

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

SPECIÁLNÍ CHEMICKO-BIOLOGICKÉ OBORY
MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A BIOCHEMIE ORGANISMŮ



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Rezistence k antibiotikům udílená proteiny ARE podrodiny ABC proteinů
Resistance to antibiotics award given ARE subfamily protein of ABC proteins

Ludmila Veselá

Školitel: Mgr. Gabriela Novotná Ph.D.

Praha, 2011/2012

Prohlášení:

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

V Praze, 27. 8. 2012

Podpis

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Mgr. Gabriele Novotné Ph.D. za vedení a cenné připomínky k mé bakalářské práci a také za její trpělivost.

Zároveň bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za psychickou podporu a za jejich shovívavost během mé práce na mé závěrečné práci.

Obsah

Seznam užitých zkratk.....	5
Abstrakt	6
Klíčová slova.....	6
1. Úvod.....	7
2. Antibiotika.....	7
2.1. Streptograminy	8
2.2. Makrolidy	8
2.3. Linkosamidy	10
2.4. Pleuromutiliny	10
3. Rezistence k makrolidům, linkosamidům streptograminům (MLS) a pleuromutilinům.....	10
3.1. Rezistence způsobená změnou zásahového místa	10
3.2. Rezistence způsobená snížením akumulace antibiotika v buňce.....	11
3.3. Rezistence způsobená inaktivací antibiotika	12
4. ABC proteiny	13
4.1. Struktura ABC proteinů.....	14
4.1.1. TMD doména	14
4.1.2. NBD doména.....	14
4.2. Klasifikace.....	17
4.2.1. I. třída ABC proteinů.....	17
4.2.2. III. třída ABC proteinů	18
4.2.3. II. třída ABC proteinů	18
5. ARE podrodina ABC proteinů	19
6. OleB a OleC	19
7. Vga proteiny	20
8. Msr proteiny	23
9. Aktivní transport, nebo pasivní difuze?.....	24
10. Závěr.....	26
Seznam použité literatury.....	27

Seznam užitých zkratk

ABC protein	ATP-binding cassette protein	ATP-vazebný protein
ARE rodina	antibiotic resistance family	rodina antibiotik rezistentních proteinů
ART	antibiotic resistance and translation regulation	rezistence k antibiotikům a translace regulace
BPD	binding protein dependent	závislý na vazebném proteinu
DMT	drug/metabolite transporter	lékový/metabolitový transportér
ECF	energy coupling factor	faktor spřažující energii
EF-3	translation elongation	
Erm	erythromycin-resistant methylases	erytromycin-rezistentní methylázy
LP	leader peptid	
LUCA	the last universal common ancestor	poslední univerzální společný předek - buňka
MATE	multidrug and toxic compound extrusion	
MFO	membrane fusion protein	
MFS	major facilitator superfamily	
ML	macrolide and lincosamide	makrolidy a linkosamidy
MLS	macrolide, lincosamide and streptogramin	makrolidy, linkosamidy a streptograminy
MLS _B	macrolide, lincosamide and streptogramin B	makrolidy, linkosamidům a streptograminům B
MS _B	macrolide and streptogramin B	makrolidy a streptograminy B
NBDs	nucleotid binding domains	nukleotid vazebné domény
OM	oleandomycin	oleandomycin
OMF	outer membrane factor	vnější membránový faktor
ORFs	open reading frames	otevřené čtecí rámce
REG	gene expression regulativ	regulace genové exprese
RND	resistance-nodulation-division	
rRNA	ribosomal ribonucleic acid	ribozomální ribonukleová kyselina
SBP	solute-binding protein	rozpustný vazebný protein
SgA	streptogramin A	streptogramin A
SgB	streptogramin B	streptogramin B
SMR	small multidrug resistance	malá multiléková rezistence
TMD	transmembrane domains	transmembránová doména
tRNA	transfer ribonucleic acid	transferová ribonukleová kyselina
UVR	DNA repair and drug resistance	DNA oprava a léková rezistence

Abstrakt

Hlavním tématem této práce je ARE podrodina ABC transportérů. Důležitost proteinů této podrodiny spočívá v tom, že udělují rezistenci k několika skupinám klinicky důležitých antibiotik: makrolidům, linkosamidům, streptograminům a pleuromutilinům a to u významných patogenů jakým je např. *Staphylococcus aureus*. Na rozdíl od klasických ABC transportérů struktura ARE proteinů postrádá transmembránovou doménu (TMD) a prozatím nebyl nalezen ani interagující transmembránový protein. Z toho důvodu není jasný mechanismus udílení rezistence. V práci diskutujeme obě navrhované hypotézy mechanismu funkce těchto proteinů. První je aktivní efflux antibiotika ven z bakterie. Druhá hypotéza spočívá v uvolnění antibiotika z jeho vazebného místa, které je iniciované ARE proteiny, a jeho následná pasivní difuze ven z buňky.

Klíčová slova: ABC proteiny, ARE proteiny, rezistence, MLS, Vga

Abstract

The main topic of this thesis is the ARE subfamily of ABC transporters. The importance of the proteins of this subfamily lies in the fact that they confer resistance to several classes of clinically important antibiotics: macrolides, lincosamides, streptogramines and pleuromutilines and they do it in significant pathogens, as for example *Staphylococcus aureus*. Compared to canonical ABC transporters, the structure of ABC proteins lacks the transmembrane domain (TMD) and so far, there where not even found an integrating transmembrane protein. Due to these facts, the mechanism of resistance conferred by these proteins remains unclear. In the thesis, both suggested hypotheses of the mechanism of how these proteins work are discussed. The first hypothesis presumes the active efflux of antibiotics out of the bacteria. The second hypothesis suggests release of antibiotic from its binding site initiated by ARE proteins, followed by its passive diffusion out of the cell.

Keywords: ABC proteins, ARE proteins, resistance, MLS, Vga

1. Úvod

Problém rezistence k antibiotikům je jedním z velkých celosvětových problémů. Ironií je, že již objevitel penicilínu, Alexander Fleming, varoval před nevhodným používáním antibiotik. Sám totiž zaznamenal existenci bakterií, které byly schopny růst na médiu s přidaným penicilínem.

„... největším zlem samovolné terapie je užívání nízkých dávek, jehož následkem se mikroby místo zdolání infekce natrénují jak penicilinu vzdorovat, v těle se pak pomnoží, přejdou na další jedince, od nich zase na další, až nakonec u někoho vyvolají sepsi nebo pneumonii, již už penicilin nebude schopen vyléčit.“

The New York Times dne 26. června 1945, A. Fleming

Po zavedení perorální formy penicilínu nastal velký průlom v jeho dostupnosti pro širší veřejnost, neboť po uvedení na trh byl penicilín po nějakou dobu volně prodejným lékem (Levy, S. B., 2007). V roce 1940 vychází první článek o tom, že za rezistencí k penicilínu je zodpovědný enzym, jehož přítomnost ovlivňuje senzitivitu kultur k penicilínu (Abraham, E.P. et al., 1940).

Tato varování se vyplnila a netýkají se jen penicilínu. Po prvotním polevení ve výzkumu antibiotik způsobené vírou, že jsme nad bakteriálními nemocemi zvítězili, se začaly objevovat rezistence a to se stále vyšší frekvencí i u závažných patogenů jako je např. *Staphylococcus aureus* (Levy, S. B., 2007; Neu, H. C., 1992).

Kvůli zvyšujícímu se problému s rezistencemi, se zkoumají mechanismy jejich vzniku. Mezi příčinami vzniku rezistence figuruje také podrodina ARE proteinů. Cílem této práce je nastínit základní informace o této, z hlediska funkce, ne zatím příliš dobře prozkoumané, podrodině proteinů a ukázat možné směry dalšího výzkumu.

2. Antibiotika

Antibiotika poprvé definoval Selman A. Waksman v první polovině 50. let 20. století, jako chemickou substanci bakteriálního původu, která je schopna inhibovat růst a metabolismus bakterií a jiných mikroorganismů (Waksman, S. A., 1947). Klinicky významná antibiotika se mohou rozdělovat, mimo jiné, na základě jejich mechanismu účinku (Tab. 1). Níže popsaná antibiotika patří do skupiny inhibitorů proesyntézy.

Mechanismus účinku	Antibiotika
Inhibice proteosyntézy	Makrolidy, ketolidy Linkosamidy, streptograminy Chloramfenikol Viomyciny Aminoglykosidy Tetracykliny Fusidová kyselina Mupirocin
Inhibice DNA syntézy	Novobiocin Chinolony
Inhibice RNA syntézy	Rifamyciny
Inhibice syntézy buněčné stěny	β -Laktamy, glykopeptidy cykloserin
Inhibice methyltransferasou	Sulfamethoxazol, trimethoprim

Tabulka 1: Mechanismus účinku hlavních antibakteriálních tříd. (převzato a upraveno z Retsema J. et. al., 2001)

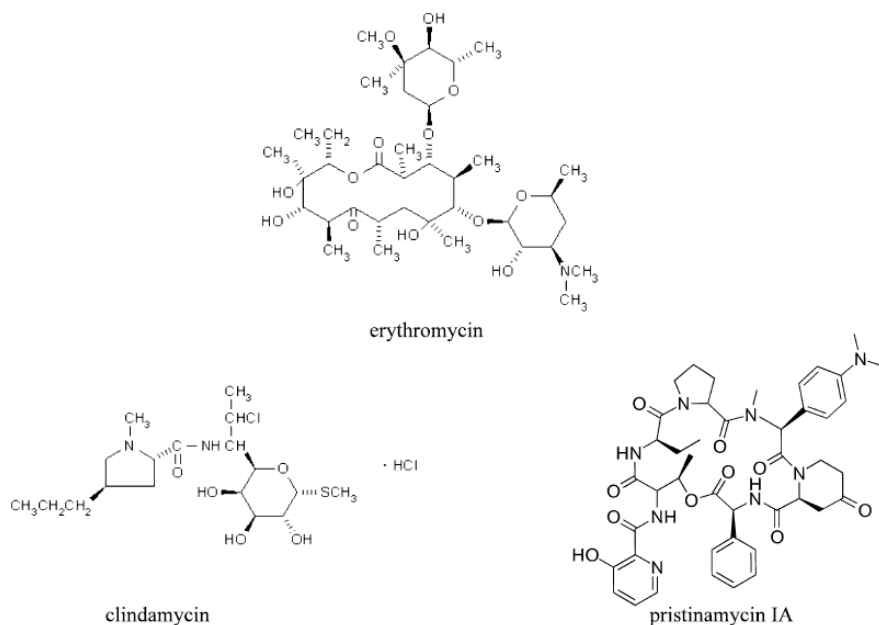
2.1. Streptograminy

Streptograminy se skládají ze dvou typů sloučenin rozdělených na základě jejich primárních struktur, a to na streptograminy A (SgA) a streptograminy B (SgB). Streptograminy A jsou polynesaturované cyklické peptidy a antibiotika patřící do této skupiny jsou např. pristinamycin IIA, virginiamycin M nebo dalfopristin. Streptograminy B mohou být reprezentovány antibiotiky, jako jsou pristinamycin IA (obr. 1), virginiamycin S nebo quinupristin. V tomto případě se jedná o cyklické hexadepsipeptidy (Cocito, C., 1979). Pokud se SgA a SgB používají jednotlivě, mají bakteriostatické účinky. Při společném použití se mohou stát baktericidními (Haroche, J. et. al., 2000; Vannuffel, P. et. al., 1996; McCafferty, D. G. et. al., 1999). Směsi SgA a SgB se využívají při léčení infekcí způsobených gram-pozitivními bakteriemi. Směs streptograminů quinupristin-dalfopristin (Synercid) je používána proti gram-pozitivním kokům, které jsou rezistentní k jiným antibiotikům. (Haroche, J. et. al., 2000).

SgA i SgB se váží každý do jiné části peptidyltransferasového místa velké 50S podjednotky bakteriálního ribozomu a tím dochází k disociaci peptidyl-tRNA, čímž inhibují proteosyntézu (Tenson, T. et. al., 2003). Streptogramin A svou vazbou změní konformaci ve vazebném místě pro streptogramin B, čímž sníží jeho disociační konstantu a zvýší afinitu (Vannuffel, P. et. al., 1996; McCafferty, D. G. et. al., 1999).

2.2. Makrolidy

Tato skupina antibiotik je známá více jak pět desetiletí. Jsou používána jak ve veterinární, tak i v klinické praxi. Využívají se pro léčbu infekcí způsobenou gram-pozitivními koky rodu



Obrázek 1: Chemické struktury makrolidu erythromycinu, linkosamidu klindamycinu a streptograminu typu B pristinamycinu IA (převzato z Reynolds, E. et al., 2003)

Staphylococcus a *Streptococcus*, a rovněž proti *Legionella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Chlamydia* a některým zástupcům z rodu *Mycobacterium*. Makrolidy obsahují laktonový kruh o různé velikosti s připojenými amino nebo neutrálními, dvěma a více cukry (Leclercq R., 2002). Mohou být klasifikovány v závislosti na počtu uhlíkových atomů v kruhu (Retsema J., 2001). Tabulka 2 ukazuje přehled některých antibiotik i s jejich původem. Zvyšující se úroveň rezistence k makrolidům vedla k vytvoření nové semisyntetické skupiny odvozené od erythromycinu ketolidů. Ketolidy jsou účinné i proti bakteriím rezistentním k erythromycinu (Denis, A. et. al., 1999).

Makrolidy se reversibilně váží k peptidyltransferasovému místu na velké podjednotce bakteriálního ribozomu. Předpokládá se, že se váží v blízkosti konce polypeptidového výstupového tunelu a způsobují disociaci peptidyl-tRNA z ribozomu, čímž inhibují proteosyntézu (Tenson, T. et. al., 2003). Mechanismus působení 14- a 15-členných makrolidů nemusí být identický s mechanismem 16-členných makrolidů (Retsema, J. et. al., 2001).

Antibiotikum	Počet uhlíkových atomů v kruhu	Původ
Erythromycin*	14	Bakteriální
Azithromycin	15	Semisyntetický
Klarithromycin	14	Semisyntetický
Oleandomycin	14	Bakteriální
Spiramycin	16	Bakteriální

Tabulka 2: Přehled některých makrolidů; * zobrazen na obr.1

2.3. Linkosamidy

Mezi linkosamidy patří linkomycin a jeho semisyntetický derivát klindamycin (obr. 1). Linkosamidové vazebné místo se částečně překrývá s tím pro streptograminy B a dle struktur pořízených F. Schlünzenem a kol., linkosamidy interagují s A- a P- místem ribozomu. Tedy i linkosamidy inhibují proteosyntézu bakterií (Schlünzen, F., 2001).

2.4. Pleuromutiliny

Pleuromutiliny, stejně jako antibiotika zmíněná výše, inhibují bakteriální proteosyntézu interakcí s velkou 50S ribozomální podjednotkou (Yan, Kang, 2006). Jedná se o tricyklické sloučeniny s mutilinovým jádrem. Na C₂₁ se vyskytuje keto skupina, která hraje roli v antimikrobiálních vlastnostech těchto látek a na C₁₄ se nalézají různé substituenty (Davidovich, Chen, 2007).

Pleuromutiliny se hlavně využívají ve veterinární praxi, tiamulin a valnemulin, a jeden zástupce, retapamulin, našel uplatnění v klinické praxi. Např. v USA se používá na léčení kožní nemoci impetigo, způsobované bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus pyogenes* (Jacobs, Michael R., 2007; Gentry, D. R., 2008).

3. Rezistence k makrolidům, linkosamidům streptograminům (MLS) a pleuromutilinům

Obecně může být rezistence k antibiotikům způsobena třemi různými mechanismy: (i) změnou zásahového místa; (ii) snížením akumulace antibiotika v buňce a (iii) inaktivací antibiotik (Wright, G. D., 2005; Butaye, P. et al., 2003). Různé typy rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminům v sobě zahrnují všechny tyto tři základní mechanismy. Jak již bylo řečeno, MLS antibiotika se váží na velkou 50S podjednotku prokaryotního ribozomu, kde způsobují disociaci peptidyl-tRNA a inhibují proteosyntézu. Podle výzkumů MLS antibiotika interagují s doménou V 23S rRNA a některými proteiny velké podjednotky (Vester, B. et al., 2001).

3.1. Rezistence způsobená změnou zásahového místa

Prevence interakce antibiotika s jeho vazebným místem spočívá ve změně tohoto místa. Může se tak dít buď vlivem mutace, nebo pomocí genu kódujícího enzym, který toto místo

modifikuje, např. metylací. Protože MLS antibiotika mají podobné místo účinku, tak změna vazebného místa způsobuje zkříženou rezistenci k více antibiotikům na rozdíl od dalších rezistenčních mechanismů, kde je spektrum rezistence užší (Leclercq, R., 2002).

Jako příklad rezistence způsobené mutací v zásahovém místě můžeme uvést rezistenci k makrolidům a linkosamidům (ML). ML rezistence je způsobená bodovými mutacemi v pozici A2058 nebo A2059 v doméně V 23S rRNA. Pokud se objeví obě mutace zároveň, rezistence se rozšíří na fenotyp MLS_B, tedy rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminům B. Jednotlivé bakteriální druhy se liší svým počtem kopií genu pro 23S rRNA, přičemž mutace nemusí být obsažena ve všech kopiích genu (Leclercq, R., 2002). Avšak podle počtu alel nesoucích mutaci, je ovlivněna i intenzita rezistence, kterou tato mutace udílí. Dalším typem je rezistence způsobená mutacemi ribozomálních proteinů, které se také podílejí na vazbě antibiotika na ribozomu. Mutace v proteinech L4 a L22 udílí rezistenci k erythromycinu, jak bylo pozorováno na klinických izolátech *Streptococcus pneumoniae*. U L4 byla např. pozorována mutace ve vysoce konzervované sekvenci, kde došlo ke změně tří aminokyselin na pozicích 69 – 71 (GTG → TPS). Tato mutace vyvolává vysokou hladinu rezistence k erythromycinu (Tait-Kamradt, A. et al., 2000). Studie na *Escherichia coli* ukázala, že mutace v proteinu L3 může naopak vést k rezistenci k tiamulinu (Bøsling, J. et al., 2003).

Další variantou, je rezistence způsobená enzymatickou modifikací cílového místa. Velmi často se geny pro tyto enzymy objevují na plasmidech nebo transposonech. Erm (erythromycin-resistant methylases) je velká rodina proteinů modifikujících 23S rRNA čítajících téměř 40 proteinů. Enzymy této rodiny katalyzují N_{6,6}-dimetylaci adeninu v pozici 2058 na 23S rRNA, čímž způsobují rezistenci ke všem 14- a 15-členným makrolidům. Při konstitutivní expresi udílí tyto enzymy rezistenci také k 16-členným makrolidům, linkosamidům a streptograminu B. Geny kódující Erm metyltransferázu byly nalezeny v kmenech *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Bacillus* (Leclercq, R., 2002; Chu Daniel TW., 1999).

3.2. Rezistence způsobená snížením akumulace antibiotika v buňce

Snížení akumulace antibiotik v buňce může být způsobeno buď snížením permeability membrány nebo aktivním effluxem (Leclercq, R. et al., 1991). Aktivní efflux MLS antibiotik je zprostředkováván transportními proteiny, které se dělí na Major Facilitator superfamily (MFS) a ABC proteiny. Kromě těchto dvou velkých rodin existují další rodiny transportérů,

jako RND (resistance-nodulation-division) rodina, SMR (small multidrug resistance) rodina (člen velké nadrodiny DMT (drug/metabolite transporter)) a MATE (multidrug and toxic compound extrusion) (Butaye, P. et al., 2003; Putman, M. et al., 2000).

Proteiny MFS většinou obsahují 12 – 14 transmembránových segmentů a nemají NBDs. Jako energii pro transport, nejčastěji antiport, využívají H^+ gradient na membráně. Mezi nejznámější geny této skupiny, udílející rezistenci k MLS antibiotikům patří Mef(A), Mef(E), nebo Lmr(A), který byl nalezen u producenta linkomycinu *Streptomyces lincolnensis* (Butaye, P. et al., 2003).

ABC proteiny využívají pro efflux energii z hydrolyzy ATP. Do této skupiny patří ARE proteiny, které udílejí rezistenci k makrolidům, linkosamidům, streptograminům a pleuromutilinům (Butaye, P. et al., 2003). Můžeme je nalézt jak u patogenů, tak i v půdních bakteriích produkujících antibiotika, které se bez rezistence ke svým toxickým produktům neobejdou. Mezi tyto bakterie se hojně řadí rod *Streptomyces* (Méndez, C., et al., 2001). Proteiny této skupiny mají dvě NBDs, ale není pro ně identifikována transmembránová komponenta (Davidson A.L., et al., 2008). Mezi nejznámější proteiny patří Msr(A), udílející rezistenci k SgB a makrolidům (Ross, J. I. et al., 1990), Vga(A) a Vga(B) poskytující ochranu proti SgA a směsi SgA a SgB (Chesneau, O. et al., 2005) a Lsa (A) spojený s rezistencí k linkosamidům a SgA (Singh, K. V., et al., 2002). U producentů můžeme nalézt proteiny jako OleB, Lmr(C), Car(A), Srm(B) nebo Tlr(C) (Méndez, C., et al., 2001).

3.3. Rezistence způsobená inaktivací antibiotika

Enzymy této skupiny mění strukturu příslušných antibiotik a tím je inaktivují, čímž udílí rezistenci. Tabulka 3 ukazuje různé typy strategií, přes které jednotlivé enzymy fungují (Wright, G. D. 2005).

Esterasy a fosfotransferasy udílejí rezistenci k 14- a 15-členným makrolidům, ale ne k linkosamidům. Z klinického hlediska je významná fosfotransferáza Mph(C), která byla objevena u *Staphylococcus aureus*. Rezistence k linkomycinu je způsobena nukleotyltransferasami *lnu(A)* (dříve *linA*) nalezenou u *Staphylococcus* a *lnuB* (dříve *linB*) z *Enterococcus faecium* (Leclercq, R., 2002). Acetyltransferázy inaktivují SgA pomocí acetylace na volných hydroxylových skupinách na pozici 14 (Wright, G. D., 2005).

Strategie	Typ	Ovlivněná antibiotika
Hydrolyzáza		β-laktamy Makrolidy
Přenos skupin	Acyl	Aminoglykosidy Chloramfenikol Streptograminy A
	Fosforyl	Aminoglykosidy Makrolidy Rifamycin Peptid
	Thiol	Fosfomycin
	Nukleotidyl	Aminoglykosidy Linkosamidy
	ADP-ribosyl	Rifamycin
	Glykosyl	Makrolidy Rifamycin
	Jiné	Redox
Lyasy		Streptogramin B

Tabulka 3: Enzymové strategie enzymatické inaktivace antibiotik (převzato a upraveno z Wright, G. D., 2005)

4. ABC proteiny

ABC proteiny (ATP-binding cassette) jsou jednou z největších proteinových nadrodin. Vyskytují se ve všech třech doménách života: *Bacteria*, *Archaea* a *Eukarya*, ale byly také objeveny u některých velkých virů. Většina členů se účastní transportu na úkor energie z hydrolyzy ATP. Některé z nich však energii z ATP využívají pro netransportní procesy, jako je oprava DNA nebo translace. Jejich substrátová specifita je velmi široká a rozmanitá. Jsou schopny přenášet sacharidy, aminokyseliny, peptidy, vitamíny, ionty, hormony, xenobiotika, antimikrobiální látky, chemoterapeutika a třeba i polypeptidy (Licht, A. et al., 2011). Díky této široké škále látek, které jsou schopny tyto proteiny transportovat, jsou také zapojeny v různých mnohočetných lékových rezistencích jak u bakterií, tak i u lidských rakovinových buněk. Mohou také zasahovat do virulence vylučováním toxinů, jako je hemolyzin. U bakterií ABC proteiny ovlivňují jejich fyziologii, a jejich poškození vyvolává řadu závažných efektů. (Davidson, A. L. et al. 2008). U člověka například dysfunkce ABC proteinu způsobuje cystickou fibrózu (Kos, V. et al., 2009). Na základě struktury a funkce se ABC proteiny dají rozdělit do třech hlavních kategorií: první třída obsahuje exportéry, proteiny druhé třídy nejsou přímo zapojeny v transportu a třetí třída obsahuje importéry. V závislosti na fylogenetických důkazech se zdá, že se tato rodina proteinů začala specializovat velice brzy ve vývoji. Podle těchto analýz byl navržen hypotetický scénář evoluce, který předpokládá, že poslední univerzální předchůdce dnešních buněk (LUCA-the last universal common ancestor) již obsahoval všechny třídy ABC proteinů (Davidson, A. L. et al. 2008). Jejich počet na organismus se různí. Pro člověka bylo identifikováno kolem 52

genů a u *Escherichia coli* lze hovořit o přibližném počtu 70 – 90 genů v závislosti na kmenu bakterie. Velmi málo rodin proteinů z ABC nadrodiny systému se zdá být úzce zaměřena na druh nebo specifickou říši. Ve většině případů jsou jednotlivé rodiny identifikovány pomocí sekvenční analýzy ve více jak jedné říši.

4.1. Struktura ABC proteinů

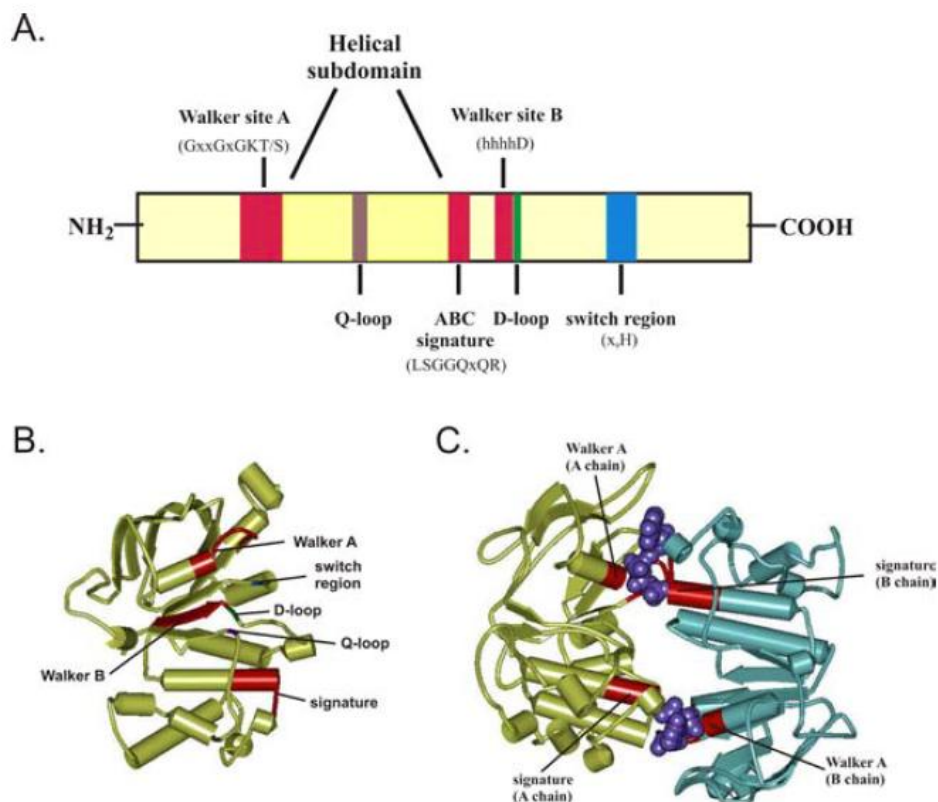
Ač se jedná o tak rozsáhlou rodinu proteinů, která je rozmanitá co se týče substrátů a polaritu transportu, sdílí podobnou základní strukturu. Všechny tři skupiny obsahují dvě hydrofilní nukleotid vazebné domény (NBD) s konzervovanou strukturou a dvě z nich mají také hydrofobní transmembránovou doménu (TMD). Na úrovni struktury je pozorovatelné spojení hydrolýzy ATP se strukturální změnou v doménách, která je spojena s danou funkcí proteinu.

4.1.1. TMD doména

Transmembránová doména formuje přemostění membrány, přes které může být substrát transportován (Kos, V. et al.,2009). Mezi jednotlivými transportéry nejsou vlastnosti této domény příliš konzervovány. Obecně je tvořena transmembránovými helixy, jejichž počet se různí. Většinou se pohybuje mezi 5 – 10. Na druhou stranu je očekáváno, že budou existovat proteiny i s méně než pěti helixy (Licht, A. et al. 2011). Důvodem této nízké podobnosti může být jejich role v rozpoznání a vazbě substrátu. Jak bylo zmíněno, transportované látky vykazují značnou různorodost. Jisté podobnosti však pozorovat můžeme, např. mezi importéry v EAA motivu nebo L smyčce (Kos, V. et al.,2009).

4.1.2. NBD doména

Tato doména zprostředkovává vazbu ATP a jeho následnou hydrolýzu. Tímto procesem poskytuje energii pro transportní, či netransportní procesy. Jejich struktura je na rozdíl od TMD vysoce konzervovaná napříč celou skupinou ABC proteinů. Ve své struktuře obsahuje specifické a konzervované motivy. Všechny NBD domény jsou s ohledem na 3D strukturu složeny ze dvou subdomén. Větší, katalytická subdoména je podobná struktuře nalezené u mnoha RecA-like ATPas. Menší, převážně helikální subdoména je typická pro ABC proteiny (Davidson, A. L. et al., 2008).



Obrázek 2: Konzervované motivy NBD domén. A. Lineární reprezentace NBD (x: libovolná aminokyselina; h: hydrofobní aminokyselina); B. Struktura NBD monomeru; C. Struktura NBD dimeru. (převzato z Licht, A. et al., 2011)

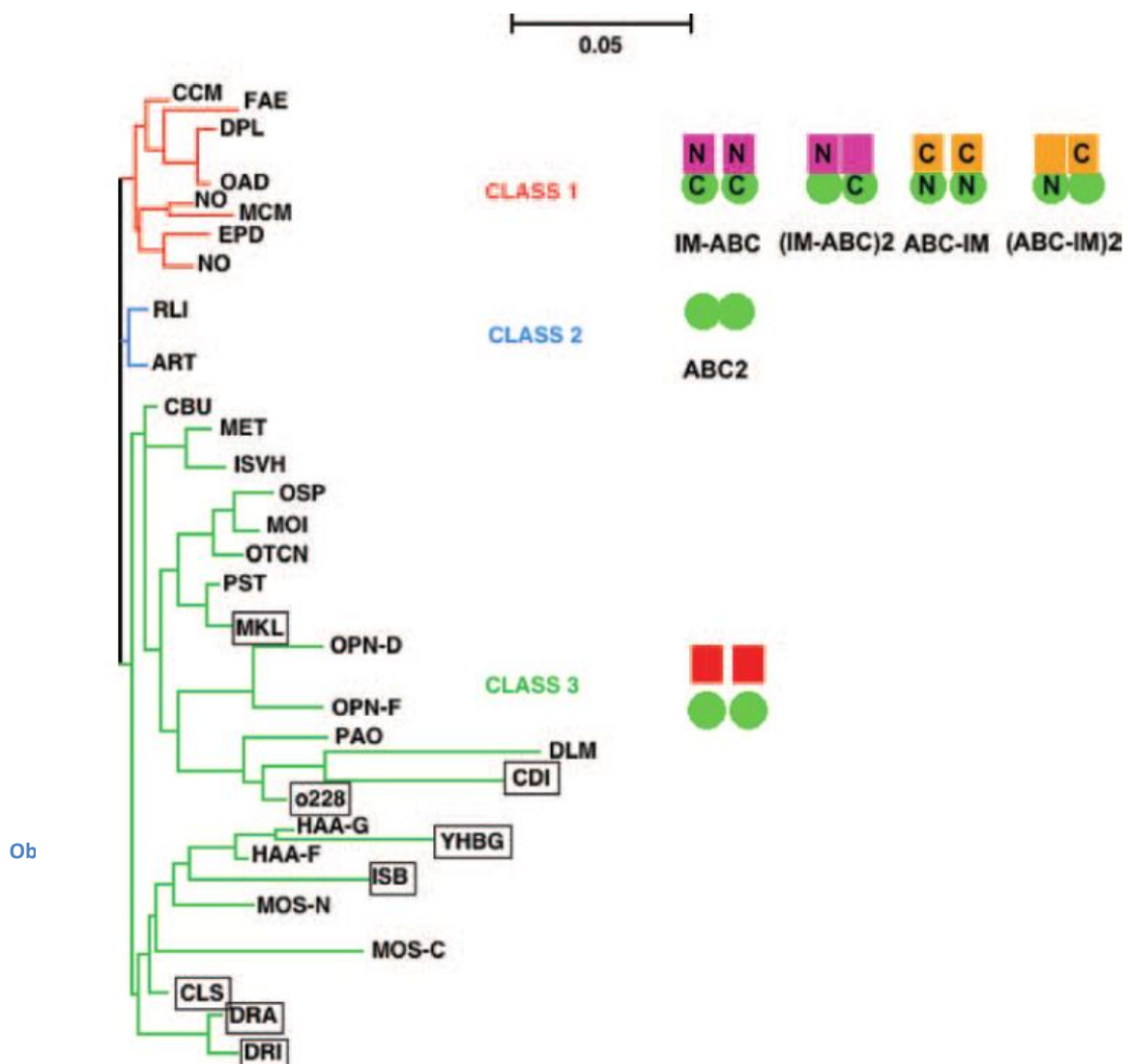
RecA-like subdoména se typicky skládá ze dvou β -skládaných listů a šesti α -helixů. Obsahuje konzervované motivy, jako jsou Walker A a B motiv (obr. 2). Walker A motiv, též známý pod označením P-smyčka, se také nalézá v různých jiných ATP- nebo GTP-hydrolyzujících proteinech. Jeho charakteristická sekvence je GxxGxGKS/T, kde x je libovolnou aminokyselinou. Walker B motiv má sekvenci $\phi \phi \phi \phi D$, kde ϕ je hydrofobní aminokyselinový zbytek. Oba tyto motivy přispívají k vazbě nukleotidu (Davidson, A. L. et al., 2008; Kos, V. et al., 2009).

Helikální doména obvykle obsahuje buď tři nebo čtyři α -helixy a signature motiv, který je též znám pod označením LSGGQ motiv, peptidový linker nebo C motiv. Pomocí tohoto motivu mohou být členové této rodiny identifikovány (Davidson, A. L. et al., 2008; Licht, A. et al., 2011).

Subdomény jsou spojeny dvěma flexibilními smyčkami. Jedna z nich obsahuje vysoce konzervované glutaminové zbytky a je označována jako Q-smyčka (obr. 2). Tato smyčka v celém, neporušeném ABC proteinu zprostředkovává interakci NBD domény s TMD doménou (Davidson, A. L. et al., 2008).

Mezi další motivy patří tzv. D-smyčka (obr. 2), která by mohla fungovat v komunikaci mezi dvěma ATP-vazebnými místy. Nachází se na C-konci Walker B motivu a obsahuje konsensus sekvenci SALD. Oblast mezi Q-smyčkou a signature motivem je strukturně různorodá. Diskutuje se, zda neslouží k správnému zacílení NBD domény k TMD doméně (Kos, V. et al., 2009).

Na NBD domény se váží dvě molekuly ATP a to na rozhraní dimeru, který je označován jako sendvič dimer (Kos, V. et al., 2009). Z toho plyne nutnost dimerizace pro vazbu molekul ATP. ATP interagují s Walker A motivem z jedné podjednotky a signature motivem z druhé. Vazba ATP je dále stabilizována pomocí aromatických zbytků, které předcházejí Walker A motiv. Pro udržení správné pozice fosfátového zbytku je důležitý konzervovaný lysinový zbytek Walker A motivu, který se váže vodíkovou vazbou ke kyslíkovým atomům α - a γ -fosfátu. Na γ -fosfát se prostřednictvím vodíkové vazby také váže histidinový zbytek z H-smyčky (switch region), jejíž umístění můžeme vidět na obr. 2 (Davidson, A. L. et al., 2008).



Obrázek 3: Zjednodušený fylogenetický strom NBD domén (převzato z Davidson, A. L. et al., 2008)

4.2. Klasifikace

Přítomnost vysoce konzervovaných NBD domén lze použít pro porovnání a roztřídění ABC proteinů, jehož výsledkem je rozdělení do tří skupin (obr. 3) (Davidson, A. L. et al., 2008).

4.2.1. I. třída ABC proteinů

Členy této třídy jsou exportéry, které mají NBD fúzovanou s TMD na jednom polypeptidovém řetězci a to buď v pořadí NBD-TMD nebo TMD-NBD. Vytvářejí buď homo- nebo hetero-dimery. Další variantou je spojení všech domén do jednoho polypeptidového řetězce. Všechny proteiny první třídy sdílí konzervovanou architekturu složenou z 12 transmembránových helixů a dvou NBD domén. Některé interagují i s dalšími proteiny, jako jsou např. MFO (membrane fusion protein) nebo OMF (outer membrane factor). Tyto proteiny jsou hojně zastoupeny mezi prokaryotami a mají blízké homology u eukaryotních exportérů. Avšak zdá se, že se nevyskytují u *Archea* (Davidson, A. L. et al., 2008). Jako příklad některých ABC exportérů, můžeme uvést tři, u kterých je k dispozici krystalografická struktura. Zástupcem eukaryotních exportérů je např. myší mnohočetný lékový exportér MDR1A. Mezi prokaryotní ABC exportéry patří MsbA z *Escherichia coli* fungující jako lipidová flipáza a mnohočetný lékový exportér Sav1866 ze *Staphylococcus aureus*. Další příklady bakteriálních exportérů jsou uvedeny v tabulce 4 (Licht, A. et al., 2011).

Transportér	Substrát	Vlastnosti, funkce
HlyBDTolC	Hemolysin	Virulenční faktor některých kmenů <i>Escherichie coli</i>
LmrA	Více léků	Rezistence
DrrAB	Doxorubicin, daunorubicin	Rezistence
MsbA, LptFGB	Prekurzory lipopolysacharidů	Komponenty bakteriální vnější membrány
LoiCDE	Lipoproteiny	Komponenty bakteriální vnější membrány

Tabulka 4: Příklady některých bakteriálních ABC exportérů (převzato a upraveno z Licht, A. et al., 2011)

Jak bylo nastíněno spektrum substrátů je rozmanité, sahající od lipidů a sterolů až např. po proteiny bakteriální S-vrstvy. Z lékařského hlediska jsou zajímavé pro jejich schopnost se podílet na effluxu léčiv. Tento jev můžeme pozorovat jak u prokaryotních, tak eukaryotních transportérů, které jsou schopny pumpovat ven z buněk bakteriální toxiny, antibiotika, protinádorové a mnohé další látky (Davidson, A. L. et al., 2008).

4.2.2. III. třída ABC proteinů

Po dlouhou dobu byla tato skupina vyhrazena pro prokaryota, ale poslední dobou přibývají důkazy naznačující, že by mohly být také vzácně přítomny u rostlin, kvasinek a protozoí (Licht, A. et al., 2011). Proteiny patřící do této skupiny mají ve většině případů funkci importérů. Obsahují TMD a NBD na dvou nezávislých polypeptidických řetězcích. V TMD je lokalizován tzv. EAA motiv, který zprostředkovává interakci mezi TMD a NBD. V periplasmatickém nebo extracelulárním prostoru navíc většina importérů interaguje s vysoce-afinitním proteinem označovaným jako BPD nebo SBP. Krom vysoké afinity mají tyto proteiny také vysokou specifitu. Role BPD je důležitá nejen v prostředí chudém na živiny, ale také v prostředí bohatém na nutriety, jak bylo demonstrováno pomocí mutace genu kódující maltosový-BP v *Escherichia coli* (Shuman, 1982-davidson). Mezi proteiny patřící do této skupiny můžeme jmenovat již zmíněný maltosový transportér. Tato skupina se dále dělí na kanonické ABC importéry a ECF (energy coupling factor) proteiny (Davidson, A. L. et al., 2008; Rees, D. C. et al., 2009).

4.2.3. II. třída ABC proteinů

Pro proteiny této skupiny nebyla dosud identifikována žádná TMD doména. Na svém polypeptidovém řetězci nesou dvě fúzané NBD domény. V této skupině nalezneme proteiny zapojené jak v rezistencích, tak ty, které mají i jiné netransportní funkce. Tato třída se dělí na tři rodiny: UVR, RLI a ART. Pro nás bude nejdůležitější rodina ART, neboť v ní se nalézají podrodina ARE proteinů (Dassa, E. et al., 2001)

Rodina UVR je zapojena v opravách DNA a rezistenci. Patří sem např. protein DrrC, který uděluje rezistenci k daunorubicinu a doxorubicinu. Pro DrrC byl navržen mechanismus rezistence, který předpokládá uvolnění chemoterapeutika z DNA s využitím energie z hydrolýzy ATP. Dalším členem této skupiny je UvrA (Lomovskaya, N. et al., 1996). Rodina RLI (RNase L inhibitor) je konzervována mezi eukaryoty a archaea. Příkladem proteinu patřícího do této podrodiny je RLI1(ABCDE1). ART rodina se dále člení na tři podrodiny: EF-3, REG a ARE. Podrodina EF-3 je zapojena v elongaci translace. Proteiny z REG podrodiny mají naopak roli v regulačních procesech. Proteiny poslední zmíněné podrodiny, ARE, udělují rezistenci k MLS antibiotikům (Dassa, E. et al., 2001).

5. ARE podrodina ABC proteinů

Jak již bylo zmíněno, ARE podrodina (Antibiotic RESistance) patří do II. třídy ABC proteinů a má dvě fúzované NBD domény. Přes pokusy o objevení TMD se zatím tato snažení nesečkala s kladným výsledkem. Označení ARE proteinů vychází z funkce členů této podrodiny, neboť tyto proteiny udílejí rezistenci k antibiotikům skupiny MLS a pleuromutilinům (Davidson, A.L. et al., 2008).

Počet proteinů patřících do této podrodiny poslední dobou vzrostl. Velké množství můžeme nalézt u producentů antibiotik, kterými jsou hlavně *Streptomyces*. Tyto bakterie potřebují ochranu, před toxicitou svých produktů. Mezi takové proteiny můžeme zařadit např. OleB ze *Streptomyces antibioticus* nebo Car(A) ze *Streptomyces thermotolerants*. Do této ochrany se samozřejmě nezapojují čistě jen ARE proteiny. Další výskyt zástupců této podrodiny je u některých patogenních bakterií. Jako příklad můžeme jmenovat Msr(A) ze *Staphylococcus aureus*, či Vga(A), taktéž se vyskytujícího u *Staphylococcus aureus* (Dassa, E et al., 2001; Méndez, C. et al., 2001; Méndez, C. et al., 1998).

Na základě fylogenetické analýzy sekvencí NBD domén bylo zjištěno, že proteiny typu I a III jsou si příbuzné a naopak typ II se zdá být separovaný. Zdá se tedy, že rezistentní proteiny II. třídy vznikly evolucí z jedinečného předka s dvěma NBD doménami. Ten pravděpodobněji vznikl fúzí dvou NBD domén proteinů typu I, než genovou duplikací z prapředka (Méndez, C et al., 2001).

6. OleB a OleC

OleB a OleC jsou dva ABC proteiny udílející rezistenci oleandomycinu, které byly identifikovány u *Streptomyces antibioticus*, producenta tohoto 14-členného makrolidového antibiotika.

OleC patří do I. třídy ABC systému a na rozdíl od oleB není kódován uvnitř genového klastru pro biosyntézu oleandomycinu (Méndez, C. et al., 2001). OleC je složen ze dvou polypeptidových řetězců. Gen *oleC* kóduje jednu NBD doménu, zatímco TMD doména je kódována genem *oleC-orf5*, který se nachází bezprostředně za *oleC*. Rezistence udílená OleC je pravděpodobně spojena s exportem (Rodríguez, A. M. et al., 1993).

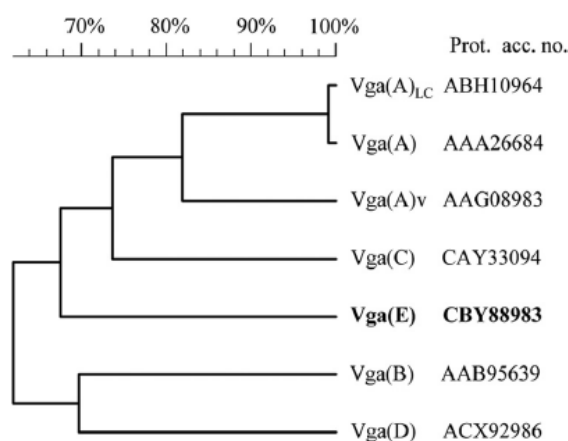
OleB na rozdíl od OleC patří do ARE podrodiny ABC proteinů a je kódován samostatným genem, který je umístěn na konci oleandomycinového genového clusteru (Méndez, C. et al., 2001; Olano, C. et al., 1995). OleB má dvě NBD domény, přičemž každá z těchto domén obsahuje přibližně 200 aminokyselin. Transmembránová doména nebyla tak jako u ostatních

zástupců ARE podrodiny identifikována. Bylo zjištěno, že exprese OleB probíhá paralelně s biosyntézou oleandomycinu a že obsah buněčného OleB je rovnoměrně rozdělen mezi cytosol a membránu (Olano, C. et al., 1995). OleB uděluje mnohem vyšší hladinu rezistence k OM než OleC a navíc je schopný navodit vysokou hladinu rezistence i u heterologních hostitelů (Méndez, C. et al., 2001). Krom toho, podle experimentů Carlose Olano a jeho spolupracovníků, stačí pouze jedna, a to libovolná, NBD k udělení rezistence (Olano, C. et al., 1995).

Sekrece antibiotika u *Streptomyces antibioticus* probíhá přes meziproduct, kterým je inaktivní forma antibiotika vzniklá pomocí intracelulární glykosyltransferázy (OleD, OleI). V extracelulárním prostoru se vyskytuje další enzym, glykosydasa (OleR), který antibiotikum zaktivuje (Vilches, C. et al., 1992; Quirós, L. M. et al., 1998). Pro OleB bylo experimentálně potvrzeno, že je schopné interagovat se substrátem. V tomto případě jak s oleandomycinem, tak i s jeho inaktivní glykosylovanou formou. Navíc bylo zjištěno, že se OleB podílí přímo na sekreci (Olano, C. et al., 1995; Buche, A. et al., 1997).

7. Vga proteiny

Doposud známe sedm různých Vga proteinů: Vga(A), Vga(A)_v (Haroche, J. et al., 2000), Vga(A)_{LC} (Novotná, G. et al., 2006), Vga(B) (Allignet, J. et al., 1997), Vga(C) (Kadlec, K. et al., 2009), Vga(D) (Jung, Y. H. et al., 2010) a Vga(E) (Schwendener, S. et al. 2011). Poslední zmíněný byl identifikován teprve v roce 2011. Všechny tyto proteiny, krom Vga(D), který byl objeven u *Enterococcus faecium*, byly popsány v rodu *Staphylococcus*. Na obrázku 4 můžeme vidět fylogenetický strom, který znázorňuje podobnost aminokyselinové sekvence Vga(E) s ostatními Vga proteiny. Všechny Vga proteiny mají dvě NBD domény a postrádají TMD doménu. Pro Vga(A) bylo experimentálně prokázáno, že, na rozdíl od OleB, musí být pro funkční protein přítomny obě NBDs a stejně jako v případě Msr(A) musí být tyto domény umístěny na jednom polypeptidickém řetězci. Také modifikace jednoho z Walker B motivů vede k inaktivaci proteinu, což má spojitost s tím, že hydrolýza ATP je podmínkou pro to, aby byl protein schopen udílet rezistenci (Chesneau, O. et al., 2005).



Obrázek 5: Souvislost mezi Vga(E) (tučně) a ostatními Vga proteiny. Dendrogram byl konstruován na základě aminokyselinových sekvencí použitím BioNumerics 5.10 (Applied Maths) (převzato z Schwendener S. et al., 2011).

Varianta genu *vga(A)*, *vga(A)_v*, udělující rezistenci k streptograminu A a příbuzným antibiotikům, byla nalezena u klinických izolátů *Staphylococcus aureus*. Chesneau a jeho kolegové také objevili, že *vga(A)_v* a *vga(A)* jsou schopny udílet nízkou hladinu rezistence k linkomycinu a klindamycinu. Obsah GC v genu je 35,6% což je podobné k 32 – 36% v genomu *Staphylococcus*, ale vyšší než u *vga(A)* (29%) a *vga(B)* (27,2%). Gen o délce 1575 bp kóduje hydrofilní protein s 524 aminokyselinovými zbytky a přibližnou molekulární hmotností 58216 Da. Vzájemné porovnání sekvence nukleotidů a aminokyselin s ostatními Vga je uvedeno v tabulce 5. Vga(A)_v a Vga(A) obsahují delecí o 22 aminokyselinách v regionu mezi LID motivem a signature sekvencí na N-konci NBD. Na C-konci pak spolu s Vga(B) obsahují oblast bohatou na lysin a aspartát (Haroche, J. et al., 2000; Chesneau, O. et al., 2005).

	GenBank přírůstkové číslo	% identity													
		Vga(A)		Vga(A) _{LC}		Vga(A) _v		Vga(B)		Vga(C)		Vga(D)		Vga(E)	
		Nt	Aa	nt	aa	Nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
Vga(A)	M90056	100	100	99	99	83	81	57	46	66	64	57	48	63	53
Vga(A) _{LC}	DQ823382			100	100	83	81	59	45	67	63	60	48	64	53
Vga(A) _v	AF186237					100	100	55	45	67	66	58	50	63	54
Vga(B)	U82085							100	100	56	45	61	53	53	41
Vga(C)	FN377602									100	100	56	53	61	55
Vga(D)	GQ205627											100	100	57	48
Vga(E)	FR772051													100	100

Tabulka 5: Vzájemné porovnání Vga zástupců. (převzato a upraveno z Schweneder, S. et al., 2011)

Gen *vga(A)_{LC}* o délce 1569 bp byl nalezen v klinických izolátech kmene *Staphylococcus haemolyticus*. V porovnání se sekvencí *vga(A)* se v genu *vga(A)_{LC}* nalézá 10 nukleotidových substitucí (Tab. 5). Pouze 7 těchto substitucí se projevuje na aminokyselinové úrovni. Pět z nich (L212S, G219V, A220T, G226S a S247R) je koncentrováno v centrální části proteinu mezi dvěma NBD doménami a zbylé dvě (M4L, N9H) na N-konci proteinu. Čtyři substituce v centrální části (L212S, G219V, A220T, G226S) vedou ke změně substrátové specifity.

Vga(A)_{LC} totiž udílí významnou rezistenci nejen k streptograminům A, tak jako Vga(A), ale také k linkosamidům. Na změně substrátové specificity můžeme vidět důležitost oblasti mezi NBD doménami pro rozpoznání substrátu. Také bylo zjištěno, že hybridní varianty proteinu Vga(A)_{LC}, Vga(A)_{LCba} a Vga(A)_{LCbaxa}, které mají N-koncové aminokyselinové zbytky stejné jako u Vga(A), mají dokonce ještě vyšší účinnost než wild-type Vga(A)_{LC} (Novotná, G. et al., 2006).

Hydrofilní protein Vga(B), který je kódován na plasmidu pIP1633 ze *Staphylococcus aureus*, je dlouhý 552 aminokyselin. Tento protein udílí rezistenci k streptograminu A a směsi SgA a SgB. Gen *vga(B)* je transkripčně spojen s genem *vatB*, který leží v jeho sousedství a kóduje acetyltransferázu. Tento gen je závislý na promotoru *vga(B)*. Na proteinové úrovni sdílí jednotlivé NBD domény proteinů Vga(A) a Vga(B) 38,8% a 39,1% identitu. S proteinem Msr(A) sdílí Vga(B) 34,4 % identických aminokyselin. Sekvence mezi dvěma NBDs je dlouhá 155 aminokyselin, tzv. Q-linker, a je bohatší na glutamin než zbytek proteinu u ostatních Vga proteinů, kde je poměr glutaminu v celém proteinu podobný (Allignet, J. et al., 1997). Gen *vga(B)* byl kromě rodu *Staphylococcus* nalezen také u *Enterococcus gallinarum*. Rozdíl v sekvenci těchto dvou genů spočívá v substituci tří nukleotidů (T919G, G1063T, C1128T) z nichž dva mají vliv na sekvenci aminokyselin (Trp307 → Gly a Val355 → Phe) (Jackson, Ch. R. et al., 2008).

Vga(C) dlouhý 523 aminokyselin a Vga(E) dlouhý 524 aminokyselin udělují rezistenci k streptograminům A, linkosamidům a také k pleuromutilinům. Oba proteiny byly identifikovány v prasečím methicillin-rezistentním *Staphylococcus aureus*. Vga(C) je nesen na multirezistentním plasmidu pKKS825 a Vga(E) na transposomu Tn6133. Procentuální porovnání identity aminokyselinových sekvencí Vga(E) s ostatními Vga proteiny je v tabulce 5 (Kadlec, K. et al., 2009; Schwendener, S. et al., 2011).

ORF *vga(D)* o velikosti 1575 bp a s obsahem GC 36,9% kóduje 525 aminokyselinový protein o předpokládané molekulové hmotnosti proteinu 60,5 kDa. Porovnání Vga(D) s ostatními Vga proteiny jsou taktéž ukázána v tabulce 5. Identita Vga(D) s dalšími ARE proteiny je následující: 33% s Msr(A), 31% s Msr(C), 34% s Msr(D) a 22% s Lsa. Downstream od genu *vga(D)* ve vzdálenosti 65 bp se nalézá ORF o 648 bp, který kóduje *vatG* (*vatH* dle opravy z r. 2011). Zdá se, že fragment obsahující oba geny nese strukturu transposonu (Jung, Y. - H. et al., 2010).

8. Msr proteiny

Hydrofilní protein Msr(A) s přibližnou molekulovou hmotností 55,9 kDa obsahuje 488 aminokyselinových zbytků. Má dvě NBD domény, které jsou odděleny výjimečně dlouhým Q-linkerem, který obsahuje 81 aminokyselin (Ross, J. I. et al., 1990; Reynolds, E. et al., 2003). Q-linkery jsou obvykle dlouhé pouze 15-25 zbytků a mají sklon být bohaté na glutamin a jiné hydrofilní aminokyseliny s charakteristickým periodickým rozmístěním hydrofobních zbytků. Msr(A) udílí rezistenci k 14- a 15-členným makrolidům a SgB a poprvé byl nalezen kódován na velkém plasmidu u *Staphylococcus epidermidis*. Později bylo zjištěno, že Msr(A) a Msr(C) udílí také rezistenci k telithromycinu. U *Staphylococcus aureus* byl nalezen *msr(A)* podobný gen, označený jako *msr(SA)*. Msr(SA) protein se liší od Msr(A) pouze ve dvou aminokyselinách (Matsuoka, M. et al., 1999; Reynolds, E. et al., 2005). Proto je gen obecně považován za člena *msr(A)* skupiny.

U *Enterococcus faecium* byl objeven příbuzný gen ke genu *msr(A)*, který byl označen jako *msr(C)*. Při porovnání aminokyselinových sekvencí Msr(A) s Msr(C) byla zjištěna 54% podobnost. Msr(C) má širší spektrum specifity než Msr(A), neboť také snižuje citlivost k tylosinu, který patří mezi 16-členné makrolidy (Singh, K.V. et al., 2001).

Msr(D) vykazuje vysokou hladinu podobnosti aminokyselinové sekvence s Msr(A) (75%) a Msr(C) (78%). U *Streptococcus pneumoniae* je schopen udílen nízkou hladinu rezistence k 14-členným makrolidům a ketolidům (Reynolds, E. et al., 2005).

Gen *msr(A)* předchází regulační oblast obsahující invertované repetitivní sekvence a ORF kódující krátký peptid tzv. „leader peptide“ (LP). Delece této regulační oblasti měla za následek rezistenci k MS_B antibiotikům u *Staphylococcus aureus*. Ačkoliv regulační oblast *msr(A)* nese podobné rysy jako regulační oblast některých *erm* genů regulovaných pomocí atenuace translace, nebyla tato možnost experimentálně prokázána. Podobná regulační oblast byla nalezena také upstream od genu *msr(C)* v *Enterococcus faecium*. Nukleotidová sekvence upstream od *msr(D)* není blíže podobná regulační oblastem *msr(A)* a *msr(C)*. Je proto nepravděpodobné, že by exprese *msr(D)* byla regulována tím samým mechanismem (Reynolds, E. et al., 2005).

Jedna z možných variant mechanismu rezistence udílené Msr(A) je efflux antibiotik. Avšak proto, aby mohl Msr(A) účinně translokovat antibiotika skrz membránu postrádá hydrofobní doménu. Při sekvenční analýze 31,5 kb plasmidu pUL5050 ze *Staphylococcus epidermidis* byl upstream od *msr(A)* objeven druhý ABC protein skládající se ze dvou ORF. První ORF, *stp*, kódoval NBD a druhý, *smp*, kódoval transmembránovou doménu.

Předpokládalo se, že protein Smp by mohl být kandidátem pro chybějící TMD (Ross, J.I. et al., 1994). Podobné sekvence se také našli na chromosomu u *Staphylococcus aureus* RN4220. Toto zjištění by mohlo být vysvětlením, proč přenesení pouze Msr(A) do citlivých buněk *Staphylococcus aureus* RN4220 bylo dostačující pro udělení rezistence. Avšak inaktivace *smp* a *stp* v chromosomu *Staphylococcus aureus* RN4220 neměla vliv na schopnost Msr(A) udílet rezistenci. Proto se zdá, že exprese *stp/smp* není potřebná funkci Msr(A) (Ross, J.I. et al., 1996).

9. Aktivní transport, nebo pasivní difuze?

Jak již bylo popsáno v části pojednávající o struktuře ARE podrodiny ABC systému, proteiny patřící do této skupiny mají dvě fúzované NBDs a postrádají transmembránovou doménu. Dosud také nebyl identifikován interagující transmembránový protein, se kterým by tyto proteiny tvořily funkční transportér. Proto existují dvě hlavní diskutované varianty mechanismu udílení rezistence : (i) aktivní transport; (ii) ochrana ribozomu (Reynolds, E. et al., 2003).

S použitím radioaktivně značených antibiotik [¹⁴C]-erythromycinu a [³H]-linkomycinu byly provedeny transportní experimenty s proteiny Msr(A) u *Staphylococcus aureus* RN4220 (Ross, J. I. et al., 1990) a s Vga(A)_{LC} u *Staphylococcus haemolyticus* rezistentní na linkomycin (Novotná, G. et al., 2006). V obou výše zmiňovaných případech došlo po počátečné fázi příjmu antibiotik ke snížení radioaktivity asociované s buňkami. Tyto experimenty naznačují, že dochází k exportu antibiotika z bakterií. Na základě tohoto výsledku bylo navrženo, že mechanismem rezistence může být aktivní efflux antibiotika z buňky prostřednictvím transportéru. Protože však erythromycin v neprotonované formě může volně přecházet přes buněčnou membránu a jeho akumulace v buňce je způsobena jeho vazbou na ribozom (Capobianco, J. O. et al., 1990), bylo navrženo ještě alternativní vysvětlení pro pozorované snížení radioaktivity uvnitř buněk a tím je ATP-závislá konformační změna v ribozomálním vazebném místě pro antibiotikum. To by mohlo vést buď k jeho disociaci, nebo ke změně afinity a následné difuzi antibiotika přes membránu po koncentračním gradientu pomocí pasivní difuze (Reynolds, E. et al., 2003; Chesneau, O. et al., 2005). Oba navržené mechanismy rezistence mají důkazy, které je podporují, a nelze ani jeden z nich vyloučit. Krom těchto výsledků se E. Reynolds a jeho kolegové ve svém článku z roku 2003 zmiňují o podobném a dosud nepublikovaném výsledku, který naznačuje, že

radioaktivně značený SgB [³H]-pristinamycin IA je také vylučován z buněk při expresi Msr(A) (Reynolds, E. et al., 2003).

Protože Msr(A) nemá stejně jako ostatní ARE proteiny transmembránovou doménu, bylo navrženo, že aktivní efflux je zprostředkován využitím transmembránové domény jiného, či jiných ABC proteinů. Aby tato varianta byla funkční, musel by protein, Msr(A), buď být schopný modifikovat substrátovou specifitu využívaného transportního systému, nebo by sám o sobě musel být schopný rozpoznat substrát (Reynolds, E. et al., 2003). U některých proteinů II. třídy ABC systému byla zjištěna možná interakce se substrátem. Takovým příkladem je OleB, který je schopen interagovat s oleandomycinem (Buche, A. et al., 1997), nebo protein Vga(A)_{LC}, který má v porovnání s Vga(A) pozměněnou substrátovou specifitu v závislosti na změně čtyř aminokyselinových zbytků v úseku mezi dvěma NBDs doménami (Novotná, G. et al., 2006).

Chesneau O. a jeho kolektiv zkoumali klinické izoláty *Staphylococcus epidermidis* BM10385 a IPF69. V jejich membránové frakci objevili kolokalizaci Vga(A) proteinu s β -podjednotkou F₁-F_O ATPasy. V ostatních frakcích (cytosolické a ribozomální) nebyl protein detekován. Pro protein OleB Olano a jeho spolupracovníci demonstrovali rovnoměrné rozdělení mezi membránovou a cytosolickou frakci. Tyto výsledky podporují domněnku o membránové lokalizaci Vga(A) a pravděpodobně i Msr(A) u rodu *Staphylococcus* (Chesneau, O. et al., 2005; Olano, C. et al., 1995).

Podmínkou transportu zprostředkovaného proteinem Msr(A) je také schopnost rozpoznat strukturálně odlišná antibiotika, jako jsou makrolidy a streptograminy B. Tyto antibiotika, však sdílí podobné, částečně se překrývající vazebné místo na velké ribozomální podjednotce. Toto naznačuje, že druhá hypotéza, předpokládající změnu zásahového místa na ribozomu by mohla být pravděpodobnější (Reynolds, E. D. et al., 2005). Tento mechanismus rezistence také podporuje zařazení Msr(A) a dalších ARE proteinů do II. třídy ABC proteinů, která obsahuje proteiny, jejichž funkcí není transport. Při platnosti hypotézy s vytěsněním antibiotika z jeho vazebného místa, pro jeho opuštění buňky by byla pravděpodobnější pasivní difuze, než aktivní efflux. V této souvislosti je cenné zmínit, že inhibitor multidrug ABC transportérů reserpin je proti Msr(A) neúčinný (Reynolds, E. et al., 2003). Na druhou stranu při pozorování effluxu [¹⁴C]-erythromycinu dinitrofenol silně inhiboval tento efflux a arzeničan jej rušil, což naopak podle Rosse podporuje teorii, že Msr(A) působí jako ATP-závislá pumpa (Ross, J.S. et al., 1990; Reynolds E. et al., 2003). Každopádně činnost arzeničnanu lze vykládat i jako podporu alternativní teorie (Reynolds, E.D. et al., 2005).

Přes veškeré úsilí vědců se prozatím otázka mechanismu udílení rezistence ARE proteiny nepodařilo objasnit. Lze očekávat, že zájem o tuto otázku neutichne i kvůli rozšiřování rezistence a snahy bojovat proti ní pomocí porozumění její funkce.

10. Závěr

Jak je vidět z nastíněných skutečností znalosti kolem ARE proteinů jsou spíše útržkovité a zaměřené na specifické hostitele. Kvůli jejich zapojení v rezistenci u patogenů lidí a hospodářsky významných zvířat, lze očekávat, že pokusy o objasnění jejich mechanismu rezistence a jejich dalších vlastností budou pokračovat. Jejich vyřešení může dopomoci k potlačení rezistence, bez nutnosti objevu nových antibiotik, proti kterým by se za určitou dobu objevila taktéž rezistence.

Seznam použité literatury

1. Abraham, E. P. – Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940, Vol. 146, p. 837.
2. Allignet, Jeanine – El Solh, Névine. Characterization of a new staphylococcal gene, *Vga*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Gene*. 1997, Vol. 202, p. 133 – 138.
3. Bøsling, J. – Poulsen, Susan M. – Vester Birte – Long, Katherine S. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3. *Antimicrob. Agents Chemother.* Sept. 2003, Vol. 47, No. 9, p. 2892 – 2896.
4. Buche, André – Méndez, Carmen – Salas, José A. Interaction between ATP, oleandomycin and the OleB ATP-binding cassette transporter of *Streptomyces antibioticus* involved in oleandomycin secretion. *Biochem. J.* 1997, Vol. 321, p. 139 – 144.
5. Buche, André – Méndez, Carmen – Salas, José A. Interaction between ATP, oleandomycin and the OleB ATP-binding cassette transporter of *Streptomyces antibioticus* involved in oleandomycin secretion. *Biochem. J.* 1997, Vol. 321, p. 139 – 144.
6. Butaye, Patrick – Cloeckaert, Axel – Schwarz, Stefan. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2003, Vol. 22, p. 205 – 210.
7. Capobianco, John O.-Goldman, Robert C. Erythromycin and Azithromycin Transport into *Haemophilus influenzae* ATCC 19418 under conditions of depressed proton motive force ($\Delta\mu\text{H}$). *Antimicrob. Agents Chemother.* Sept. 1990, Vol. 34, No. 9, p. 1787 – 1791.
8. Cocito, C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol. Rev.* June 1979, Vol. 43, No. 2, p. 145 – 198.
9. Dassa, Elie – Bouige, Philippe. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 2001, Vol. 152, p. 211-229.
10. Davidovich Chen - Bashan, Anat - Auerbach-Nevo, Tamar - Yaggie, Rachel D. - Gontarek, Richard R. – Yonath, Ada. Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity. *PNAS*. March 2007, Vol. 104, No. 11, p. 4291 – 4296.
11. Davidson, Amy L. – Dassa, Elie – Orelle, Cedric – Chen, Jue. Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* June 2008, Vol. 72, No. 2, p. 317 – 364.
12. Denis, Alexis – Agouridas, Constantin – Auger, Jean-Michel – Benedetti, Yannick – Bonnefoy, Alain – Bretin, Francois – Chantot, Jean-Francois – Dussarat, Arlette – Fromentin, Claude – D'Ambrières, Solange Gouin – Lachaud, Sylvette – Laurin, Patrick – Le Martret, Odile – Loyau, Véronique – Tessot, Nicole – Pejac, Jean-Marie – Perron, Sébastien. Synthesis and antibacterial activity of HMR 3647 a new ketolide highly potent against erythromycin-resistant and susceptible pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1999, Vol. 9, p. 3075 – 3080.
13. Gentry, Daniel R.-McCloskey, Lynn-Gwynn, Michael N.-Rittenhouse, Stephen F.-Scangarella, Nicole-Shawar, Ribhi – Holmes, David. J. Genetic characterization of *Vga* ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Dec.2008, Vol. 52, No. 2, p. 4507-4509.
14. Haroche, Julien – Allignet, Jeanine – Buchrieser, Carmen – El Solh, Névine. Characterization of a variant of *vga(A)* conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* Sept. 2000, Vol. 44, No. 9, p. 2271 – 2275.
15. Chesneau, Olivier – Ligeret Heidi – Hosan-Aghaie, Negin – Morvan, Anne – Dassa, Elie. Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the *Vga* proteins of staphylococci. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* Mar. 2005, Vol. 49, No.3, p. 973 – 980.
16. Chesneau, Olivier – Ligeret, Heidi – Hosan-Aghaie, Negin – Morvan, Anne – Dassa, Elie. Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the *Vga* proteins of Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* Mar. 2005, Vol. 49, No. 3, p. 973 – 980.
17. Chu, Daniel TW. Recent developments in macrolides and ketolides. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999, Vol. 2, p. 467 – 474.
18. Inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter. *FEMS Microbiol.Lett.* 1999, Vol. 181, p. 91-100.
19. Jackson, Charlene R. – Fedorka-Cray, Paula J. – Barrett, John B. – Hiott, Lari M. – Woodley, Tiffanie A. First report of *vatB* and *vgaB* from *Enterococcus gallinarum* in the USA. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2008, Vol. 31, p. 175 – 187.
20. Jacobs, Michael R. Retapamulin: a semisynthetic pleuromutilin compound for topical treatment of skin infections in adults and children, *Future Microbiol.* 2007, Vol. 2, No. 6, p. 591 – 600.

21. Jung, Young-Hee – Shin, Eun Shim – Kim, Okgene – Yoo, Jung, Sik – Lee, Kyeong Min – Yoo, Jae Il – Chung, Gyung Tae – Lee, Yeong Seon. Characterization of two newly identified genes, *vgaD* and *vatG*, conferring resistance to streptogramin A in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Nov. 2010, Vol. 54, No. 11, p. 4744 – 4749.
22. Kadlec, Kristina – Schwarz, Stefan. Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* Aug. 2009, Vol. 53, No. 8, p. 3589 – 3591.
23. Leclercq, Roland – Courvalin, Patrice. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* July 1991, Vol 35, No. 7, p. 1273 – 1276.
24. Leclercq, Roland. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *CID.* February 2002, Vol. 34, p. 482 – 492.
25. Levy, Stuart B. *Antibiotický paradox. Jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc.* 1. vyd. Praha: Academia, 2007. 312s.
26. Licht, Anke – Schneider, Erwin. ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011, Vol. 6, No. 5, p. 785 – 801.
27. Lomovskaya, O.-Hong, S.K.-Kim, S.U.-Fonstein, L.-Furuya, K.-Hutchinson, R.C. The *Streptomyces peucetius* *drc* gene encodes a UvrA-like protein involved in daunorubicin resistance and production. *J. Bacteriol.* 1996, Vol. 178, p. 3238-3245.
28. Matsuoka, M.L.-Janosi, L.-Endou, K.-Nakajima, Y. Cloning and sequence of
29. McCafferty, Dewey G. – Cudic, Predrag – Yu, Michael K – Behenna, Douglas C. – Kruger, Ryan. Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, Vol. 3, p. 672 – 680.
30. Méndez, Carmen – Salas, José A. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res. Microbiol.* 2001, Vol. 152, p. 341-350.
31. Neu, Harold C. The crisis in antibiotic resistance. *Science.* August 1992, Vol. 257, p. 1064 – 1073.
32. Novotna, G. – Janata, J. A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, *Vga(A)_{LC}*, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. *Antimicrob. Agents Chemother.* Dec. 2006, Vol. 50, No. 12, p. 4070 – 4076.
33. Novotna, G. – Janata, J. A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, *Vga(A)_{LC}*, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. *Antimicrob. Agents Chemother.* December 2006, Vol. 50, No. 12, p. 4070 – 4076.
34. Olano, Carlos – Rodríguez, Ana Maria – Méndez, Carmen – Salas, José A. A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* 1995, Vol. 16, No. 2, p. 333 – 343.
35. Olano, Carlos – Rodríguez, Ana Maria – Méndez, Carmen – Salas, José A. A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* 1995, Vol. 16, No. 2, p. 333 – 343.
36. Putman, Monique – van Veen, Hendrik W. – Konings, Wil N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Dec. 2000, Vol. 64, No. 4, p. 672 – 693.
37. Quirós, Luis M. – Aguirrezabalaga, Ignacio – Olano, Carlos – Méndez, Carmen – Salas, José A. Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* 1998, Vol. 28, No. 6, p. 1177 – 1185.
38. Retsema, J. – Fu, Wenchi. Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2001, Vol. 18, S3 – S10.
39. Reynolds, Elinor – Ross, Jeremy I. – Cove, Jonathan H. *Msr(A)* and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2003, Vol. 22, p. 228 – 236.
40. Reynolds, Elinor – Ross, Jeremy I. – Cove, Jonathan H. *Msr(A)* and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2003, Vol. 22, p. 228 – 236.
41. Reynolds, Elinor D. – Cove, Jonathan H. Resistance to telithromycin is conferred by *msr(A)*, *msrC* and *msr(D)* in *Staphylococcus aureus*. *JAC.* 2005, Vol. 56, p. 1179 – 1182.
42. Rodríguez, Ana M. – Olano, Carlos – Vilches, Carmen – Méndez, Carmen – Salas, José A. *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Mol. Microbiol.* 1993, Vol. 8, No. 3, p. 571 – 582.
43. Ross, J. I. – Eady, E. A. – Cove, J. H. – Cunliffe, W. J. – Baumberg, S. – Wootton, J.C. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* 1990, Vol. 4, No. 7, p. 1207 – 1214.

44. Ross, J.I.-Eady, E.A.-Cove, J.H.-Cunliffe, W.J.-Baumberg, S.-Wootton, J.C. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* 1990, Vol. 4, No. 7, p.1207-1214.
45. Ross, Jeremy I.-Eady, Anne – Cove, Jonathan H.-Baumberg, Simon. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene.* 1995, Vol. 153, p. 93-98.
46. Schlünzen, Frank, Zarivach, Raz, Harms, Jörg, Bashan, Anat, Tocij, Ante, Albrecht, Renate, Yonath Ada, Franceschi, Francois. Structural basis for the interaction of antibiotic with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature.* 25th October 2001, Vol. 413, p 814-821.
47. Schwendener, Sybille – Perreten, Vincent. New transposon Tn6133 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 contains vga(E), a novel streptogramin A, pleuromutilin, a lincosamide resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* Oct. 2011, Vol. 55, No. 10, p. 4900 – 4904.
48. Singh, Kavindra V.-Weinstock, George M.-Murray, Barbara. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.* June 2002, Vol. 46, No. 6, p. 1845-1850.
49. Tait-Kamradt, A. – Davies, T. – Appealbaum, P. C. – Depardieu, F. – Courvalin, P. – Petitpas, J. – Wondrack, L. – Walker, A – Jacobs, M. R. – Sutcliffe, J. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* Dec. 2000, Vol. 44, No. 12, p. 3395 – 3401.
50. Tenson, Tanel - Lovmar, Martin - Ehrenberg, Måns. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J.Mol.Biol.* 2003, Vol 330, p. 1005-1014.
51. Vannuffel, Pascal – Cocito, Carlo. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs.* 1996, Vol. 51, Suppl. 1, p. 20 – 30.
52. Vester, Birte-Douthwaite, Stephen. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob.Agents Chemother.* Jan. 2001, Vol. 45, No. 1, p. 1-12.
53. Vilches, Carmen – Hernandez, Cesar – Mendez, Carmen – Salas, Jose A. Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism. *J. Bacteriol.* Jan. 1992, Vol. 174, No. 1, p. 161 – 165.
54. Waksman, Selman A. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia.* 1947, Vol. 39, p. 565-569.
55. Wright, Garerd D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2005, Vol. 57, p. 1451 – 1470.
56. Yan, Kang - Madden, Lenore - Choudhry, Anthony E. - Voigt, Christine S. - Copeland, Robert A. - Gontarek, Richard R. Biochemical characterization of the interaction of the novel pleuromutilin derivative retapamulin with bacterial ribozomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* Nov. 2006, Vol. 50, No. 11, p. 3875 – 3881.