pro PCR po ligaci**

1. štípání	Primery pro pcr
<i>Bgl</i> III	118f+118r
	118f+ClaI
	118r+ClaI
<i>Sac</i> I	118f+118r
	118f+KpnI
	118r;KpnI
<i>Kpn</i> I	118f+118r
	118f+SacI
	118r+SacI

**Tab. 3.7: Složení premixu pro PCR vzorku 118 s primery z tab. 3.6**

Složka reakční směsi	Množství roztoku ( $\mu$ l)
DNA templát (z ligace)	10
LA pufr	5
MgCl <sub>2</sub>	3
Primer 1	2
Primer 2	2
DNTPs	2
H <sub>2</sub> O	32
LA polymerasa	1

Po proběhnutém PCR, elektroforéza. Band požadované délky byl vyříznut, přečištěn a poslán na sekvenaci.

### 3.3 Elektroforéza DNA

#### 3.3.1 Analytická elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Elektroforetická analýza DNA byla prováděna v 0,8 % - 1 % agarózovém gelu v TBE pufru. Pro zviditelnění DNA pod UV lampou byla DNA barvena ethidiumbromidem nebo SYBR Greenem (přidávány do agarózy v konečné koncentraci 0,005 %). Fragmenty byly na gelu separovány při konstantním napětí 3 - 5 V/cm asi 45 min.

a) příprava agarózového gelu:

- z přírodního polysacharidu agarózy rozpuštěného povařením v pufru (Tris – borát – EDTA = TBE pufr) spolu s barvivem ethidiumbromidem nebo SYBR Green
- po zatuhnutí gelu ve vaničce se gel přelije TBE pufrem

b) příprava vzorků

- do mikrotitrační destičky se dá 2-4  $\mu$ l barviva pro sledování migrace v nanášecím pufru a přidá se 20  $\mu$ l vzorku po PCR
- ty se nanášejí do jamek v agarózovém gelu

c) do každé řady vzorků se přidává ladder (1kb Plus Ladder), který má definované páry bazí, od kterých se odvíjí hodnocení

d) připojení ke stejnosměrnému napětí (100 V) a proudu (130 mA) na 45 – 60 min

e) vizualizace pomocí UV transluminátoru

#### 3.3.2 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu pro účely hybridizace.

Restrikční digest chromozomální DNA byl separován v 0,7% gelu při napětí 3 – 5 V/cm nejméně 4 hodiny. Jako velikostní standard pro hybridizační analýzu byl použit DNA Molecular Weight Marker II, DIG-značený od Roche Applied Science.

### 3.4 Příprava genomové DNA ze studovaných kmenů

Kultury kmenů byly napěstovány v tekutém GYM mediu při třepání 200 otáček/min po dobu 48h. Pro izolaci DNA bylo nutné mechanické rozbití buněk, protože aktinomycety mají silnou buněčnou stěnu. To se provádělo kuličkami o průměru 1 a 0,5 mm. Kuličky (každé po 250 mg) se navázily do mikrozkušavky se šroubovacím uzávěrem a vysterilizovaly se v autoklávu (15 min při 121°C). Vzorek buněčné kultury se promyl 500 µl EDTA (50 mM, pH 8), stočil se 1 min na centrifuze při otáčkách 16000 rpm, EDTA byla odsáta, buňky tvořily asi 100 µl. Znovu se přidala EDTA (50 mM, pH 8), tentokrát 600 µl a směs se přenesla do vysterilizované zkumavky s kuličkami. Buňky se rozbíjely rychlostí 2500 rev min<sup>-1</sup> asi 1 min, podle potřeby i déle. Po rozbití se nechaly kuličky sedimentovat nejlépe stočením na centrifuze (1 min při 16000 rpm) a supernatant – čirá tekutina s buňkami se přenesla do nové zkumavky. S tímto vzorkem se dále pracovalo podle kitu Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit: přidalo se 600 µl Nuclei Lysis Solution a 5 min se zahřívalo na 80°C, potom se ochladilo na pokojovou teplotu, přidali jsme 3 µl RNase Solution, promíchali a nechali stát 45 min při 37°C. Potom se přidalo 200 µl Protein Precipitation Solution, 20 sec se míchalo na vortexu, pak se 5 min inkubovalo na ledu. Vzorky se stočily na centrifuze (3 min při 16000 rpm), supernatant se přenesl do 1,5 ml eppendorfky s 600 µl izopropanolu, opět stočil na centrifuze (2 min při 16000 rpm), isopropanol se odpipetoval, přidalo se 600 µl 70% etanolu, stočilo se na centrifuze (2 min při 16000 rpm). Ethanol se odpipetoval a zbytek se odpařil do sucha na Speedvacu. Po úplném odpaření se přidalo 100 µl DNA Rehydration Solution a vložilo se na 1 hod do vodní lázně o teplotě 65°C. Pro kontrolu a zjištění koncentrace DNA ve vzorku se provedla elektroforéza.

## 3.5 Ligace

Do ligace se dávala DNA přečištěná kitem QIAquick PCR Reaction Purification Kit (Qiagen) a rozpuštěná v 35  $\mu\text{l}$  eluátu (Buffer EB).

**Tab 3.8: Složení 1 vzorku pro ligaci**

DNA	3 $\mu\text{l}$
pGEM-T (inzert)	1 $\mu\text{l}$
T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ ),	1 $\mu\text{l}$
2x T4 DNA Ligase Buffer	5 $\mu\text{l}$

Inkubovalo se přes noc při 4°C a následovala transformace.

### 3.5.1 Ligace DNA

Molekuly DNA byly ligovány v objemu 10  $\mu\text{l}$ , při koncentraci DNA 20 ng/ $\mu\text{l}$ . Byl dodržen molární poměr mezi fragmentem a adaptérem 1:3. Adaptér byl připraven kombinací dvou komplementárních oligonukleotidů navržených tak, aby vznikly kohezní konce (podle tab. 3.9) rychlým povařením na 95°C a pomalým chladnutím na pokojovou teplotu.

Z jednoho kmene se udělaly 3 vzorky, každý byl štípaný jiným enzymem: KpnI, SacI a BglII. Po poštípání byla DNA separována na elektroforéze a vyříznuty oblasti, kde se podle první hybridizace vyskytovaly fragmenty. Následně byla izolována čistá DNA z agarózového gelu pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Pro ligaci byla použita T4 DNA ligáza (1 U/ $\mu\text{l}$ ) 1 $\mu\text{l}$  a odpovídající ligační pufr 1 $\mu\text{l}$ . Inzertu se dával také 1  $\mu\text{l}$  a doplnilo se vodou na 10 $\mu\text{l}$ . Na příklad pro vzorek štípaný BglII se jako inzert použil adaptér ClaI+BglII. Molekuly DNA byly ligovány při pokojové teplotě po dobu 2 h. Pak byly uloženy přes noc do lednice.



**Tab. 3.9: Složení inzertu z kompatibilních restričních endonukleáz**

		$5' \rightarrow 3'$ $3' \rightarrow 5'$
1	SacI, KpnI	$5' \rightarrow 3'$ CTGATGGCATAACAGAGCT $3' \rightarrow 5'$ CATGGACTACCGTATTGTC
2	EcoRI, HindIII	$5' \rightarrow 3'$ AATTCTGATGGCATAAGACA $3' \rightarrow 5'$ GACTACCGTATTCTGTTCGA
3	BamHI, XbaI	$5' \rightarrow 3'$ GATCCTGATGGCATAACAGT $3' \rightarrow 5'$ GACTACCGTATTGTCAGATC
4	ClaI, BglII	$5' \rightarrow 3'$ CGATGTCATGGCATAACA $3' \rightarrow 5'$ TACAGTACCGTATTGTCTAG

### 3.6 Transformace buněk *E. coli* tepelným šokem

Buňky *E. coli* musí být ve stavu kompetence, aby mohly novou DNA přijmout. Pro navození umělé kompetence se *E. coli* kultivovaly v médiu s  $Mg^{2+}$ . Vnášená DNA se nejprve smísila s buňkami, čímž DNA adherovala na jejich povrch. Pak byla směs DNA a buněk vystavena teplotnímu šoku, který usnadnil vstup DNA do buněk. Následně byly buňky kultivovány na neselektivním médiu, aby došlo k syntéze proteinů kódujících vstupující DNA. Potom byly buňky vysety na pevné medium.

#### Postup:

- 10  $\mu$ l DNA z ligace se inkubovalo 20 min na ledu, přidá se 50  $\mu$ l *E. coli* buněk a dobře se promíchalo, nechalo se 30 min na ledu
- Na 60 sec se zahřálo na 42°C a ochladilo se na ledu 2 min
- Přidalo se 500  $\mu$ l SOC media (předehřátého na 37°C) a inkubovalo se 2 hodiny při 37°C a 200 rpm
- Buňky se vysely na agarovou půdu (LB agar) s ATB – selekce transformantů a nechali se přes noc narůst
- Modrobílá selekce – modře zbarvené narostlé kolonie nepoužitelné, bílé kolonie se použily pro PCR
- Kontrola narostlých buněk – PCR s pUC primery: vzorek narostlých buněk odebrat do 5  $\mu$ l vody, 1 min denaturace při 95°C

**Tab. 3.10: Složení premixu pro PCR transformovaných buněk**

DNA	5 $\mu$ l
LA pufr	2,5 $\mu$ l
pUC for	1 $\mu$ l
pUC rev	1 $\mu$ l
dNTPs	0,5 $\mu$ l
dd voda	14,75 $\mu$ l
LA poly	0,25 $\mu$ l

**Tab. 3.11: Nastavení thermocycleru pro PCR s pUC primery**

Krok	Teplota	Doba trvání/opakování
První denaturace	94°C	5 min
Hot Start	94°C	1 min
Nasednutí primerů	54°C	50 sec/35x
Prodlužování primerů	72°C	1,5 min
Závěrečné prodlužování primerů	72°C	5 min
Závěrečné chlazení	4°C	

### **3.7 Precipitace DNA isopropylalkoholem**

Precipitace se provádí buď pro zakoncentrování vzorku nebo jako součást purifikace. K roztoku DNA byla přidána jedna desetina objemu 3 M octanu sodného pH = 5 a 0,75 násobek objemu isopropylalkoholu. Srážení probíhalo při -20 °C po dobu 15 min. Směs se poté stočila na centrifuze za snížené teploty (4°C) při 15 000 g po 15 min. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet promyt 0,5 násobkem původního objemu 70% etanolem. Po následné centrifugaci opět za snížené teploty (4°C) při 15 000 g 15 min byla vysrážená DNA vysušena ve vakuu a rozpuštěna v požadovaném pufru.

## 3.8 Štěpení genomické DNA a hybridizace

### 3.8.1 Štěpení DNA restrikčními enzymy

Chromozomální DNA byla štěpena restrikčními enzymy (viz tab. 3.12). K DNA, v konečné koncentraci okolo 2 µg v reakční směsi, byl přidán enzym o objemu 5 µl, pokud je v koncentraci 10 000 U/ml nebo 5 000 U/ml, nebo 2,5 µl, pokud je v koncentraci 20 000 U/ml, dále odpovídající pufr, který tvořil 1/10 objemu (5 µl) a směs se doplnila vodou na 50 µl. Štěpení probíhalo celkem 4 hodiny za teploty 37°C ve vodní lázni. Pro zajištění dostatečné efektivity štěpení se celkové množství enzymu rozdělilo na dvě dávky a druhá dávka se dodala do směsi po dvou hodinách.

**Tab. 3.12: Restrikční endonukleázy, které jsme používali při restrikci DNA.**

<i>SacI</i>	20 000 U/ml	CTGATGGCATAACAGAGCT	NEBuffer 1
<i>KpnI</i>	10 000 U/ml	CTGTTATGCCATCAGGTAC	NEBuffer 1
<i>EcoRI</i>	20 000 U/ml	AATTCTGATGGCATAAGACA	NEBuffer EcoRI
<i>HindIII</i>	20 000 U/ml	AGCTTGTCTTATGCCATCAG	NEBuffer 2
<i>BamHI</i>	20 000 U/ml	GATCCTGATGGCATAACAGT	NEBuffer 3
<i>XbaI</i>	20 000 U/ml	CTAGACTGTTATGCCATCAG	NEBuffer 4
<i>ClaI</i>	5 000 U/ml	CGATGTCATGGCATAACA	NEBuffer 4
<i>BglII</i>	10000 U/ml	GATCTGTTATGCCATGACAT	NEBuffer 3

Poštípaná DNA se dávala na elektroforézu. Agarózový gel byl 0,8%, nebyl barven žádným barvivem. Loading buffer byl přidáván pouze pro vizuální kontrolu proběhnutí elektroforézy. Kromě poštípané DNA se do další jamky dával marker DNA Molecular Weight Marker II 10 µl (místo klasického ladderu) pro finální určení velikosti. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V asi 4 hodiny.

### 3.8.2 Přenos DNA z gelu na membránu - *Southern blot*

Gel po elektroforéze byl promýván roztoky při pokojové teplotě za stálého míchání. Po použití každého roztoku byl gel promyt destilovanou vodou. Po promytí byl sestaven Southern blot. Přenos se prováděl přes noc.

**Tab. 3.13: Použité roztoky pro přenos DNA na membránu a doba jejich působení.** (depurinační roztok: 250mM HCl; denaturační roztoky: 0,5M NaOH, 1,5M NaCl; neutralizační roztoky: 0,5M Tris-HCl, 1,5M NaCl)

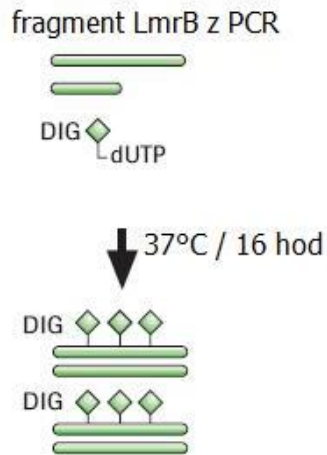
roztok	doba působení
depurinační	10 min
denaturační	2 x 15 min
neutralizační	2 x 15 min
20x SSC	10 min

Po skončení přenosu byla nylonová membrána fixována UV zářením z každé strany po dobu 2,5 min.

### 3.8.3 Značení sond a vlastní hybridizace

#### 3.8.3.1 Značení sondy

Veškeré kroky hybridizace se prováděly podle návodu DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit (Roche). Pro značení sondy jsem připravila PCR produkt z kmenů s primery na *lmrB* (118f+118r). Požadovaná koncentrace vzniklých bandů potřebných pro vznik sondy byla 1 µg, destilovanou vodou se celkový objem doplnil na 16 µl. DNA se denaturovala 10 min při 100°C a rychle ochladila na ledové lázni. K takto zdenaturované DNA se přidala 4 µl DIG-High Prime a nechala se inkubovat 16 hod při 37°C. Reakce se ukončila přidáním 2 µl 0,2M EDTA (pH 8,0) a zahřátím na 65°C na 5 min. Koncentraci naznačených sond jsem zkontrolovala na elektroforéze.



**Obr. 3.3: Značení DIG** (převzato z návodu od Roche a upraveno)

### 3.8.3.2 Hybridizace se sondou značenou digoxigeninem

Membrána s fixovanou DNA byla promývána v 10 ml hybridizačního roztoku (DIG Easy Hyb od Roche) na točivé vodní lázni po dobu min. 30 min při teplotě 54°C, při které pak probíhala samotná hybridizace. Tato teplota se vypočítala podle obsahu G + C podle vzorce:  $T = T_m - 20^\circ\text{C}$ , přičemž  $T_m = 49,82 + 0,41(\%G+C) - (600/\text{délka baze v bp})$ . Potom byl hybridizační roztok vyměněn za nový s příslušnou denaturovanou sondou (do 5 ml hybridizačního roztoku bylo přidáno 125 ng značené sondy) a hybridizace se nechala běžet přes noc. Značená sonda byla těsně před použitím zdenaturována 5 min při 100°C a ochlazena na ledové vodní lázni. Následující den byla membrána promyta nejprve 2 x 5 min ve 100ml 2 x SSC posthybridizačního roztoku s 0,1% SDS při pokojové teplotě a poté 2 x 15 min ve 100ml 0,5 x SSC posthybridizačního roztoku s 0,1% SDS při teplotě 65°C.

### 3.8.3.3 Detekce

Princip této metody spočívá v imunochemické detekci digoxigeninu protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou s použitím chromogenního substrátu.

Nejprve byla membrána promyta promývacím pufrům (popis a složení roztoků v tab. 3.14). Poté byla inkubována 30 min v blokovacím roztoku při pokojové teplotě. Tato inkubace zabrání nespecifické vazbě protilátky na membránu. Po 30 min inkubace membrány v roztoku protilátky (*Antibody Solution*) konjugované s alkalickou fosfatázou (Anti-Digoxigenin-AP) následovalo promytí membrány 2 x 15 min v promývacím pufru a opláchnutí 5 min v detekčním pufru. Všechny tyto operace byly prováděny za pokojové teploty a stálého míchání. Posledním krokem byla inkubace v barvicím roztoku (*color substrate solution*), která byla ve tmě, a opět se nechávala přes noc. Pro ukončení barvení se membrána promyla 5 min v destilované vodě a nechala se na vzduchu uschnout. Ještě za mokra se prováděl scan pro uchování výsledků.

**Tab. 3.14: Popis a složení promývacích roztoků k barevné detekci**

promývací roztok	0,1 M maleinová kyselina; 0,15 M NaCl, pH 7,5; 0,3% (v/v) Tween 20	pH 7,5
blokovací roztok	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5 rozpuštěno v pufru kyseliny maleinové (0,1 M maleinová kyselina; 0,15 M NaCl, upraveno pomocí pevného NaOH)	pH 7,5
antibody solution	Anti-Digoxigenin-AP zcentrifugovat 5 min při 10 000 rpm a 4 µl do 20 ml blokovacího roztoku	
detekční pufr	10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0 100 mM NaCl	pH 9,5
Color substrat solution	40 µl NBT/BCIP zásobního roztoku do 2 ml detekčního pufru	

Pro zjištění citlivosti membrány jsem udělala tzv. *dot blot*. Vzala jsem sondu z kmene 118 naznačenou DIG-11-dUTP. Vzorek se nakapal na membránu v různých koncentracích a proběhla vlastní hybridizace včetně detekce.



### **3.9 Hledání homologních sekvencí ABC transportéru v databázi GenBank**

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) je databáze genetických sekvencí, kde můžeme i překládat nukleotidové sekvence na aminokyselinové. Na základě našich nukleotidových sekvencí jsme vytvořili přepis do aminokyselinové sekvence. Z nich jsme potom vytvořili fylogram, který nám ukázal podobnost s již známými genomy bakterií. Pomocí nich můžeme odhadovat jejich funkci a produkci antibiotik.

## 4 Výsledky

### 4.1 Vyhledávání homologních genů *lmrC* ve sbírce kmenů

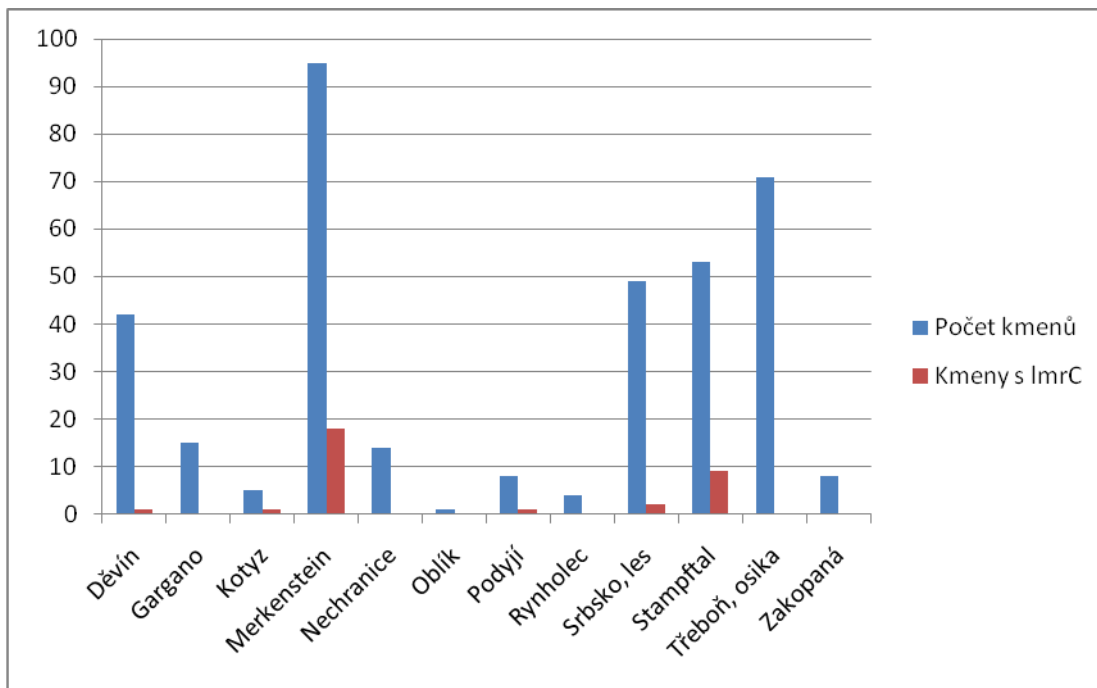
Prvním úkolem bylo zjistit, zda kmeny bakterií ze sbírky, kterou jsme měli k dispozici, obsahují gen *lmrC*. Z 365 kmenů, které byly z různých lokalit (viz tab. 4.1), obsahovalo homolog genu *lmrC* 32 kmenů. (viz tab. 4.2)

**Tab. 4.1: Seznam lokalit, ze kterých byly vzorky odebírány, a jejich charakteristiky**

Místo	pH	Org. složka (%)	Typ půdy	Vegetace
Děvín, ČR	7,9	12,0	Rendzina	step
Kotýz, ČR	7,5	26,6	Rendzina	borový les
Meluzína, ČR	5,0	7,6	Kryptopodzol	hora
Merkenstein, AUS	8,1	16,5	Dolomit	smíšený les
Nechranice, ČR	6,1	11,6	Vertizol	dřevo
Oblík, ČR	7,9	21,5	Kambizol	step
Podyjí, ČR	5,6	10,2	Fluvizol	les
Rynholec, ČR	6,3	7,2	Technozol	vlhká louka
Srbsko, ČR	7,7	8,2	Kambizol	smíšený les
Stamftal, Rakousko	7,5	17,7	Dolomit	borový les
Třeboň, ČR	4,0	9,1	Podzol	smíšený les
Zakopaná, ČR	3,7	3,6	Pískovec	smíšený les

**Tab. 4.2: Seznam lokalit a počty testovaných kmenů**

<b>Lokalita</b>	<b>Zkratka</b>	<b>Počet kmenů/počet kmenů s genem <i>lmrC</i></b>
Děvín	DEV	42 / 1
Gargano	G	15 / 0
Kotyz	KOT	5 / 1
Meluzína	M	6 / 0
Merkenstein	MER	89 / 18
Nechranice	N	14 / 0
Oblík	Obl	1 / 0
Podyjí	P	8 / 1
Rynholec	R	4 / 0
Srbsko, les	L	49 / 2
Stampftal	STA	53 / 9
Třeboň, osika	O	71 / 0
Zakopaná	ZAK	8 / 0



**Obr. 4.1: Kmeny podle lokalit a výskytu homologů *lmrC***

**Tab. 4.3: Pozitivní kmeny a jejich charakteristiky**

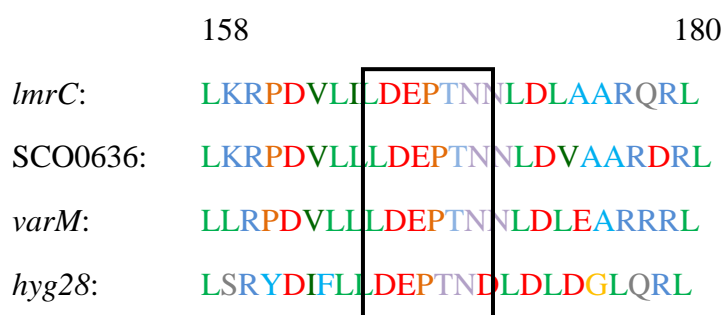
<b>Lokalita</b>	<b>Číslo kmene</b>	<b>Aktivita proti <i>Micrococcus</i> spp. CCM 552</b>	<b>Aktivita proti <i>E. coli</i> CCM 3988</b>	<b>Izolován na médiu s přídavkem linkomycinu</b>
Obl	150	+	-	-
KOT	87	-	-	-
DEV	528	+	-	-
L	49	+	-	1000
	449	-	-	50
STA	870	+	-	-
	871	-	-	-
	892	+	-	-
	928	+	-	-
	930	-	-	-
	931	-	-	-
	934	+	-	-
	937	+	-	-
	940	+	-	-
MER	22	-	-	-
	23	-	-	-
	32b	-	-	-
	83	-	-	-
	116	+	-	-
	118	+	-	-
	803	+	-	-
	815	-	-	-
	818	-	-	-
	823	-	-	-
	829	-	-	-
	830	-	-	-

	838	+	+	-
	841	+	-	-
	844	-	-	-
	850	-	-	-
	905	+	-	-
	920	-	-	-

Geny byly vyhledávány pomocí PCR. Primery byly navrženy dříve na základě sekvence genu *lmrC* kmene *S. lincolnensis* 78-11 (PESCHKE et al., 1995) produkujícího linkomycin a sekvencí blízkce příbuzných genů. Při PCR se postupovalo podle postupu uvedeného v kapitole 3.1.2.

#### 4.1.1 Primery

Pro návrh primerů bylo nutné znát sekvenci genu *lmrC* a to jak nukleotidovou, tak aminokyselinovou. Porovnali jsme sekvence s geny, které kódují podobné transportéry. Jako porovnávací geny jsme zvolili: SCO0636, *varM* a *hyg28*.



Obr. 4.2: Pořadí sekvence aminokyselin v genech *lmrC*, SOC0636, *varM* a *hyg28*

#### 4.1.1.1 rC4f

Geny SCO0636, *varM*, *hyg28* mají s *lmrC* společnou sekvenci, která je v genu *lmrC* v pozici 493 - 509 bp. Dedukovaná aminokyselinová sekvence má pořadí aminokyselin LDEPTN (viz obr. 4.2). V nukleotidové sekvenci je to potom CTC GAC GAA CCC ACC AAC. Protože ale jednotlivé aminokyseliny nemají striktně dáno, jakým kodonem budou kódovány, bylo nutné navrhnout degenerovanou sekvenci primeru. Její podoba byla CTS GAC GAR CCS ACY AA. Degenerace spočívaly v úpravě kodonů podle tab. 4.4. Délka primeru je 17bp a orientační  $T_{\text{anneal}}$ , podle obsahu G+C, je v rozmezí 55,4 – 64,7°C.

**Tab. 4.4: Kodony pro sekvenci rC4f primeru**

Aminokyselina	Originální sekvence	Degenerovaná sekvence
Leucin	CTC	CTS
Glutamová kyselina	GAA	GAR
Prolin	CCC	CCS
Treonin	ACC	ACY
Asparagin	AAC	AA (pouze 2 báze kodonu)

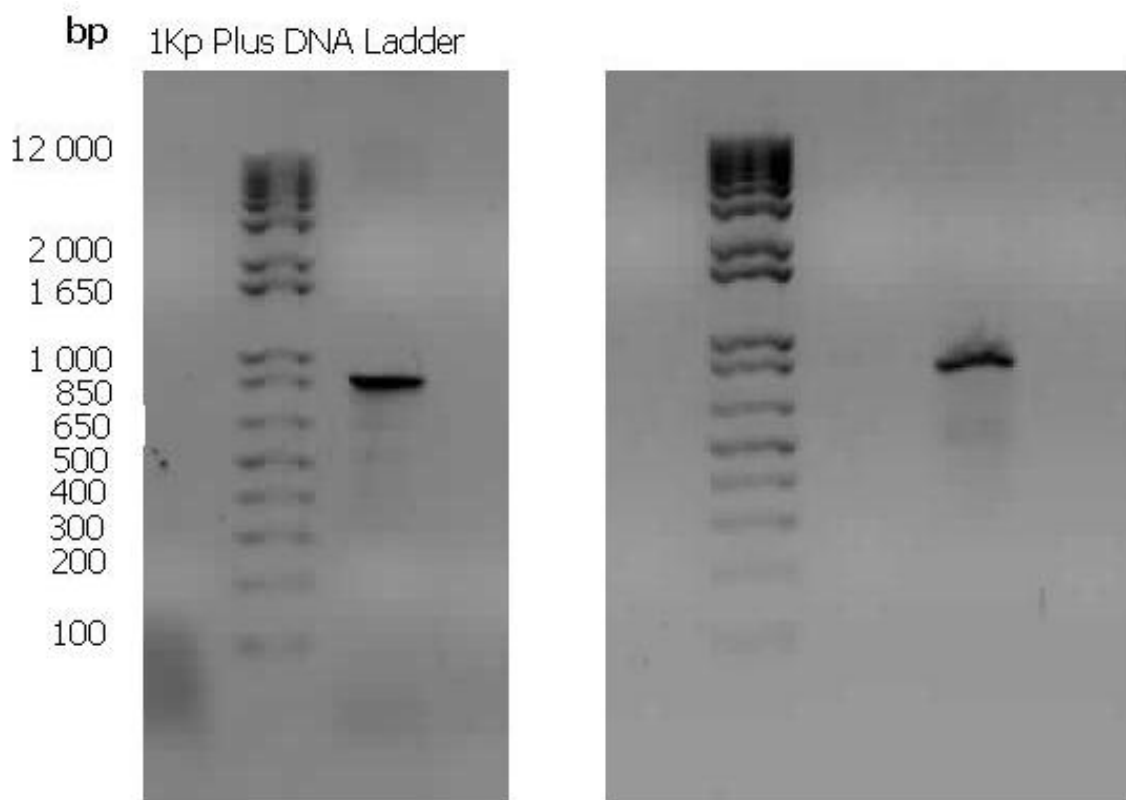
#### 4.1.1.2 rC4r

U reverse primeru byl postup stejný, jen měl ještě jeden krok navíc a to vytvoření reverzního komplementu. Sekvence aminokyselin LDEPTN se v genu *lmrC* opakuje ještě v pozici 1450 – 1464 bp. Přepis do nukleotidové sekvence je tedy obdobný jako u rC4f, CTG GAC GAG CCG ACG AAC. Následoval přepis do degenerované sekvence. Přepis byl GAC GAG CCS ACS RMC. Jelikož se jedná o reverse primer, bylo nutné vytvořit reverzní komplement v podobě GKY SGT SGG CTC GTC. Specifická úprava kodonů podle tab 4.5. Délka primeru je 15 bp a  $T_{\text{anneal}}$  je stanovena na 54,6 – 64,5°C.

**Tab. 4.5: Kodony pro sekvenci rC4r primeru**

Aminokyselina	Originální sekvence	Degenerovaná sekvence
Prolin	CCG	CCS
Treonin	ACG	ACS
Asparagin	AAC	RMC

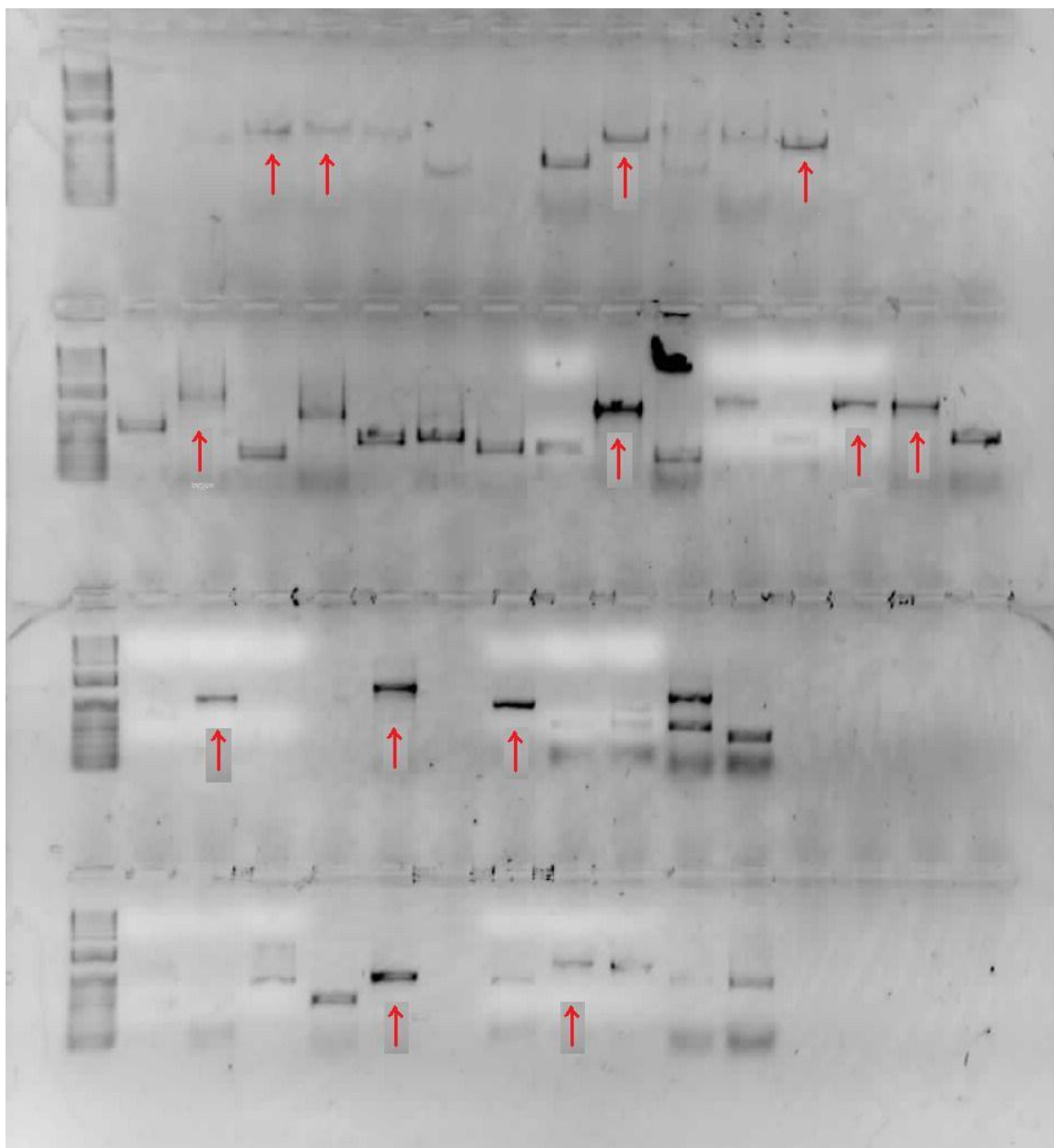
Primery jsou navrhovány tak, aby jejich  $T_{\text{anneal}}$  byla co nejbližší a aby měly podobný obsah GC párů. Je to proto, aby při reakci měly co nejlepší výtěžnost. Nejprve bylo nutné stanovit  $T_{\text{anneal}}$ , optimální teplotu pro nasedání primerů. Experimentálně bylo zjištěno, že optimální  $T_{\text{anneal}}$  je 62°C. Gen *lmrC* má délku 971 bp. (viz obr. 4.3)



**Obr. 4.3: Zobrazení fragmentu *lmrC* na elektroforéze**



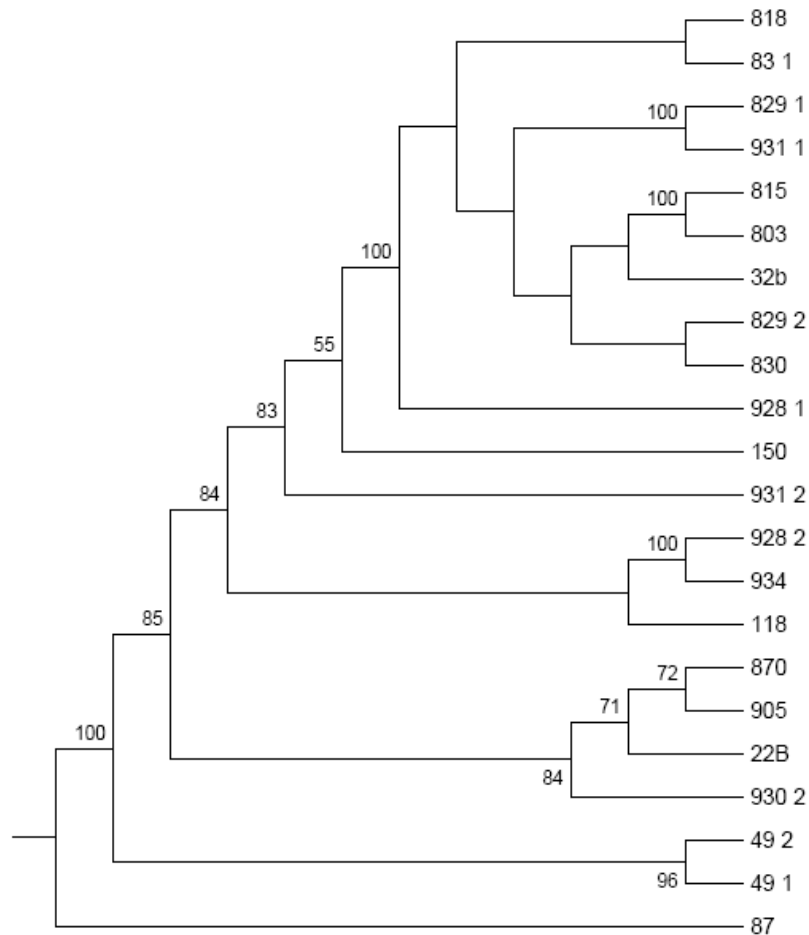
Ze všech kmenů, které obsahovaly homologní gen *lmrC*, byl připraven fragment genu *lmrC* pro ligaci a transformaci. Nechala se znovu proběhnout PCR, vzorky se pak přečistily a zaligovaly do pGEM-T vektoru (viz kapitola 3.4). Následovala transformace do recipientních buněk *E. coli*. Po transformaci a vysetí na agarovou půdu proběhla modrobílá selekce s využitím reportérového genu *lacZ*. Narostlé bílé kolonie se použily pro další PCR z primerů klonovacího vektoru pUC M13. Vzorky, které na elektroforéze odpovídaly délce fragmentu *lmrC*, jsme přečistili a poslali na sekvenaci. (viz obr. 4.4)



**Obr. 4.4:** PCR z transformovaných buněk, šipky jsou u vzorků, které byly sekvenovány.

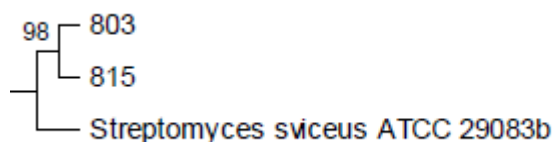
## 4.2 Analýza sekvenovaných kmenů

Fylogenetický strom sekvencí, které obsahovali gen *lmrC* je na obr. 4.5.

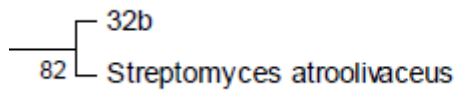


**Obr. 4.5:** Fylogram sekvencí *lmrC*

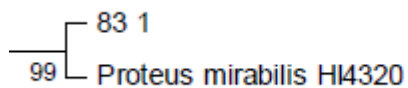
Podle kompletního fylogramu sekvenovaných genů *lmrC* a jejich podobností na základě dedukovaných aminokyselinových sekvencí jsou uvedeny jednotlivé větve obsahující sekvence z testovaných kmenů.



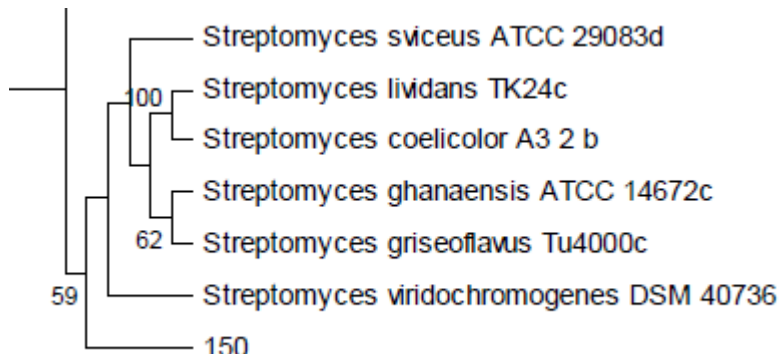
**Obr. 4.6:** Vzorke jsou podobné genu ze *S. svicensis*, ale gen ABC transportéru není zasazen do shluku spojeného se sekundárním metabolismem.



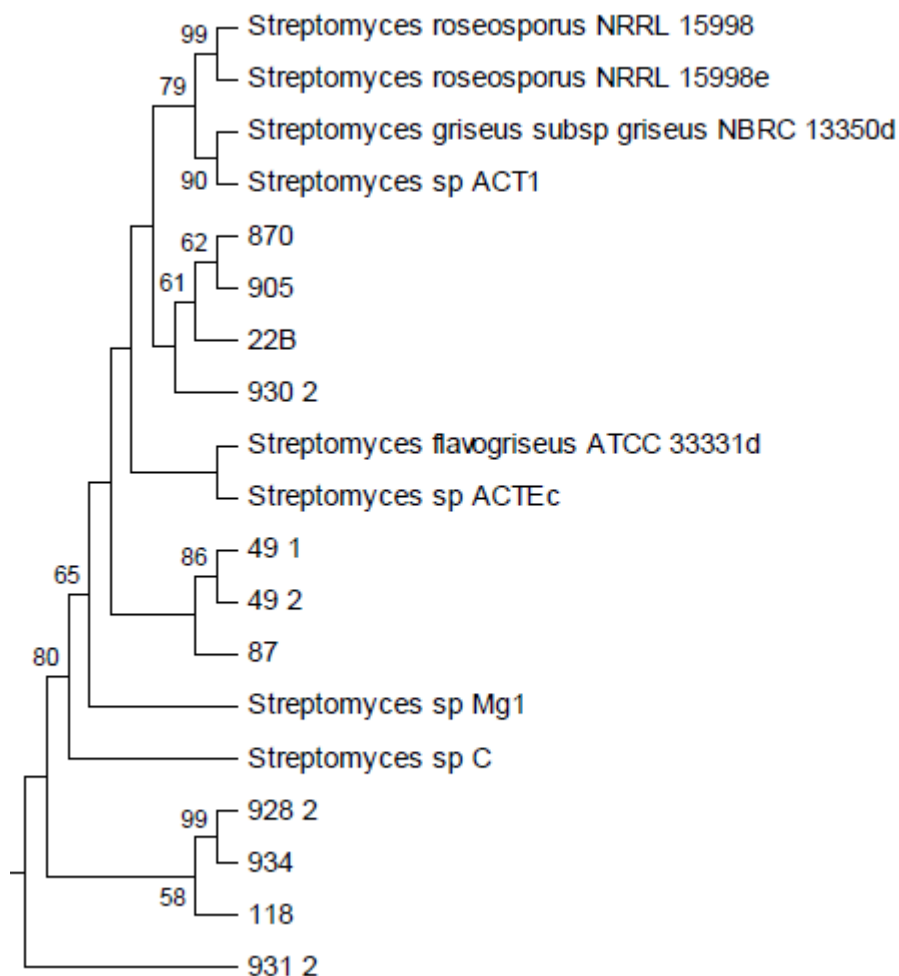
**Obr 4.7:** Vzorek 32b se podle aminokyselinové sekvence podobá genu ze *S. atroolivaceus*, kde je ABC transportér součástí shluku kódujícího biosyntetickou dráhu leinamycinu.



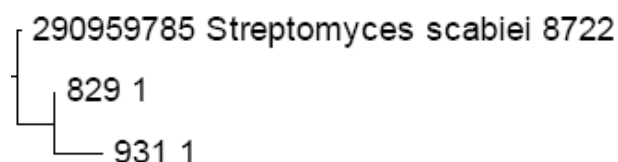
**Obr. 4.8:** Genom *Proteus mirabilis* obsahuje ABC transportér, který je součástí shluku rezistence proti antibiotiku.



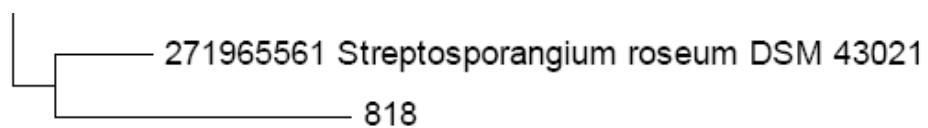
**Obr. 4.9:** Vzorek 150 se podobá genům z této skupiny bakterií. U *S. coelicolor* je gen ABC transportéru součástí shluku podílejícího se na metabolismu cukrů.



**Obr. 4.10:** Vzorky 22b, 870, 905, 930 2, 49 1, 49 2 a 87 jsou podle fylogenetického stromu podobné genu ze *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350d, který produkuje streptomycin, ale ABC transportér neleží v blízkosti žádného shluku kódujícího produkci antibiotika. Je zde ještě podobnost s genem ze *S. flavogriseus*, u kterého je ABC transportér součástí shluku, který pravděpodobně kóduje sekundárně metabolickou dráhu modifikace blíže neznámého sacharidu.



**Obr. 4.11:** Vzorek 829 1 i 931-1 má podobnost se *Streptomyces scabiei*. Shluk, ve kterém je kódován, má pravděpodobně funkci v produkci sekundárních metabolitů, kde se podílí na modifikaci molekuly sacharidů.



**Obr 4.12:** Vzorek 818 má podobnost s genem ze *Streptosporangium roseum*, který je součástí genového shluku pro biosyntézu bleomycinu.

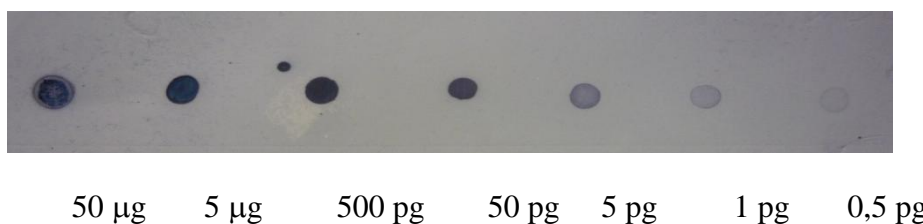
### 4.3 Genová výbava vybraných kmenů

Pro zjištění genové výbavy pomocí hybridizace jsme si vybrali 3 kmeny podle toho, že obsahují homolog ke genu *lmrB* a jejich sekvence jsou si relativně vzdáleny, dále jsme uvážili i přítomnost genu *lmrC* a lokalitu, ze které kmeny pocházejí:

- **49**: homology *lmrB*, *lmrC*, antibiotická aktivita proti *Kocuria rhizophila*, lokalita Srbsko
- **118**: homology *lmrB*, *lmrC*, antibiotická aktivita proti *Kocuria rhizophila*, lokalita Merkenstein
- **229**: homolog *lmrB*, lokalita Nechanice

Pro hybridizaci jsme potřebovali naznačit sondu. Naše sonda byla produktem PCR s primery pro amplifikaci fragmentu genu *lmrB*, protože tento gen obsahovaly všechny 3 kmeny. Po PCR jsme vzniklý produkt nechali podle návodu značit.

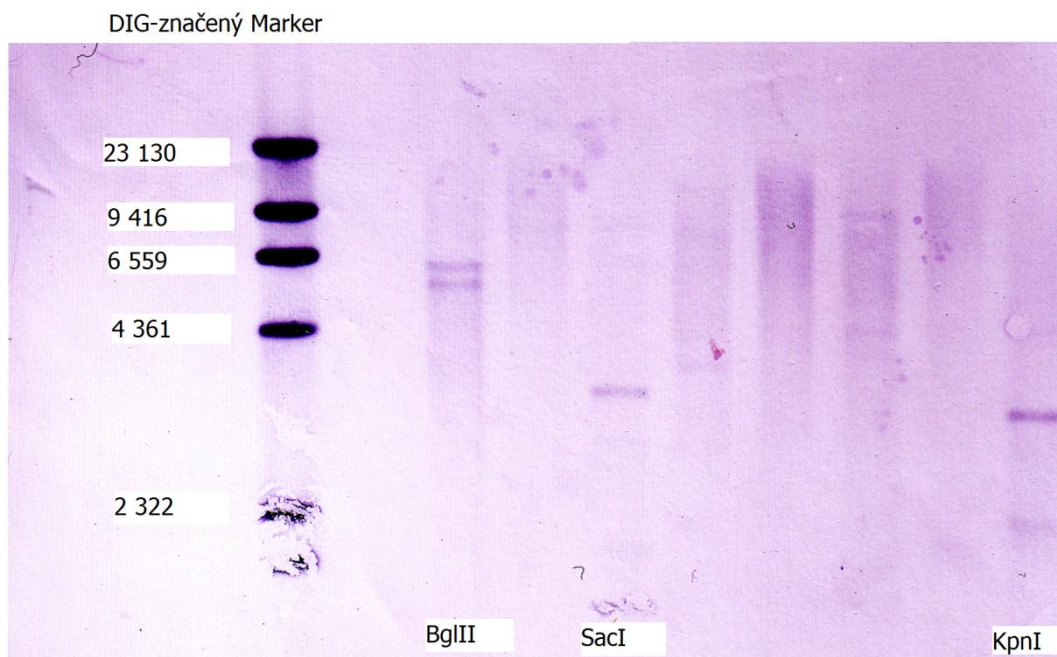
Ještě před vlastní hybridizací našich kmenů jsme vyzkoušeli citlivost membrány pomocí *dot blotu*. Nanášeli jsme DIG značenou sondu kmene 118. V návodu výrobce stálo, že je detekovatelné množství 3 pg, na naší membráně jsme byli schopni detekovat množství 0,5 pg.



**Obr. 4.13:** Citlivost membrány: zjišťována pomocí *dot blotu*

Po těchto přípravných krocích jsme se pustili do vlastního štípání, přenosu na membránu a hybridizace podle postupu popsaného v kapitole 3.7. Z našich třech kmenů se podařilo hybridizovat jediný kmen 118.

U kmene 118 jsme po hybridizaci zjistili, že je nejlépe štípan restrikčními endonukleázami *BgIII*, *SacI* a *KpnI*, jak naznačuje obr. 4.14.



**Obr. 4.14: Membrána s kmenem 118 po hybridizaci**

Fragmenty štípané jedním enzymem jsme vyřízli z gelu, přečistili a použili k přilgování adaptéru, popis v kapitole 3.4.1.

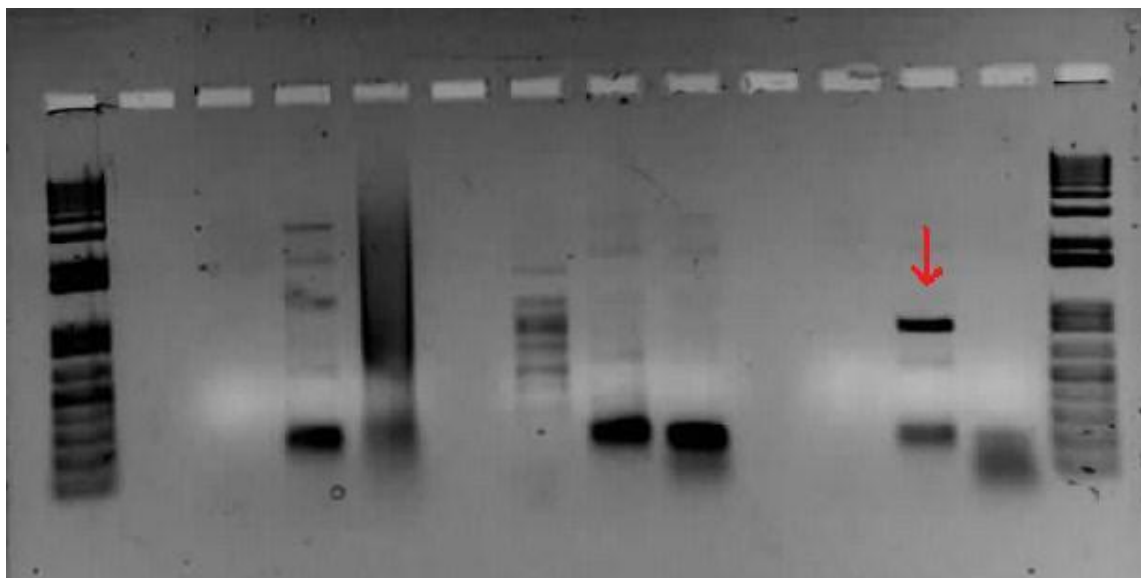
Po ligaci byl vzniklý fragment amplifikován pomocí PCR. Jako primer byl vždy použit jeden z řetězců adaptéru, a proti němu primer navržený ze známé sekvence homologu genu *lmrB* z kmene 118. Primery 118r a 118f sloužily jako kontrola přítomnosti fragmentu *lmrB*. Pro každý zaligovaný vzorek tak byly nakonec připraveny 3 PCR reakce.

**Tab 4.6: Použité primery pro PCR amplifikace ze zaligovaných vzorků**

štípání	primery
BglII	118r + 118f 118r + ClaI 118f + ClaI

SacI	118r + 118f 118r + KpnI 118f + KpnI
KpnI	118r + 118f 118r + SacI 118f + SacI

Elektroforéza ukázala, že jediná kombinace 118r + ClaI vyšla jako jasný band. Proto se tento jediný vzorek poslal na sekvenaci. (obr. 4.15)



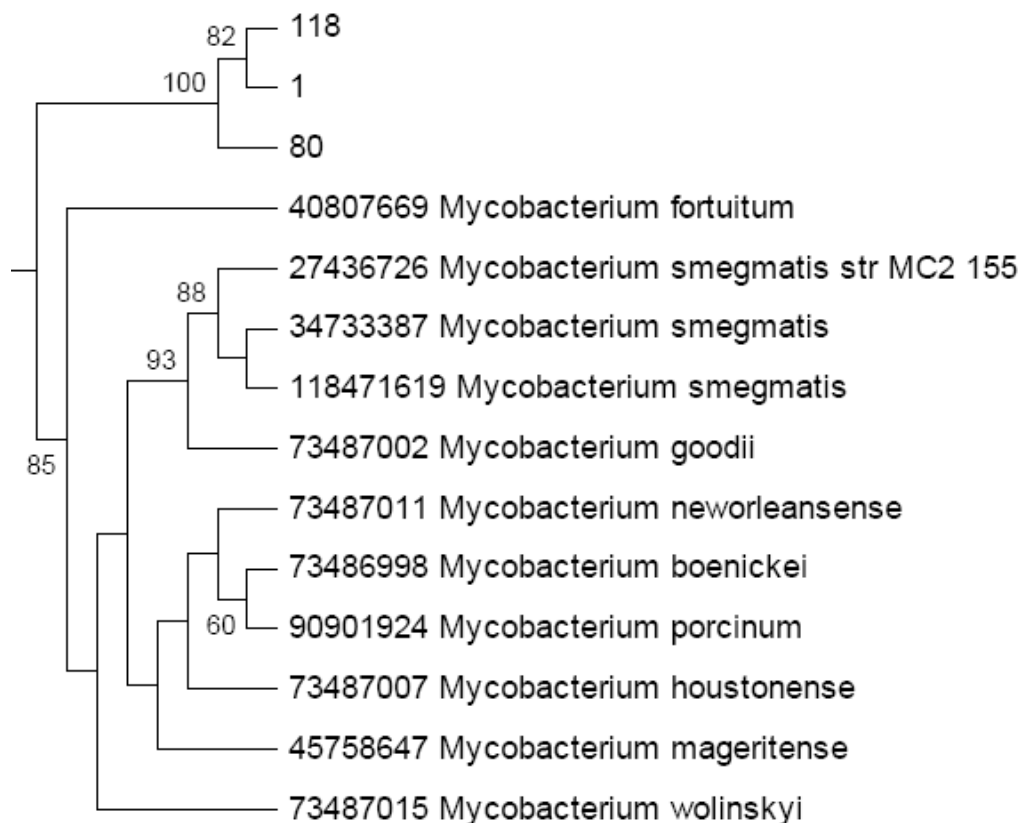
**Obr. 4.15:** Elektroforéza po PCR, šipkou označený vzorek je vzorek šípaný *Bgl*II a následně jako primery při PCR byly použity 118r a *Cla*I.



## 5 Diskuse

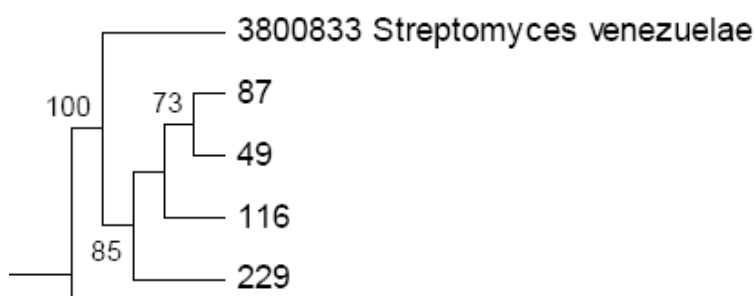
Pro posouzení vhodnosti homologů genu *lmrC* jako markerů přítomnosti antibiotických biosyntetických drah jsme porovnali výsledky fylogenetického stromu ze sekvencí homologů *lmrC* (viz obr. 4.6) s fylogramem sekvencí 16S rRNA genu a homologů dalšího rezistenčního genu *lmrB*, které jsme získali již dříve analýzou stejné sbírky kmenů. Gen *lmrB* je zodpovědný za rezistenci vůči linkomycinu - 23S RNA metyltransferáza patří do skupiny *erm* resistencí a je součástí genového shluku pro biosyntézu linkomycinu stejně jako gen *lmrC*. Metylace působí zkříženou rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminu B. Retrospektivní analýza *erm* genů v *Bacteroides* ukázala, že tyto geny byly šířeny rychle mezi lidskou populací v průběhu posledních tří desetiletí. To sehrálo velkou roli v rozvoji rezistence k těmto antibiotikům (AMINOV a MACKIE, 2007).

Fylogenetická analýza rozdělila sekvence našich *erm* genů do dvou skupin. První skupina se přiřadila k rezistenčním genům získaným z mykobakterií, druhá skupina k rezistenčnímu genu z aktinomycety *Streptomyces venezuelae*.



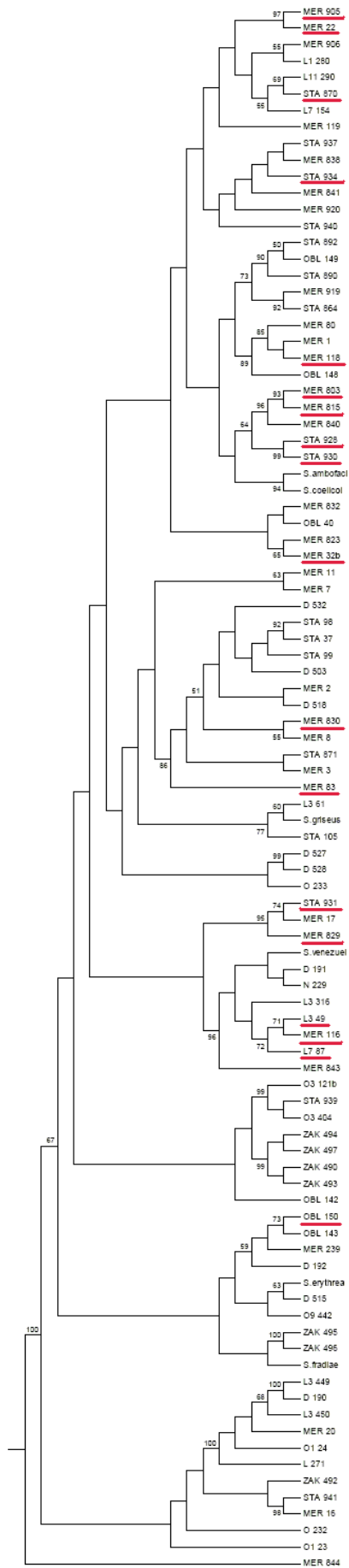
**Obr. 6.1: Porovnání kmenů obsahující gen *lmrB* ve fylogramu.**

Mycobakterie, patří do řádu *Actinomycetales*, ale nejsou známy produkcí antibiotik. Příslušný *erm* gen ani jeho homology nejsou součástí známého biosyntetického shluku.



**Obr. 6.2: Podobnost kmenů produkujících gen *lmrB* se *Str. venezuelae*.**

Naopak geny podobné tomu z kmene *S. venezuelae*, který je producentem antibiotik methymycinu a pikromycinu, mohou být součástí antibiotického biosyntetického shluku. To je podpořeno i tím, že se jedná o makrolidová antibiotika, kde je znám podobný mechanismus rezistence. Kmeny 49, 87 a 118 jsou zajímavé tím, že nesou homology k oběma studovaným genům *lmrC* i *lmrB*.



**Obr. 6.3: Fylogram kmenů sbírky podle genu pro 16S rRNA.** Červeně podtržené kmeny obsahovaly homolog genu *lmrC*.

Při porovnání fylogramu genu pro 16S rRNA používaného pro vyhodnocení taxonomické příbuznosti kmenů a fylogramu homologů resistenčního genu *lmrC* uvedeného ve výsledcích uvidíme rozdíly: Kmeny 905 a 22b klastrují spolu, ale kmen 870 se oddělí do jiné větve a 930 do ještě vzdálenější větve, i když poměry stále relativně odpovídají klastrování podle 16S. Kmeny 928, 934 a 818 klastrují podle 16S rRNA opět poměrně podobně. Podobné vzdálenosti jsou i mezi kmeny 815, 803, 32b a 830, kmen 829 je fylogeneticky poněkud vzdálenější než by odpovídalo podle *lmrC*. Kmeny 818 a 83 jsou ve fylogramu 16S rRNA vzdálenější než ve fylogramu *lmrC* stejně jako kmeny 828 a 931. Naopak kmeny 928-1, 931-1 jsou si vzdáleny podle *lmrC*, ale blíží se kmenům 815 a 829 podle fylogramu pro 16S rRNA. Kmeny 49 a 87 jsou si vzdálenější podle *lmrC* než podle 16S rRNA.

Jak je vidět z četnosti výskytu kmenů, primery byly specifitější při hledání genu *lmrC* u kmenů izolovaných ze zásaditých půd. Je to dáno nejspíše tím, že primery nasedají lépe na geny získané z půd se zásaditým pH, protože většina zatím známých producentů pochází právě z tohoto prostředí. Proto pokud bychom chtěli hledat nové aktinomycety z kyselejších půd, které by mohly obsahovat gen *lmrC*, bylo by nutné navrhnout nové primery. Zatím ale není jasné, jak by takové primery měly vypadat. Dá se to zjistit dvěma způsoby. Prvním je, že by se náhodou povedl záchyt takové bakterie a na základě jejího genu by se daly primery vyrobit. Druhým pak, že by se osekvenoval celý genom a s ním by se získala i přesná sekvence genu *lmrC*.

Každý kmen je pak vhodné vybrat k dalšímu studiu z různých důvodů. Podle samotného homologního genu *lmrB* se těžko usuzuje, protože obě skupiny mají určitý potenciál indikovat přítomnost antibiotického shluku, podle skupiny z mykobakterií by šlo o zcela neznámá antibiotika s určitým rizikem, že jde o úplně jinou funkci. Do této skupiny patří gen z kmene 118, který nese i homolog ke genu *lmrC* a tím se stává nejvhodnějším k výběru. Druhá skupina naopak ukazuje na určité antibiotikum značně podobné dvěma známým. Z této skupiny potom ještě kmeny 49 a 87 nesou oba sledované geny a tím se zvyšuje pravděpodobnost přítomnosti hledaného antibiotického shluku. Taxonomicky se jedná o příbuzné druhy i s kmenem 116, takže by stačilo

zaměřit se na jeden z těchto kmenů. Podle podobnosti s kmeny nesoucími známý homolog *lmrC* se kmeny 49, 87, 116 ale i 118 řadí k těm, kde sice ABC transportér není součástí známého genového shluku, ale okolní geny ukazují na možnost účasti na sekundárně metabolické modifikaci cukrů, která může představovat část biosyntézy neznámého antibiotika.

Porovnání zkoumaných kmenů provedené pouze podle fylogramu *lmrC* homologů by vedlo ke studiu kmene 32b, protože by mohl obsahovat shluk podobný leinamycinu, antibiotika s antikancerogenními účinky. Dále by bylo možné se zaměřit na kmen 118, který obsahuje oba sledované geny, ale je od ostatních poněkud vzdálen podle *lmrC*. Podobně by se daly charakterizovat i kmeny 931 1, 931 2 a 829 s tím, že u těchto kmenů už je značně nižší pravděpodobnost, že nalezený rezistenční gen s nějakým antibiotickým shlukem souvisí. Nejzajímavější kmen podle homologie s *lmrC* se zdá být 818, jehož gen pro ABC transportér je podobný genu z biosyntetického shluku antibiotika bleomycinu. Závěrem se dá shrnout, že kmeny, u nichž je nevyšší pravděpodobnost výskytu zajímavé antibiotické biosyntetické dráhy, a jsou tedy nejvhodnější pro další zkoumání, jsou kmeny 32b, 49, 87, 118 a 818.

## 6 Závěr

- Ve sbírce kmenů aktinomycet byly identifikovány ty, které nesly homology genu *lmrC*. Tento gen kóduje ATPásovou podjednotku ABC transportéru v biosyntetické dráze linkomycinu, a proto jeho homology mohou být součástí biosyntetických genových shluků sekundárních metabolitů. U produktů těchto genů se předpokládá podíl na transportu sekundárního metabolitu z buňky, čímž mohou u producentů zajišťovat zároveň určitou úroveň rezistence vůči vlastnímu produktu.
- Nalezené homology genu *lmrC*, byly klonovány a sekvenovány. Získané sekvence byly porovnány s podobnými již známými sekvencemi z databáze GenBank. Z fylogramu zkonstruovaného z našich klonovaných sekvencí a reprezentativního výběru sekvencí již popsanych jsem se pokusila odhadnout funkci nalezeného genu u daného kmene a kontext, v němž se může na chromozómu vyskytovat. Výsledky získané během této práce jsou součástí připravované publikace.
- ATPásová (cytoplazmatická) podjednotka ABC transportéru byla vybrána jako potenciální markerový gen pro screening producentů sekundárních metabolitů z toho důvodu, že mezi dvěma doménami společnými ATPasám, je úsek obsahující vazebné místo pro přenášenou látku, jehož sekvence tedy nese informaci o její struktuře. Výsledky ukázaly, že získané sekvence poskytují zajímavou informaci o genetické výbavě kmene, pro uplatnění metody k testování velkého počtu kmenů bude ale potřeba zvýšit specifitu primerů tak, aby se snížil podíl zachycených variant genu nesouvisejících se sekundárním metabolismem.
- Podobný přístup byl použit při analýze sekvencí rezistenčních *erm* genů získaných z téže sbírky kmenů. V tomto případě použité primery zachytily specificky varianty genu typické pro producenty. Kmeny nesoucí varianty genu *erm* zatím u streptomycet neznámé byly vybrány k izolaci a sekvenaci okolí genu. U prvního z těchto kmenů byly otestovány restriční enzymy vhodné pro štěpení chromozomální DNA a detekován fragment nesoucí hledaný gen hybridizací s homologní sondou. Výsledek bude využit pro další práci našeho týmu.

## 7 Seznam literatury

- **Achard, A., Villers C., Pichereau V. and Leclercq R.** (2005): New lnu(c) gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* ucn36. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2716-2719.
- **Aminov R. I., Mackie R. I.** (2007): Evolution and ecology of antibiotic resistance genes; *FEMS Microbiol Lett* 271; 147–161.
- **Anderson A. S. and Wellington E. M. H.** (2001): The taxonomy of *Streptomyces* and related genera; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 797-814.
- **Argoudelis A.D., Coats J. H., Mason D. J., Sebek O. K.** (1969): Microbial transformation of antibiotics III, Conversion of clindamycin to 1'-demethylclindamycin and clindamycin sulfoxide by *Streptomyces sp.*; *J. Antibiot.* 22: 309-314.
- **Argoudelis A. D., Coats J. H. a Pyke T. R.** (1972): Lincomycin production. *US Patent* 3 697 380.
- **Argoudelis S, A. D., Coats J. H.** (1977): Microbial transformation of antibiotics clindamycin ribonucleotides; *Journal of Antibiotics* 30: 474-487.
- **Ausubel F. A., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K.** (1998): Current protocols in molekular biology. *John Wiley and Sons*, New York.
- **Bentley, S. D., Chater K. F., Cerdeño-Tárraga A. - M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.-H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M. - A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J. and Hopwood D. A.** (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *streptomyces coelicolor* a3(2). *Nature* 417: 141-147.
- **Bérdy J.** (2005): Bioactive Microbial Metabolites; *J. Antibiot.* 58(1): 1-26.

- **Bibb, M. J.** (2005): Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 8: 208-215.
- **Brahme N. M., Gonzales J. E., Rolls J. R., Hessler E. J., Mizsak S., Hurley L. H.** (1984): Biosynthesis of the lincomycin, 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycin A and B, *J. Am. Chem. Soc.* 106: 7878-83.
- **Burianková K., Doucet-Populaire F., Dorson O., Gondran A., Ghnassia J. – C., Weiser J. and Pernodet J. – L.** (2004): Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the mycobacterium tuberculosis complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 143-150.
- **Calcutt, M. J. and Cundliffe, E.** (1990): Cloning of a lincosamide resistance determinant from streptomyces-caelestis, the producer of celesticetin, and characterization of the resistance mechanism. *Journal of Bacteriology* 172: 4710- 4714.
- **Clark, A. M.** (1996): Natural products as a resource for new drugs, *Pharmaceut Res* 13:1133-1141.
- **Coates, A. R. M. and Hu, Y.** (2007): Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology* 152: 1147-1154.
- **Coats J. H., Li G. P., Kuo M. S., Yurek D. A.** (1989): Discovery, production and biological assay of an unusual flavenoid cofactor involved in lincomycin biosynthesis. *J. Antibiot. Tokyo* 42: 472-4.
- **Čermák L., Kopecký J., Novotná J., Omejka M., Parkhomenko N., Plháčková K., Ságová-Marečková M.** (2008): Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment; *Applied Soil Ecology* 40: 348 – 358.
- **Davidson A. L., Dassa E., Orelle C. and Chen J.** (2008): Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems; *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, p. 317–364.
- **Dean M., Hamon Y. and Chimini G.** (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily; *Journal of Lipid Research*, Volume 42.
- **Fatht M. J. and Kolter R.** (1993): ABC Transporters: Bacterial Exporters; *Microbiological Reviews*, p. 995-1017.



- **Fuksa L., Mičuda S., Cermanová J., Brčáková E., Štaud F.** (2006): Fyziologická funkce MRP2; *Československá fyziologie* 55, č. 2.
- **Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J. and Sarkadi B.** (2004): The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity; *Current Drug Delivery, 1*, 27-42 27.
- **Heir, E., Lindstedt B. - A., Leegaard T. M., Gjernes E. and Kapperud G.** (2004): Prevalence and characterization of integrons in blood culture enterobacteriaceae and gastrointestinal escherichia coli in norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 3: 12.
- **Higgins C.F., Hyde S.C., Mimmack M.M., Gileadi U., Gill D.R., Gallagher M.P.** (1990): Binding protein-dependent transport systems; *J Bioenerg Biomembr.* Aug;22(4):571-92.
- **Hopwood, D. A., Chater K. F., Bibb M. J.** (1995): Genetics of antibiotic production in *streptomyces coelicolor a3(2)*, a model streptomycete. *Biotechnology* 28: 65-102.
- **Hung L.-W., Nikaido K., Liu P.-Q., Ames G. F.-L. and Kim S.-H.** (1998): Crystal Structure of the ATP-binding Subunit of an ABC Transporter; *Nature*, 396, 703-707.
- **Hurley L. H.** (1980): Elucidation and formulation of novel biosynthetic pathways leading to the pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics anthramycin, tomaymycin, and sibiromycin. *Acc. Chem. Res.* 13: 263-9.
- **Charles, P. G. P. and Grayson, M. L.** (2004): The dearth of new antibiotik development: Why we should be worried and what we can do about it. *Medical Journal of Australia* 181.
- **Chater K. F. and Chandra G.** (2006): The evolution of development inStreptomyces analysed by genome comparisons; *FEMS Microbiol Rev* 30 651–672.
- **Chung S. T., Manis J. J., McWethy J., Patt T. E., Witz D. F., Wolf H. J., Wovcha M. G.** (1997): Fermentation, biosynthesis and molecular genetics of lincomycin, *Biotechnology of industrial antibiotic*, Strohl W.R. (ed.) New York 165-186.

- **Janata, J., Najmanová L., Novotná J., Holá K., Felsberg J. and Spížek J.** (2001): Putative lmbi and lmbh genes form a single lmbih orf in streptomyces lincolnensis type strain atcc 25466. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 79: 277-284.
- **Kerr, J. R.** (1999): Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity; *Microbial Ecology in Health and Disease*; Vol. 11, No. 3, 129-142.
- **Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F. and Hopwood D. A.** (2000): Practical streptomyces genetics. Norwich, UK, John Innes Foundation.
- **Kuo M. S., Yurek D. A., Coats J. H., Chung S. T. a Li G. P.** (1992): Isolation and identification of 3-propylidene- $\beta$ -pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J. Antibiot.* Tokyo 45: 1773-7.
- **Lincová D., Farghali H.** (2007): Základní a aplikovaná farmakologie; *Galén*, Praha.
- **Luzhetskyy A., Pelzer S., Bechthold A.** (2007): The future of natural products as a source of new antibiotics. *Current Opinion in Investigational Drugs* 8: 608-613.
- **Marshall V. P., Liggett W. F., Ciadella J. I.** (1989): Enzymic inactivation of lincosaminide and macrolide antibiotics - divalent metal cation and coenzyme specificities. *Journal of Antibiotics* 42: 826-830.
- **McCormick J. R. D., Morton G. O.** (1982): Identity of cosyntetic factor 1 of *Streptomyces aureofaciens* and fragment FO from coenzyme F420 of Methanobacterium species. *J. Am. Chem. Soc.* 104 : 4114-5.
- **Mukhopadhyay, A. a Peterson, R. T.** (2006): Fishing for new antimicrobials. *Current Opinion in Chemical Biology* 10: 327-333.
- **Nedal A. and Zotchev, S. B.** (2004): Biosynthesis of deoxyaminosugars in antibiotic-producing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 7-15.
- **Nezbedová Š.** (2002): Pleiotropní efekt inaktivace ppk genu u bakterie *Streptomyces lividans*. Seminární práce. Katedra genetiky a mikrobiologie. Přírodovědecká fakulta University Karlovy. Praha.
- **Novotná 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: 4070-4076.

- **Ochman H., Lawrence J. G. and Groisman E. A.** (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation; *Nature*, Vol 405.
- **Peschke U., Schmidt H., Zhang H. Z., Pipersberg W.** (1995): Molecular characterisation of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11, *Mol.Microbiol.* 16: 1137-1156.
- **Pissowotzki K., Mansouri K., Piepersberg W.** (1991): Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes strELMB2N. *Mol Gen Genet* 231:113–123.
- **Sedláček, I.** (2007): Taxonomie prokaryot. Brno, Masarykova univerzita.
- **Shivakumar A. G. and Dubnau D.** (1981): Characterization of a plasmid-specified ribosome methylase associated with macrolide resistance. *Nucleic Acids Research* 9: 2549-2562.
- **Spížek J., Novotná J., Řezanka T.** (2004): Lincosamides: Chemical structure, Biosynthesis, Mechanism of Action, Resistance, and Applications; *ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY, VOLUME 56*.
- **Spížek J., Řezanka T.** (2004): Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis; *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 510–519.
- **Szakacs G., Váradi O., Laczka C. and Sarkadi B.** (2008): The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox); *Drug Discovery Today*, Volume 13, Numbers 9/10.
- **Thompson, C. J., Fink D. and Nguyen L. D.** (2002): Principles of microbial alchemy: Insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology* 3: 1020.1021- 1020.1024.
- **Torsvik, V., Sorheim, R., Goksoyr J.** (1996): Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J Indust Microbiol*; 17: 170-178.
- **Van Wezel, G. P. and Vijgenboom, E.** (2004): Novel aspects of signaling in *Streptomyces* development. *Advances in Applied Microbiology* 56: 65-88.
- **Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F. and Van Sinderen D.** (2007): Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum; *GENOMICS OF ACTINOBACTERIA, VOL. 71*.

- **Watve M. G., Tickoo R., Jog M. M., Bhole B. D.** (2001): How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?; *Arch Microbiol* 176 :386–390.
- **Weber, T., Welzel K., Pelzer S., Vente A. and Wohlleben W.** (2003): Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *Journal of Biotechnology* 106: 221-232.
- **Wildermuth, H.** (2002): Development and organization of aerial mycelium in *streptomyces-coelicolor*. *Journal of General Microbiology* 60.
- **Wilson E. K.:** Picking the winners. *Chem Eng News*; 80: 35-39.
- **Witz D. F., Hessler E. J., Miller T. L.** (1971): Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry* 10 : 1128-33.
- **Zhang, H. Z., Schmidt H., Piepersberg W.** (1992): Molecular-cloning and characterization of 2 lincomycin-resistance genes, *imra* and *imrb*, from *streptomyces-lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology* 6: 2147-2157.
- **Zhang L., Demain A. L.** (2005): Natural Products, *Humana Press*, Totowa, New Jersey
- Antibiotikum:  
<http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Antibiotikum&oldid=5121755> [cit. 2010-03-12]
- ATP-binding domain of ABC transporters: [http://en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding\\_domain\\_of\\_ABC\\_transporters](http://en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding_domain_of_ABC_transporters). [cit. 2010-03-15]
- **Strásky A.:** <http://www.sci.muni.cz/mikrob/protokolyFRVS.pdf> [cit. 2010-03-10]