

ARE podrodina proteinů patřící k ABC transportérům uděluje v různé míře rezistenci k makrolidovým, linkozamidovým a streptograminovým antibiotikům. Mezi klinicky nejvýznamnější proteiny ARE podrodiny u stafylokoků patří Vga(A) protein udílející rezistenci ke streptograminům A. V roce 2006 byla objevena jeho nová varianta označovaná jako Vga(A)_{LC}, která kromě streptograminů A uděluje také rezistenci k linkosamidům. Vga(A) a Vga(A)_{LC} se liší pouze v 7 aminokyselinách, přesto udílejí odlišný rezistenční fenotyp. V předchozích experimentech bylo zjištěno, že centrální roli v určení substrátové specifity hrají 4 aminokyselinové rozdíly, které jsou nahlučené v úseku 15 aminokyselin uvnitř linkeru spojující dvě ABC domény (pozice 212, 219, 220 a 226). Kombinace aminokyselin LGAG z Vga(A) zvyšuje rezistenci k streptograminům A, zatímco kombinace SVTS přítomná ve Vga(A)_{LC} zvyšuje rezistenci k linkosamidům. Přestože do této podrodiny patří velké množství rezistenčních proteinů, mechanismus rezistence nebyl dosud s jistotou prokázán.

Cílem práce bylo vytvoření nových Vga(A) variant, které obsahují kombinace aminokyselin specifických pro Vga(A) a Vga(A)_{LC} protein v pozicích 212, 219, 220 a 226 a porovnání jejich schopnosti udělovat rezistenci k linkosamidům. Také jsme zkoumali vliv mutací v téže variabilní části linkeru, které se vyskytují v nových variantách Vga(A), jejichž sekvence jsou dostupné v databázi GenBank. Ze 14 možných kombinací aminokyselin specifických pro Vga(A) a Vga(A)_{LC} se nám podařilo připravit 8 z nichž 6 (SGTG, SVTG, LGTS, SGTS, SVAS a LVTS) udílelo podobnou rezistenci jako Vga(A)_{LC}. Mutované proteiny nesoucí tyto kombinace aminokyselin udíleli vyšší rezistenci k linkosamidům než ke streptograminům A. Kromě toho pouze jediná mutace K218T, v proteinu Vga(A) byla zodpovědná za změnu fenotypu z Vga(A) na Vga(A)_{LC}. Zdá se tedy, že Vga(A) proteiny obecně upřednostňují linkosamidy před streptograminy A, což by mělo být bráno v úvahu při posuzování rezistence v klinické praxi. Součástí této diplomové práce byla také příprava fúzních Vga(A) proteinů, které by umožňovaly imunodetekci Vga(A) v buněčných frakcích. Inkorporací HIS nebo FLAG kotvy však dochází k pravděpodobné inaktivaci Vga(A) proteinu.