

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena  
řádná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

BIOLOGIE

MIKROBIOLOGIE



Bc. Ludmila Veselá

Vliv exprese genu *lmr(C)* na biosyntézu linkomycinu u *Streptomyces lincolnensis*:  
Rezistence nebo produkce?

Influence of expression of *lmr(C)* on the biosynthesis of lincomycin in *Streptomyces lincolnensis*: Resistance or production?

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Gabriela Balíková Novotná Ph.D.

Praha, 2015

**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, 12. 8. 2015

Podpis

Tato diplomová práce byla vypracovávána v letech 2012 – 2015 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu za finanční podpory GAČR v rámci projektu P302-12-P632.

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné Ph.D. za vedení práce, cenné připomínky a rady. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Markétě Koběrské Ph.D., Mgr. Zdeňku Kameníkovi Ph.D. a RNDr. Janu Svobodovi Ph.D. za příjemnou a přínosnou spolupráci. Poté i ostatním členům laboratoře - Jiřímu Janatovi, Jakubovi Lenartovi, Vladimíru Vimbergovi, Petře Jiráskové, Janě Veselé, Leoně Zieglerové i všem ostatním za příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich vydatnou podporu, trpělivost a shovívavost nejen v době sepisování mé diplomové práce.

## Abstrakt

Rod *Streptomyces* produkuje víc jak polovinu známých bioaktivních látek, čímž se řadí mezi významné bakteriální rody. *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 ve svém genomu obsahuje biosyntetický genový klastř pro biosyntézu linkomycinu. Vedle biosyntetických a regulačních genů klastř obsahuje také tři rezistenční geny, *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)*, u kterých se předpokládá zapojení v ochraně před toxicitou syntetizovaného antibiotika. Protein Lmr(C) patří mezi ARE proteiny obecně udílející rezistenci ke klinicky důležitým třídám antibiotik: makrolidům, streptograminům, linkosamidům a pleuromutilinům. ARE proteiny jsou vedle producentů těchto antibiotik přítomny také u patogenních mikroorganismů. Přesto mechanismus rezistence udílený těmito proteiny, které sice spadají mezi ABC transportéry, ale na rozdíl od nich postrádají transmembránovou doménu, není charakterizován. Tím se ARE proteiny stávají zajímavým předmětem výzkumu.

Prostřednictvím delečních mutantů v rezistenčních genech *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)* jsme zjišťovali vliv těchto genů na produkci linkomycinu a rezistenci k linkosamidům, linkomycinu a klindamycinu, a to se zvláštním zřetelem na funkci *lmr(C)*. Zjistili jsme, že delece genu *lmr(C)* zásadně neovlivňuje produkci a ani rezistenci k linkomycinu, avšak má výrazný vliv na rezistenci ke klindamycinu. Pomocí dvoukrokové imunodetekce fúzního proteinu Lmr(C) - 6His jsme zjistili, že Lmr(C) se vyskytuje převážně v cytoplazmě.

**Klíčová slova:** ABC proteiny, ARE proteiny, *lmr(C)*, rezistence k antibiotikům, *Streptomyces lincolnensis*.

## Abstract

The genus *Streptomyces* produces more than a half of the known bioactive substances, ranking it among the most important bacterial taxons. *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 encodes a biosynthetic gene cluster for lincomycin biosynthesis in its genome. Apart from the biosynthetic and regulatory genes, the cluster also contains three resistance genes, *lmr(A)*, *lmr(B)* and *lmr(C)*, which could protect the host from the toxicity of a synthesized antibiotic. The Lmr(C) protein belongs to ARE proteins which generally confer resistance to clinically important classes of antibiotics: macrolides, streptogramins, lincosamides and pleuromutilins. In addition to antibiotic producers, ARE proteins are also present in pathogenic microorganisms. However, the resistance mechanism conferred by these proteins which belong to ABC transporters, even though they lack the transmembrane domain, have not been characterized yet. This makes the ARE proteins an interesting subject of the research.

Using deletion mutants in resistance genes *lmr(A)*, *lmr(B)* and *lmr(C)* we studied their effect on the lincomycin production and resistance to lincosamides, lincomycin and clindamycin with special focus on the function of the *lmr(C)*. We have found that deletion of *lmr(C)* does not significantly influence lincomycin production and resistance, however it has a significant impact on the resistance to clindamycin. Using a two-step immunodetection of fusion protein Lmr(C) - 6His we have found that the Lmr(C) is located mainly in cytoplasm.

**Keywords:** ABC proteins, ARE proteins, *lmr(C)*, antibiotic resistance, *Streptomyces lincolnensis*.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	6
<b>1. Úvod</b>	8
<b>2. Literární přehled</b>	10
2.1. Antibiotika	10
2.1.1. Linkosamidy	10
2.1.2. Makrolidy	11
2.1.3. Streptograminy	14
2.1.4. Pleuromutiliny	14
2.2. <i>Streptomyces</i> spp. – biologie a produkce antibiotik	15
2.2.1. Morfologie a fyziologie	16
2.2.2. Genetika	17
2.2.3. Produkce sekundárních metabolitů	17
2.3. <i>Streptomyces lincolnensis</i>	18
2.3.1. Biosyntéza linkomycinu	19
2.3.2. Rezistence	21
2.3.2.1. Lmr(B) – rezistence způsobená změnou zásahového místa	22
2.3.2.1.1. Erm metyltransferasy	22
2.3.2.2. Lmr(A) – rezistence způsobená efluxem antibiotik	24
2.3.2.2.1. MFS proteiny	25
2.3.2.2.2. ABC proteiny	27
2.3.2.3. Lmr(C) – rezistence spojena s aktivním transportem, či pasivní difusí?	28
2.3.2.3.1. II. třída ABC proteinů	29
2.3.2.3.2. ARE proteiny	30
2.3.2.3.3. Mechanismus funkce ARE proteinů	31
<b>3. Materiál a metody</b>	34
3.1. Materiál	34
3.1.1. Bakteriální kmeny	34
3.1.2. Vektory	35
3.1.3. Primery	36
3.1.4. Kultivační media	37
3.1.5. Pufry a roztoky	39
3.1.6. Enzymy	41
3.1.7. Protilátky	42
3.1.8. Komerční soupravy a standardy	42
3.1.9. Software a internetové aplikace	43
3.1.10. Použité chemikálie	43
3.2. Metody	46
3.2.1. Kultivace a následné uschování bakterií	46
3.2.1.1. Kultivace <i>Escherichia coli</i>	46
3.2.1.2. Kultivace rodu <i>Streptomyces</i>	46
3.2.1.3. Kultivace <i>Kocuria rhizophila</i>	46
3.2.1.4. Kultivace <i>Streptomyces lincolnensis</i> pro sledování produkce linkomycinu pomocí UHPLC	46
3.2.1.5. Příprava spor rodu <i>Streptomyces</i>	47
3.2.2. Transformace	47
3.2.2.1. Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro transformaci tepelným šokem	47
3.2.2.2. Transformace tepelným šokem	48
3.2.2.3. Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro elektroporaci	48
3.2.2.4. Transformace elektroporací	49
3.2.3. Mezipruhová konjugace	49
3.2.4. Metody práce s DNA	50
3.2.4.1. DNA elektroforéza v agarosovém gelu	50
3.2.4.2. Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu	51
3.2.4.3. Izolace plazmidové DNA	51
3.2.4.4. Izolace genomové DNA	52
3.2.4.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	52
3.2.4.6. Štěpení DNA pomocí restričních endonukleas	55

3.2.4.7. Defosforylace molekul DNA .....	56
3.2.4.8. Příprava fragmentů s tupými konci pomocí Klenowa fragmentu .....	56
3.2.4.9. Ligace DNA .....	57
3.2.4.10. Sekvenování DNA .....	57
3.2.5. Metoda inaktivace genů u rodu <i>Streptomyces</i> .....	57
3.2.6. Metody práce s proteiny .....	59
3.2.6.1. Příprava vzorků pro SDS–PAGE .....	59
3.2.6.2. SDS–PAGE proteinová elektroforéza .....	60
3.2.6.3. Barvení SDS–PAGE gelu .....	60
3.2.6.4. Western blot a detekce proteinů imunodetekcí .....	61
3.2.7. Mikroskopické pozorování morfologie mycelia rodu <i>Streptomyces</i> .....	62
3.2.8. Test biologické aktivity sekundárních metabolitů .....	62
3.2.9. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).....	62
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>65</b>
4.1. Příprava delečních mutant <i>Streptomyces lincolnensis</i> ATCC 25466 .....	65
4.1.1. Příprava deleční mutanty <i>lmr(A)</i> .....	66
4.2. Příprava konstruktů a komplementace delečních mutant <i>in trans</i> .....	67
4.3. Testování získaných delečních mutant <i>Streptomyces lincolnensis</i> ATCC 25466 a jejich komplementovaných variant .....	70
4.3.1. Testování produkce linkomycinu .....	70
4.3.2. Stanovení citlivosti k linkosamidovým antibiotikům .....	72
4.4. Vliv konstitutivní exprese genu <i>lmr(C)</i> na úroveň rezistence u <i>Streptomyces lincolnensis</i> ATCC 25466 a <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	74
4.4.1. Příprava konstruktů pro konstitutivní expresi genu <i>lmr(C)</i> .....	74
4.4.2. Stanovení citlivosti k linkosamidovým antibiotikům u mutant <i>Streptomyces lincolnensis</i> ATCC25466 při konstitutivní expresi <i>lmr(C)</i> .....	76
4.4.3. Exprese genu <i>lmr(C)</i> v <i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 .....	77
4.5. Určení lokalizace proteinu Lmr(C) pomocí imunodetekce .....	80
4.5.1. Příprava konstruktů pro konstitutivní expresi proteinu Lmr(C) značeného histidinovou kostvou .....	80
4.5.2. Western blot a imunodetekce proteinu Lmr(C) – 6His .....	82
4.5.2.1. Příprava a ověření testovaných kmenů .....	82
4.5.2.2. Určení lokalizace proteinu Lmr(C) .....	83
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>84</b>
<b>6. Souhrn</b> .....	<b>89</b>
<b>7. Seznam použité literatury</b> .....	<b>90</b>

## Seznam použitých zkratk

ABC proteiny	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette protein	ATP-vazebný protein
ARE rodina	<u>a</u> ntibiotic <u>r</u> esistance family	-
ART rodina	<u>a</u> ntibiotic <u>r</u> esistance and <u>t</u> ranslation regulation	-
CLI	clindamycin	klindamycin
$c_m$	mass concentration	hmotnostní koncentrace [g. dm <sup>-3</sup> ]
dH <sub>2</sub> O	distilled water	destilovaná voda
DMT	<u>d</u> rug <u>m</u> etabolite <u>t</u> ransporter	-
EGT	ergothioneine	ergothionein
Erm	<u>e</u> rythromycin- <u>r</u> ibosome <u>m</u> ethylase	-
ERY	erythromycin	erytromycin
EtBr	ethidium bromide	ethidium bromid
LIN	lincomycin	linkomycin
LP	<u>l</u> eader <u>p</u> eptid	-
LS <sub>A</sub>	<u>l</u> incosamides and <u>s</u> treptogramins <u>A</u>	linkosamidy a streptograminy A
MATE	<u>m</u> ultidrug and <u>t</u> oxic compound <u>e</u> xtrusion	-
MDR	multidrug resistance efflux system	-
MFS	<u>m</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily	-
MIC	<u>m</u> inimal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration	minimální inhibiční koncentrace
MLS	<u>m</u> acrolides, <u>l</u> incosamides and <u>s</u> treptogramins makrolidy, linkosamidy a streptograminy	
MLS <sub>B</sub>	<u>m</u> acrolides, <u>l</u> incosamides and <u>s</u> treptogramins <u>B</u> makrolidy, linkosamidy a streptograminy B	
MS <sub>B</sub>	<u>m</u> acrolides and <u>s</u> treptogramins <u>B</u>	makrolidy a streptograminy B
MSH	mycothiol	mykothiol
NBD	<u>n</u> ucleotide <u>b</u> inding <u>d</u> omain	nukleotid vazebná doména
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity	optická denzita
OM	oleandomycin	oleandomycin



ORF	<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame	otevřený čtecí rámeček
<i>oriC</i>	origin of replication	počátek replikace
<i>oriT</i>	origin of transfer	počátek konjugace
PEG	polyethylene glycol	polyethylenglykol
PPL	propylproline	propylprolin
PtIM	P-site tRNA interaction motif	-
PVDF	polyvinylidenedifluoride	polyvinylidendifluorid
RLI	RNasa L inhibitor	-
RND	<u>r</u> esistance- <u>n</u> odulation- <u>d</u> ivision	-
RPM	<u>r</u> evolutions per <u>m</u> inute	počet otáček za minutu
RT	<u>r</u> oom <u>t</u> emperature	pokožová teplota
SgA	streptogramin A	streptogramin A
SgB	streptogramin B	streptogramin B
SMR	<u>s</u> mall <u>m</u> ultidrug <u>r</u> esistance	-
Tap	<u>t</u> elomere- <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein	protein asociovaný s telomerami
TIR <sub>s</sub>	<u>t</u> erminal <u>i</u> nverted <u>r</u> epeats	terminální invertované repetice
TMD	<u>t</u> rans <u>m</u> embrane <u>d</u> omain	transmembránová doména
UHPLC	<u>u</u> ltra <u>h</u> igh- <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie	
UV světlo	<u>u</u> ltra <u>v</u> iolet light	ultrafialové světlo
UVR	DNA repair and drug resistance	-
VRE	vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecium</i>	
VRSA	vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization	Světová zdravotnická organizace
WT	wilde type	divoký druh

# 1. Úvod

Po objevu prvních chemoterapeutik a antibiotik se zdálo, že problém epidemii bakteriálního původu, které běžně postihovaly lidstvo v průběhu dějin, je vyřešen. Ačkoliv je vysoký počet úmrtí způsobených bakteriálními infekcemi již minulostí, ihned po zavedení antibiotik do lékařské praxe se začaly objevovat kmeny, které jsou k použitým lékům rezistentní. Na problém rezistence poukazuje i Světová zdravotnická organizace (WHO) (Cadman, H. et al., 2014). Ironií je, že na vznik rezistence a problémy s ní spojené upozorňoval již objevitel penicilinu Alexander Fleming (Fleming, A. 1945). Přibližně ve stejné době také vyšel článek, poukazující na spojitost pozorované rezistence k penicilinu s přítomností enzymu, který ovlivňuje senzitivitu testovaných bakterií (Abraham, E. P. et al., 1940). Problém rezistence se tedy v dnešní době řadí mezi celosvětové problémy. Pokud by se naplnily apokalyptické předpovědi, tak by 21. století mohlo být opět spojeno s nárůstem úmrtí ve spojitosti s běžnými bakteriálními infekcemi (Cadman, H. et al., 2014). Nyní jsme ve fázi, kdy antibiotika poslední volby určená jako rezerva k léčbě infekcí, při kterých normálně používaná antibiotika nezabírají, také pozvolna ztrácí svoji účinnost. V současné době se problém rezistence týká zejména nemocničních infekcí způsobených kromě jiných také *Staphylococcus aureus*, či *Enterococcus faecium*.

Co se týká počtu nově klinicky využívaných antimikrobiálních látek jsme již za zlatou érou, která probíhala v 50. až 60. letech 20. století. Důvodem snížení počtu nově objevených antibiotik je zejména nízký zájem farmaceutických firem o jejich vývoj a klinické testování způsobený zejména ekonomickými důvody (Projan, S. J. 2003). Hlavním zdrojem dnes klinicky používaných antibiotik jsou bakterie řádu *Actinomycetales*. Přesněji, většina z nich je produkována rodem *Streptomyces*. Lze předpokládat, že jsme ještě tento rezervoár potenciálních nových antibiotik nevyčerpali. Avšak jejich hledání komplikuje fakt, že ne všechny mikroorganismy jsou kultivovatelné a že produkce může být závislá na podmínkách, jenž je těžké v laboratorních podmínkách napodobit (Zhu, H. et al., 2014). V každém případě nové látky s antimikrobiálním účinkem jsou sice důležité kvůli své efektivitě v léčbě onemocnění, ale dříve či později se díky vysoké přizpůsobivosti bakterií objeví rezistentní kmen. Lze tedy říci, že se jedná o neustálý boj mezi přizpůsobivostí bakterií a naší schopností vyvíjet účinnější látky. Kromě objevů nových antibiotik je také důležité pochopit mechanismus, jak se bakterie proti antibiotikům brání. Použití  $\beta$ -laktamových antibiotik v kombinaci s inhibitory  $\beta$ -laktamas je příkladem, jak lze poznatky o rezistenci využít k překonání již existujících rezistenčních mechanismů (Lee, N. et al. 2003).

Tato diplomová práce je zaměřena na studium funkce proteinu Lmr(C), který je jedním z předpokládaných rezistenčních proteinů přítomných v biosyntetickém genovém klastru producenta linkomycinu *Streptomyces lincolnensis*. Lmr(C) patří do ARE podrodiny (antibiotic resistance) druhé třídy ABC proteinů (ATP-binding cassette), které udílejí rezistenci k linkosamidům, makrolidům, streptograminům a pleuromutilinům. Tedy k antibiotikům, která, ačkoli strukturně odlišná, inhibují translaci. Mechanismus rezistence není u této proteinové podrodiny zcela vysvětlený. Zvažují se dvě možné hypotézy funkce těchto proteinů - aktivní transport, nebo ovlivnění vazby antibiotika k ribozomu. ARE proteiny jsou přítomny jak u patogenů, jako je např. *Staphylococcus aureus*, tak u producentů antibiotik, jakým je právě protein Lmr(C) u *Streptomyces lincolnensis*.

## Cíle diplomové práce:

Hlavním cílem této diplomové práce bylo charakterizovat vliv genu *lmr(C)* na produkci linkomycinu a rezistenci u *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466.

### Dílčí cíle:

- Připravit sadu delečních mutantů *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 v rezistenčních genech *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)*, a to jednak jednotlivě ale také jejich dvojité a trojitou kombinací.
- Připravit konstrukty exprimující geny *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)* z vlastních promotorů a jimi pak komplementovat příslušné deleční mutanty.
- Stanovit vliv delecí genů *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)* na rezistenci k linkosamidovým antibiotikům.
- Analyzovat vliv delecí genů *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)* na produkci linkomycinu.
- Připravit a testovat konstrukt exprimující gen *lmr(C)* v citlivém heterologním hostiteli.
- Stanovit vliv konstitutivní exprese genu *lmr(C)* na rezistenci u *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466.
- Připravit konstrukt exprimující fúzní protein Lmr(C) - 6His a pomocí imunodetekce určit lokalizaci proteinu v buňce.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Antibiotika

V závislosti na mechanismu účinku lze antibiotika rozdělit do skupin uvedených v tabulce 1 (Retsema, J. et al., 2001). Antibiotika popsaná v následujících kapitolách jsou sice z chemického hlediska rozdílná, ale mají několik společných vlastností. Za prvé, inhibují proteosyntézu tím, že se váží na velkou 50S podjednotku bakteriálního ribozomu v blízkosti peptidyltransferázového místa. Druhou společnou vlastností, která ještě více definuje tuto skupinu a odlišuje ji tak od dalších antibiotik vázících se ve stejném místě, je zkřížená rezistence způsobená metylací 23S rRNA (MLS<sub>B</sub> rezistence), a částečně zkřížená rezistence udílená ARE proteiny (MS<sub>B</sub> a LS<sub>A</sub> rezistence).

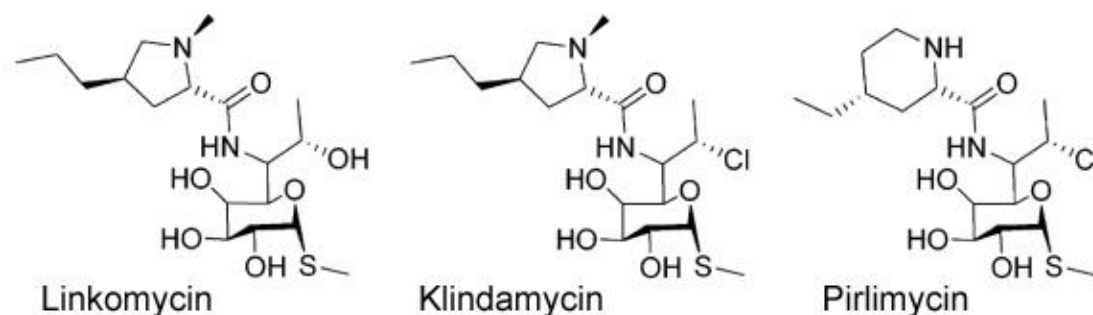
**Tabulka 1: Mechanismus účinku hlavních antibakteriálních tříd (převzato a upraveno z Retsema, J. et al., 2001)**

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

#### 2.1.1. Linkosamidy

Linkomycin, který byl izolován v roce 1962 z půdní bakterie *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis*, byl prvním linkosamidem s kompletně objasněnou strukturou, ačkoliv celesticetin byl objeven o několik let dříve v mediu kultury *Streptomyces caelestis*. Linkomycin (Obr. 1) je produkován i dalšími zástupci rodu *Streptomyces*, jako jsou např. *Streptomyces espinosus* a *Streptomyces pseudogriseolus* (Spížek, J. et al., 2004b; Spížek, J. et al. 2004a). Při produkci linkomycinu u *Streptomyces lincolnensis* dochází k syntéze dvou velice podobných látek, linkomycinu A a v menším množství linkomycinu B. Strukturální rozdíl spočívá v délce postranního řetězce aminokyselinové části antibiotika. V případě linkomycinu A se jedná o propyl a u linkomycinu B o etyl (Argoudelis, A. D. et al., 1965; Spížek, J. et al., 2004a). Klinicky významnější než linkomycin je jeho semisyntetický derivát nazvaný klindamycin (7(S)-chloro-7-deoxylinkomycin, (Obr. 1)). Mezi další známější zástupce této

skupiny antibiotik patří zmíněný celesticetin a pirlimycin (Obr. 1). Linkosamidy jsou účinné proti většině gram-pozitivních mikroorganismů, některým protozoím a lze je použít i proti anaerobním bakteriím. Klindamycin je využíván též v léčbě poживových tkání, a to kvůli své schopnosti pronikat do tkání i kostí (Řezanka, T. et al., 2007). U pacientů s přecitlivělostí k penicilinovým antibiotikům se používají jako jedna z možných alternativ léčby (Vayalumkal, J. V. et al., 2006). Jedná se tedy sice o malou skupinu antibiotik, ale klinicky významnou.



**Obrázek 1: Chemické struktury několika typů linkosamidů (převzato a upraveno z Morar M. et al., 2009)**

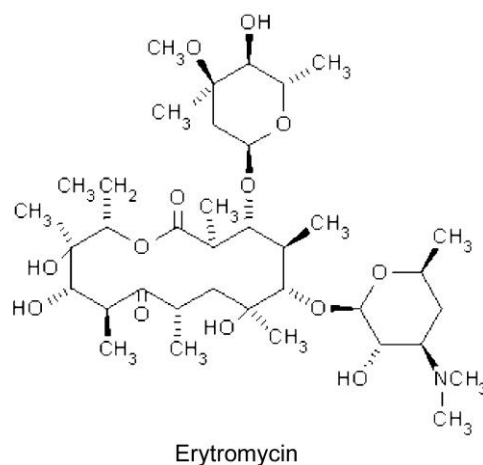
Molekulu linkomycinu A tvoří dvě části, které jsou syntetizovány odděleně. Aminokyselinová část propylprolin (PPL) (Witz, D. F. et al., 1971) a sacharidová část GDP-linkosamid jsou následně vzájemně propojeny pomocí amidové vazby (Schroeder, W. et al., 1967; Zhao, Q. et al., 2015).

Linkosamidová antibiotika se váží na velkou 50S podjednotku ribozomu, čímž inhibují časnou elongaci vznikajících proteinů. Navrhovaný mechanismus funkce je založen, stejně jako u makrolidů, na uzavření výstupního tunelu, kterým nascentní peptid opouští ribozom, s následovanou disociací peptidyl-tRNA. V případě klindamycinu je disociovaný peptid dlouhý dvě až čtyři aminokyseliny (Tenson, T. et al. 2003), což odpovídá tomu, že se linkosamidy váží v ústí tunelu. Místo vazby klindamycinu k ribozomu bylo zkoumáno u krystalových struktur ribozomu s navázaným antibiotikem u *Escherichia coli*, *Haloarcula marismortui* a *Deinococcus radiodurans* (Dunkle, J. A. et al. 2010; Tu, D. et al., 2005; Schlünzen, F. et al 2001). Přes jisté rozdíly by mělo docházet k interakci s A- a P- místy ribozomu. Dle kinetických studií by také mohlo docházet k přechodné vazbě klindamicinu k A- místu ribozomu a následně k jeho pomalému posunutí k P-místu. Jedná se tedy o interakci s 23S rRNA (Kouvela, E. C. et al. 2006). Klindamycin má částečně se překrývající vazebná místa s dalšími antibiotiky inhibující proteosyntézu, např. s chloramfenikolem (Schlünzen, F. et al 2001).

## 2.1.2. Makrolidy

Makrolidy jsou velkou skupinou antibiotik, které se v klinické praxi využívají zhruba od poloviny minulého století. Patří sem jak přírodní, tak semisyntetické deriváty. V klinické praxi se makrolidy používají proti široké škále infekčních agens, mezi které patří jak gram-pozitivní, tak gram-negativní patogeny, včetně intracelulárních. Jako konkrétní příklady lze jmenovat rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, dále *Legionella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Chlamydia* a některé zástupce rodu

*Mycobacterium* (Leclercq, R. 2002). Jsou rovněž využívány jako alternativa pro léčbu pacientů s alergií k penicilínovým antibiotikům. Své využití našly také ve veterinární praxi (Retsema, J. et al. 2001).



**Obrázek 2: Chemická struktura erytromycinu (převzato a upraveno Reynolds, E. et al., 2003)**

Prvním komerčně dostupným makrolidem byl erytromycin (Obr. 2), jehož producenty jsou zástupci řádu *Actinomycetales*. V dnešní době tato skupina zahrnuje mnoho semisyntetických derivátů, díky kterým došlo ke zlepšení některých nevýhodných farmakologických vlastností a k rozšíření spektra účinku. Makrolidy mají svůj název odvozen od chemické struktury (Retsema, J. et al., 2001; Katz, L. et al., 2005). Jsou složeny z velkého laktonového (makrolaktonového) kruhu různé velikosti, na který jsou připojeny dva a více amino nebo neutrálních sacharidů (Leclercq, R. 2002). V závislosti na velikosti kruhu lze tato antibiotika klasifikovat. Některé známější makrolidy jsou uvedeny v tabulce 2. V důsledku narůstajícího výskytu rezistentních kmenů byla vyvinuta nová skupina semisyntetických makrolidů nazvaná ketolidy. Ketolidy (např. telitromycin) byly odvozeny od 14-členných makrolidů (Denis A. et al. 1999; Tenson, T et al. 2003). Strukturálně jsou charakteristické 3-keto skupinou na laktonovém kruhu v místě L-kladinosy a disponují alkyl-aryl postraním řetězcem (Tenson, T. et al, 2003; Pavlović, D. et al., 2014).

**Tabulka 2: Přehled vybraných makrolidů**

Název	Velikost kruhu	Původ
Erytromycin	14	Bakteriální
Oleandomycin	14	Bakteriální
Klarithromycin	14	Semisyntetický
Azitromycin	15	Semisyntetický
Spiramycin	16	Bakteriální
Josamycin	16	Bakteriální

Makrolidová antibiotika, stejně jako linkosamidy, inhibují bakteriální proteosyntézu vazbou na velkou 50S podjednotku ribozomu. Interakce antibiotika s ribozomem byla zkoumána několika vědeckými skupinami (Hansen, J. L. et al 2002; Schlünzen, F. et al. 2001; Dunkle, J. A. et al., 2010).

Důvodem je pochopení mechanismu funkce, který se úzce pojí se vznikem rezistence a tím i s vývojem nových generací antibiotik. Krystalové struktury velké ribozomální podjednotky v přítomnosti makrolidů ukázaly, že k interakci mezi ribozomem a antibiotikem dochází stejně tak, jako v případě linkosamidů, na začátku tunelu, kterým vznikající protein opouští ribozom, a to konkrétně v místě jeho zúžení tvořeným proteiny L4 a L22 a peptidyl-transferasovým místem (Hansen, J. L. et al 2002). Konkrétně dochází k esenciální interakci s 23S rRNA. Při vazbě antibiotika dojde k uzavření tunelu a tím k syntéze pouze krátkých peptidů a jejich následnému uvolnění ve formě peptidyl-tRNA. Délka peptidů (2 – 8 aminokyselinových zbytků pro makrolidy, v případě ketolidů až 12) je větší než v případě linkosamidů a koreluje se strukturou antibiotika. To naznačuje, že se vazebná místa 14-, 15- i 16-členných makrolidů sice překrývají, ale nejsou úplně identická (Tenson, T. et al. 2003; Hansen, J. L. et al 2002). Koncem roku 2014 vyšel článek, ve kterém Krishna Kannan a jeho spolupracovníci publikovali názor, že kompletní inhibice proteosyntézy působením makrolidů platí jen omezeně. Ve skutečnosti je inhibována jen translace části transkriptů. Inhibice translace tedy pravděpodobně nastává v souvislosti se specifickými kombinacemi aminokyselin na vznikajícím proteinu. Jedná se tedy nejspíš o protein-specifickou inhibici translace (Kannan, K. et al. 2014).

### 2.1.3. Streptograminy

Streptograminy jsou skupinou antibiotik, kterou tvoří směs dvou chemicky rozdílných látek, streptograminů A (SgA) a streptograminů B (SgB), které jsou produkovány ve směsi. Streptograminy A jsou polynesaturované cyklické makrolaktony. V případě streptograminů B se jedná o cyklické hexadepsi- nebo heptadepsi-peptidy (Johnston, N. J. et al., 2002; Mast, Y. et al. 2014). Pokud působí zvlášť, mají jen průměrný bakteriostatický účinek. V kombinaci se však jejich účinnost zvýší díky synergistickému efektu, jehož výsledkem je jejich baktericidní působení. Synergistický efekt spočívá ve změně konformace ribozomu po navázání SgA, čímž se zvýší afinita ribozomu pro SgB (Vannuffel, P. et al. 1996; Contreras, A. et al., 1977). Změna afinity přetrvává i po disociaci SgA (Johnston, N. J. et al., 2002). Obě látky inhibují bakteriální syntézu proteinů, ale každá v jiné fázi. Příklady známých streptograminů, včetně jejich producentů, jsou uvedeny v tabulce 3. Kromě uvedených producentů rodu *Streptomyces*, které produkují většinu streptograminů, jsou dalšími producenty i zástupci rodů *Actinoplanes*, *Actinomadura* a *Micromonospora*. Všechny známé přírodní streptograminy byly izolovány a identifikovány ve zlaté éře objevů antibiotik. Kromě přírodních látek sem patří také semisyntetické deriváty (Mast, Y. et al. 2014).

**Tabulka 3: Streptograminová antibiotika a jejich producenti (převzato a upraveno z Johnston, N. J. et al. 2002)**

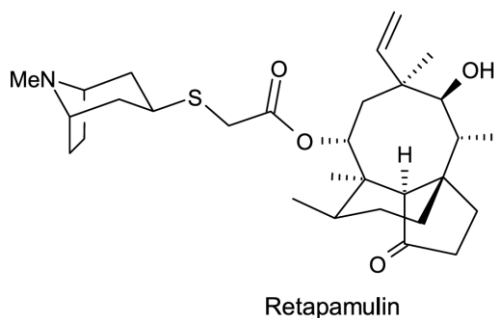
Streptograminy A	Streptograminy B	Producent
Pristinamycin IIA	Pristinamycin IA	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Virginiamycin M	Virginiamycin S	<i>Streptomyces virginiae</i>
Mikamycin A	Mikamycin B	<i>Streptomyces mitakae nsis</i>
Streptogramin A	Streptogramin B	<i>Streptomyces graminofaciens</i>





rezistencí s jinými druhy antibiotik. Dalšími zástupci této skupiny antibiotik jsou tiamulin a valnemulin využívané ve veterinární medicíně (Yan, K. et al. 2006). Pleuromutiliny jsou tvořeny společným tricyklickým mutilinovým jádrem. Na uhlík C21 je připojena keto skupina, nezbytná pro antimikrobiální aktivitu těchto antibiotik. K uhlíku C14 se pak váží různé substituenty (Davidovich, Ch. et al., 2007).

K inhibici proteosyntézy dochází díky vazbě pleuromutilinových antibiotik na V doménu 23S rRNA velké 50S podjednotky ribozomu. Zdá se, že interakce pleuromutilinů s ribozomem vyžaduje také protein L3. Z funkčního hlediska dochází k inhibici ribozomální peptidyl-transferázové aktivity a patrně i k částečnému zamezení vazby iniciátorové tRNA k ribozomálnímu P-místu. Tím se zamezí normálnímu formování aktivní 50S podjednotky (Yan, K. et al. 2006).



Obrázek 4: Chemická struktura retapamulinu (převzato z Yan, K. et al. 2006)

## 2.2. *Streptomyces* ssp. – biologie a produkce antibiotik

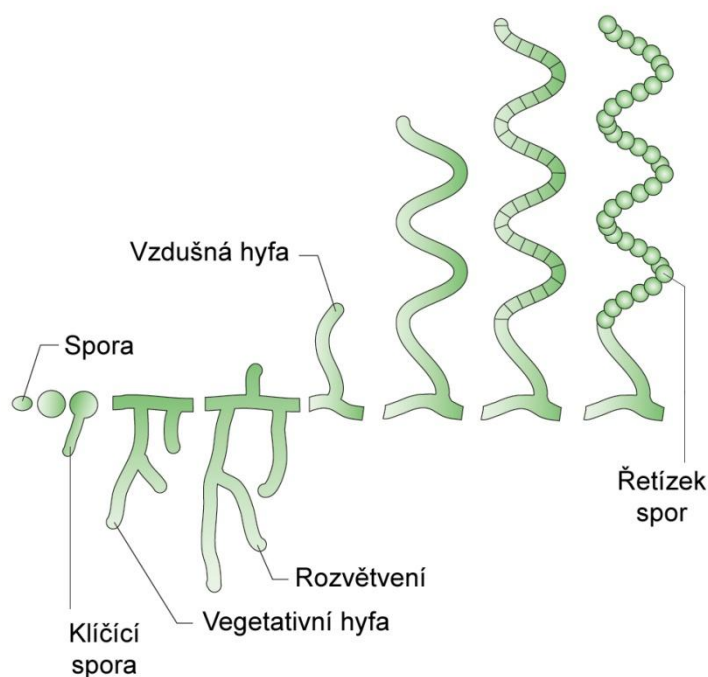
Bakteriální rod *Streptomyces* patří do velmi heterogenního řádu *Actinomycetales*. Zástupci tohoto řádu žijí v půdě, jiní kolonizují moře, termální prameny a dokonce jsou schopni růst na místech ozářených gama-zářením. Jedná se o průmyslově i medicínsky významné organismy. Nalezneme zde jak patogeny lidí, zvířat i rostlin, tak i producenty klinicky významných antibiotik. Jako příklady významnějších zástupců řádu *Actinomycetales* můžeme jmenovat *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium glutamicum* nebo *Frankia alni* (Alam, M. T. et al., 2011). Intenzivně studovaným rodem řádu *Actinomycetales* významným zejména pro své biotechnologické využití je rod *Streptomyces*. Jeho důležitost lze ilustrovat obrovskou škálou sekundárních metabolitů, které se využívají jako antibiotika, antiparazitické látky, herbicidy, imunosupresiva a některé jako důležité enzymy v potravinářství a jiných průmyslových odvětvích. Přestože většina zástupců rodu *Streptomyces* žije saprofitickým způsobem života, někteří zástupci jsou patogenní (Alam, M. T. et al., 2010). Lidský patogen *Streptomyces somaliensis* způsobuje tzv. aktinomycetické mycetomy (Quintana, E. T. et al., 2008). Patogenem rostlin je *Streptomyces scabies*, způsobující strupovitost brambor (Takeuchi, T. et al., 1996). Jako modelový organismus pro studium diferenciací a produkce sekundárních metabolitů je považován intenzivně studovaný druh *Streptomyces coelicolor*.

## 2.2.1. Morfologie a fyziologie

Rod *Streptomyces* byl navržený Waksmanem a Henricem (1943) a zařazen do rodiny *Streptomycetaceae*. Klasifikace prvotně proběhla na základě morfologie a následně chemotypu buněčné stěny. Současný přístup ke klasifikaci prokaryotních organismů je založen na genotypickém a fenotypickém přístupu. Obecně však lze říci, že v průběhu doby docházelo k několika reklasifikacím a přes zlepšení situace způsobené novými molekulárně-genetickými přístupy (využití 16S rRNA, DNA:DNA hybridizace) zůstává situace pro rod *Streptomyces* i nadále složitá. K zpřesnění by mohly pomoci aminokyselinové sekvence konzervovaných proteinů, jaký může být např. Ssg-B protein (Anderson, A. et al. 2001; Girard, G. et al., 2013).

Zástupci rodu *Streptomyces* jsou gram-pozitivní, vláknité, aerobní bakterie obývající půdní prostředí. Jsou důležitým článkem v koloběhu uhlíku v přírodě, neboť jsou schopné degradovat nerozpustné zbytky ostatních organismů, jako je chitin nebo lignocelulosa (Bentley, S. D. et al., 2002). Rod *Streptomyces* vykazuje složitý životní cyklus, který se podobá vláknitým houbám. Rozvětvený vláknitý vegetativní růst dává vznik substrátovému myceliu o průměru 0,5 – 1 μm, které se diferencuje do vzdušných hyf dávajících vznik dlouhým řetězcům reprodukčních spor (Obr. 5) (Flärdh, K. et al 2009; Anderson, A. S. et al. 2001).

Buněčná stěna je chemotypu I. Pro typ I je charakteristická absence typických sacharidů (arabiny, galaktosy, xylosy a madurosy (3-O-metyl-D-galaktosa)), a naopak obsahuje glycin a LL-diaminopimelovou kyselinu (Lechevalier, M. P. et al. 1970). Dalším znakem je typ acylové skupiny muramylového zbytku v peptidoglykanu, kterým je v případě rodu *Streptomyces* acetyl (Uchida, K. et al., 1997).



Obrázek 5: Vývojový životní cyklus *Streptomyces coelicolor* (Převzato a upraveno Flärdh K. et al. 2009)

### 2.2.2. Genetika

Rod *Streptomyces* patří mezi několik bakteriálních rodů, které mají lineární chromozom. Další vlastností těchto bakterií je vysoký podíl GC párů, který se pohybuje v rozmezí zhruba 69 – 78 %. Náročné a konkurenční půdní prostředí a produkce sekundárních metabolitů je v souladu s velikostí genomu, která se pohybuje obvykle kolem 8 – 10 Mb (Anderson, A. S. et al., 2001; Ventura, M. et al., 2007). V případě osekvenovaného genomu *Streptomyces bingchengensis* je jeho velikost stanovena dokonce na 11,937 Mb. Tato hodnota ho řadí mezi největší prozatím osekvenované bakteriální genomy (Wang, X.–J. et al., 2010). Pro porovnání, velikost kompletního genomu *Escherichia coli* K-12 je 4,639 Mb (Blattner, F. R. et al. 1997).

S rozvojem a zlevněním sekvenace DNA se počet celých nebo částečně osekvenovaných genomů rodu *Streptomyces* zvýšil. Prvním byl v roce 2002 genom patřící *Streptomyces coelicolor* A3(2). V tomto konkrétním případě je velikost genomu 8,668 Mb s hustotou genů stanovenou na 88,9 %, která je většinou jednotná napříč chromozomem s nepatrným snížením v periferních regionech. Podíl GC párů je roven 72,12 %. K jeho lokálnímu snížení dochází kolem *oriC* místa (origin of replication). Chromozom se rozděluje na tři části. Centrální oblast pravděpodobně sahá od 1,5 Mb do 6,4 Mb. V této oblasti jsou situované téměř všechny esenciální geny, včetně *oriC*. Periferní části obklopující jádro chromozomu jsou nestejně dlouhé. Levé rameno má velikosti 1,5 Mb a pravé 2,3 Mb. Na ramenech jsou kódované neesenciální geny, které jsou např. zapojeny v syntéze sekundárních metabolitů, produkci hydrolytických exoenzymů a proteinů plynových vezikulů. Tyto periferní oblasti jsou patrně náchylné k častým přestavbám, které by mohly přispívat k metabolické diverzitě rodu *Streptomyces*. Replikace lineárního chromozomu probíhá z *oriC* obousměrně. Na krajích lineárního chromozomu jsou terminální invertované repetice (TIRs), které mají na volném 5' konci kovalentně navázané terminální proteiny (Tpgs), které se podílí na ochraně konců před degradací a na terminaci replikace. Kromě toho jsou využívány také proteiny Tap (telomere-associated protein) asociované s terminální jednořetězcovou DNA (ssDNA). *Streptomyces coelicolor* disponuje velkým množstvím proteinů zapojených v regulaci. Ve svém genomu kóduje např. 65 sigma faktorů (Bentley, S. D. et al., 2002; Bao, K. et al., 2003).

Rod *Streptomyces* může obsahovat lineární nebo cirkulární plazmidy. U *Streptomyces coelicolor* byly identifikovány dva plazmidy. Lineární SCP1 o velikosti 365kb (Bentley, S. D. et al., 2004) a cirkulární, nízkokopiový SCP2 o velikosti 31 kb (Haug, I. et al, 2003).

Porovnání s genomy *Streptomyces avermitilis* a *Streptomyces griseus* poukázalo na některé obecné vlastnosti genomů zástupců rodu *Streptomyces*. Centrální část je vysoce konzervovaná a obsahuje většinu esenciálních genů. Je také strukturně podobná s jinými cirkulárními bakteriálními genomy, což naznačuje společný evoluční původ. Naopak ramena obecně nesou neesenciální geny a jsou jinak dlouhá (Ikeda, H. et al. 2003; Ohnishi, Y. et al. 2008).

### 2.2.3. Produkce sekundárních metabolitů

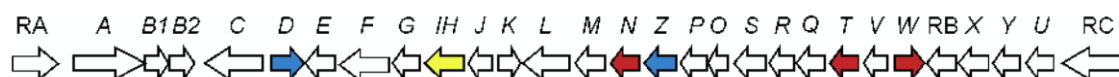
Rod *Streptomyces* produkuje víc jak polovinu známých bioaktivních látek. Geny, které kódují biosyntetické dráhy, jsou skoro vždy seskupeny a tvoří tzv. biosyntetický genový klastr. Součástí klastru

jsou obvykle také regulační a rezistenční geny, které ochraňují producenta před toxicitou syntetizovaného produktu. Geny v klastru nejsou organizovány v jednom operonu, ale v několika transkripčních jednotkách (Hopwood, D. A., 1988; Spížek, J. et al., 1995). Syntéza sekundárních metabolitů je obecně závislá na růstové fázi organismu. Produkce nastává po přechodu do stacionární fáze růstu v tekutém mediu, či ve stádiu tvorby vzdušného mycelia. Na regulaci exprese se podílí jak extracelulární, tak intracelulární molekuly (Bibb, M. J., 2005). Genové klastry jsou často přenášeny sobeckými genetickými elementy, jako jsou genomové ostrovy, nebo plazmidy (Fischbach, M. et al., 2008).

Sekundární metabolity hrají významnou roli v komplikovaném vztahu mikrobiálních druhů, ale také mezi mikroby a mnohobuněčnými organismy. Často se jedná o chemicky rozmanité, neobvyklé a složité látky, které nemají přímou úlohu v primárním metabolismu buňky, ale mají obrovskou škálu funkcí poskytující svým producentům selekční výhodu. Prekurzory využívané k syntéze často pocházejí z primárního metabolismu (Fischbach, M. et al. 2008). V případě produkce linkomycinu se jedná o ribosu-5-fosfát, fruktosu-6-fosfát, či sedoheptulosu-7-fosfát a L-tyrosin (Sasaki, E. et al., 2012; Brahme, N. M. et al., 1984b). Také enzymy zapojené v syntéze jsou blízkými homology enzymů z primárního metabolismu (Fischbach, M. et al. 2008). Většinou je jeden bakteriální druh schopen produkovat více než jeden typ chemicky rozdílných sekundárních metabolitů (Spížek, J. et al. 1995).

### 2.3. *Streptomyces lincolnensis*

K první izolaci tohoto druhu došlo již v roce 1962 (Spížek, J. et al., 2004a). Sekvence genomu této bakterie produkující linkomycin není prozatím publikována. U vysokoprodukčního kmene *Streptomyces lincolnensis* 78-11 (Peschke, U. et al., 1995) a typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (Koběrská, M. et al. 2008) byla publikována sekvence linkomycinového biosyntetického genového klastru. V případě průmyslového kmene je klastř duplikovaný. Při porovnání obou získaných sekvencí bylo objeveno několik rozdílů. Ovšem celková organizace biosyntetického klastru se zdá být konzervována, a to i v ostatních producentech linkomycinu. Uspořádání genů v klastru včetně vyznačených rozdílů většího významu při porovnání obou sekvencí je uvedeno na obrázku 6. Jedná se o 35 kb dlouhý úsek, kódující 29 otevřených čtecích rámců (ORF) (Peschke, U. et al., 1995; Koběrská, M. et al. 2008).



**Obrázek 6: Uspořádání linkomycinového biosyntetického klastru u typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 s vyznačenými rozdíly mezi publikovanou sekvencí klastru z průmyslového kmene *Streptomyces lincolnensis* 78-11 – žlutě je značena fúze genů *lmbH* a *lmbI*, červeně jsou zvýrazněny geny, u kterých došlo k prodloužení, modře jsou zvýrazněny geny s >11 % rozdílnými aminokyselinovými zbytky (převzato z Koběrská, M. et al. 2008).**

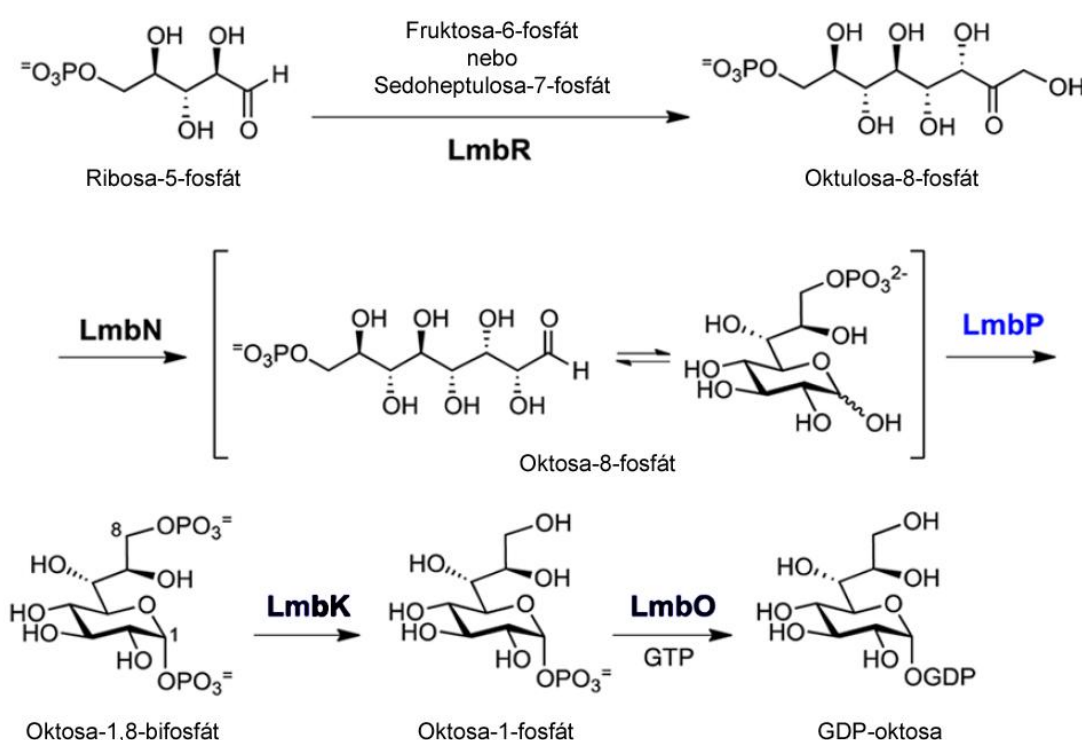
Předpokládá se, že z 29 hypotetických genů jsou 3 geny zapojeny v rezistenci. Patří mezi ně *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)*. Zbylé mají biosyntetickou, či regulační funkci a bývají označovány jako *lmb* geny

(Peschke, U. et al. 1995, Koběrská, M. et al. 2008). Pro některé geny byla funkce potvrzena experimentálně. Jedná se o proteiny LmbB1, LmbB2, LmbC, LmbE, LmbF, LmbJ, LmbT, LmbK, LmbN, LmbO, LmbR, LmbV a LmbW (Novotná, J. et al. 2004; Novotná, J. et al. 2013; Kadlčík, S. et al., 2013; Zhao, Q. et al. 2015; Kameník, Z. et al., v přípravě; Lin, Ch.-I. et al., 2014; Sasaki, E. et al., 2012; Jirásková, P. et al., v přípravě). U ostatních nebyla předpokládaná funkce prozatím ověřena.

### 2.3.1. Biosyntéza linkomycinu

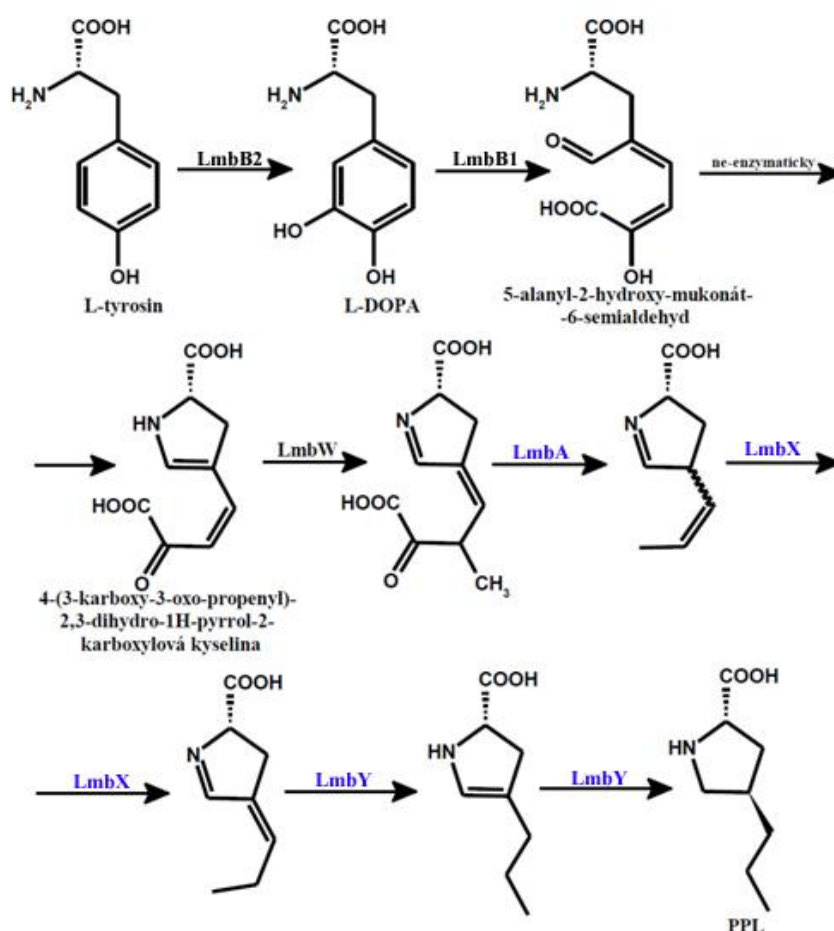
Biosyntéza linkomycinu A probíhá přes vytvoření dvou stavebních částí, propylprolinu (PPL) a GDP-linkosamidu, které jsou následně spojeny. Biosyntetickou dráhu tedy můžeme rozdělit na tři části: (i) dráhu sacharidové části, (ii) dráhu aminokyselinové části a (iii) kondenzaci obou částí následovanou postkondenzačními kroky.

Na obrázku 7 je znázorněna nynější předpokládaná biosyntetická dráha sacharidové části, jejímž konečným intermediátem je aktivovaná forma oktosa (GDP-oktosa) (Lin, Ch.-I. et al., 2014). První reakce této dráhy je katalyzována transaldolou LmbR, čímž vzniká osmiuhlíková sloučenina ( $C_8$ ) oktulosa-8-fosfát. Prekurzory této látky jsou fruktosa-6-fosfát, nebo sedoheptulosa-7-fosfát, které jsou donorem  $C_3$ , a ribosa-5-fosfát ( $C_5$ ), která je akceptorem (Sasaki, E. et al., 2012). V případě proteinu LmbP není předpokládaná kinasová funkce experimentálně ověřena (Lin, Ch.-I. et al., 2014).



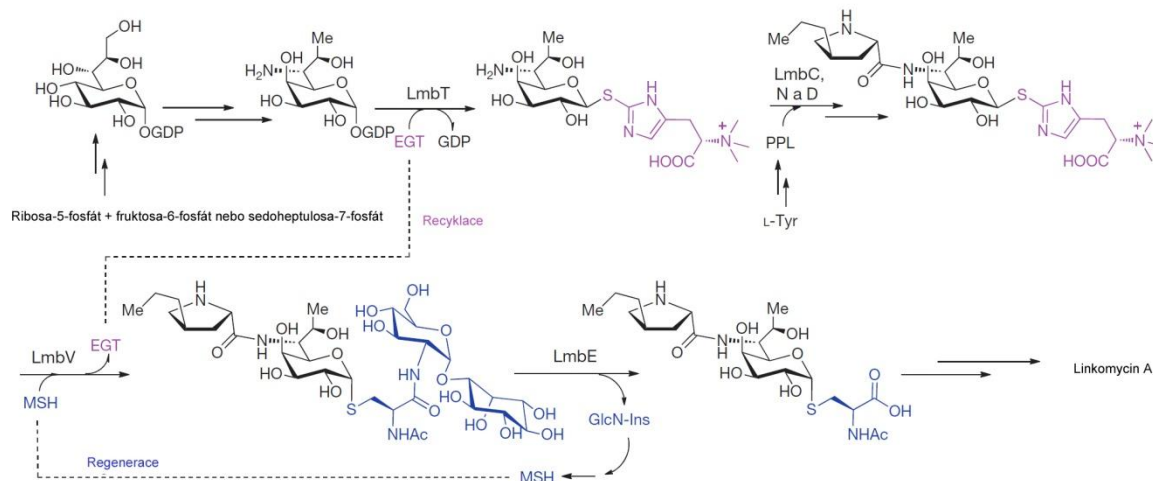
**Obrázek 7: Předpokládaná biosyntetická dráha sacharidové části linkomycinu** – černě znázorněné enzymy jsou proteiny s ověřenou funkcí, modře znázorněný enzym nemá ověřenou funkci. LmbR - transaldolasa, LmbN – isomerasa (Sasaki, E. et al., 2012), LmbP – kinaso, LmbK – fosfatasa, LmbO - nukleotidyltransferasou (převzato a upraveno z Lin, Ch.-I. et al., 2014).

V syntéze PPL by mělo být zapojeno celkem šest proteinů: LmbA, LmbB1, LmbB2, LmbW, LmbX a LmbY. Hypotetické funkce jednotlivých proteinů byly navrženy v závislosti na jejich podobnosti s enzymy o známé funkci (Peschke, U. et al., 1995; Koběřská, M. et al., 2008). Původní představa této větve biosyntetické dráhy (Brahme, N. M. et al., 1984a) se ukázala být nesprávná a v závislosti na získaných poznacích byla revidována. Současný návrh biosyntetické dráhy aminokyselinové části linkomycinu je znázorněn na obrázku 8 (Jirásková P. et al., v přípravě). Prekurzorem pro syntézu PPL je L-tyrosin, který je díky hydroxylase LmbB2 konvertován na L-DOPA (Brahme, N. M. et al., 1984b; Novotná, J. et al., 2013). Dalším potvrzeným krokem biosyntézy PPL je štěpení aromatického jádra L-3,4-dihydroxyfenylalaninu způsobené dioxygenasou LmbB1 (Novotná, J. et al., 2004). Po neenzymatické tvorbě pětičlenného cyklu obsahující dusík, je dalším krokem v této revidované dráze, oproti původní představě, metyltransferasa LmbW následovaná homologem  $\gamma$ -glutamyltransferás LmbA. Při zkoumání LmbA bylo zjištěno, že nepůsobí v součinnosti s LmbY, jak bylo dříve navrhováno, a jeho přítomnost je pro biosyntézu nepostradatelná, neboť při delecí genu *lmbA* není mutantní kmen schopen produkovat téměř žádný linkomycin. Další navrhované kroky biosyntézy jsou znázorněny na obrázku 8 (Jirásková P. et al., v přípravě).



**Obrázek 8: Současný návrh biosyntetické dráhy aminokyselinové části linkomycinu** – černě značené proteiny mají experimentálně ověřenou funkci. V případě modře značených proteinů nebyla funkce prozatím experimentálně potvrzena (převzato a upraveno z Steiningerová, L., 2015).

V nedávné době byla objasněna kondenzace dvou výše popsaných meziproductů (Obr. 9), do které se zapojují krom proteinů kódovaných v biosyntetickém genovém klastru pro syntézu linkomycinu také dva thioily - ergothionein (EGT) a mykothiol (MSH). Vlastní kondenzace probíhá mezi aminosacharidem s připojeným EGT přes atom síry a aktivovaným PPL (Zhao, Q. et al., 2015). Připojení EGT k octose katalyzuje LmbT. Aktivaci PPL zajišťuje samostatně stojící adenylační doména LmbC, která je schopna krom PPL rozeznávat s nižší afinitou také 4-etyl-L-prolin, prekurzor pro linkomycin B (Kadlčík, S. et al., 2013). V této části nachází také uplatnění LmbN, který krom funkce v syntéze sacharidového prekurzoru funguje také jako proteinový přenašeč. Vlastní kondenzace je zajištěna proteinem LmbD. Následně dochází k výměně EGT za MSH, který je dárce atomu síry vyskytující se v konečném produktu. Působením LmbE dochází k odštěpení pseudodi-sacharidu, který je následně regenerován opět na MSH (Zhao, Q. et al., 2015). Poté dochází dalšími reakcemi, ve kterých by se měly účastnit proteiny LmbJ, LmbF a LmbG, k získání konečného produktu – linkomycinu A (Kameník, Z. et al., v přípravě).



**Obrázek 9: Kondenzace prekurzorů linkomycinu** - Thioily účastníci se kondenzace PPL s GDP-D- $\alpha$ -D-linkosamidem jsou barevně rozlišeny. Růžově je označený EGT a modře MSH (Převzato a upraveno z Zhao, Q. et al., 2015)

### 2.3.2. Rezistence

Snížení citlivosti bakterií vůči různým druhům antibiotik může být způsobeno různými důvody. Některé mohou být danému druhu vlastní, jiné způsobené funkcí různých enzymů. Všeobecně však lze mechanismy rezistence rozdělit na tři základní druhy: (i) rezistenci způsobenou změnou cílového místa, (ii) snížení akumulace antibiotika v buňce a (iii) inaktivaci antibiotika (Butaye, P. et al., 2003; Wright, G. D., 2005). Odolnost vůči antibiotikům je sice z medicínského hlediska významnější u patogenů než u producentů, ale často se jedná o stejné mechanismy rezistence způsobené enzymy patřící do stejných proteinových rodin (Forsberg, K. J. et al., 2012). Rezistenční geny jsou často kódovány na přenositelných elementech, díky kterým mohou být předávány nejen z generace na generaci, ale také pomocí horizontálního genetického přenosu (Normark, B. H. et al., 2002; Butaye, P. et al., 2003). To je v souladu s možným původem alespoň některých rezistenčních genů z patogenních bakterií, který může být právě u producentů (Benveniste, R. et al., 1973; Forsberg, K. J. et al., 2012). Producenti antibiotik navíc většinou

disponují více než jedním rezistenčním mechanismem proti produkovanému metabolitu (Spížek, J. et al., 1995). V případě *Streptomyces lincolnensis* se tedy nejedná o výjimku. Toto činí z producentů zajímavé organismy pro zkoumání rezistence. S ohledem na rezistenci udílenou ARE proteiny je nutné kromě linkosamidových antibiotik brát v úvahu také makrolidy, streptograminy a pleuromutiliny. Jak již bylo uvedeno, zmíněná antibiotika inhibují bakteriální proteosyntézu vazbou k velké 50S podjednotce ribozomu, konkrétně vazbou k V doméně 23S rRNA, což má za následek také zkříženou rezistenci

## **Lmr(B) - rezistence způsobená změnou zásahového místa**

Protein Lmr(B) je 23S rRNA A<sub>2058</sub> N<sub>6</sub> – monometyltransferasa patřící do rodiny Erm (erythromycin-ribosome methylase) metyltransferas, které obecně udílejí rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminům B (MLS<sub>B</sub>) (Zhang, H. – Z. et al., 1992). Metylace specifického adeninu na 23S rRNA odpovídající v *Escherichia coli* pozici 2058 má za následek zamezení vazby výše uvedených antibiotik k velké podjednotce bakteriálního ribozomu. Tato změna zásahového místa tedy způsobuje zkříženou rezistenci k těmto antibiotikům. Kromě Erm metyltransferas byla u *Staphylococcus aureus* popsána Cfr metyltransferasa, která metyluje adenosin v pozici 2503 23S rRNA, čímž udílí zkříženou rezistenci k pleuromutilinům, linkosamidům a streptograminům, ale také k fenikolům a oxazolidinonům (Long, K. S. et al. 2006).

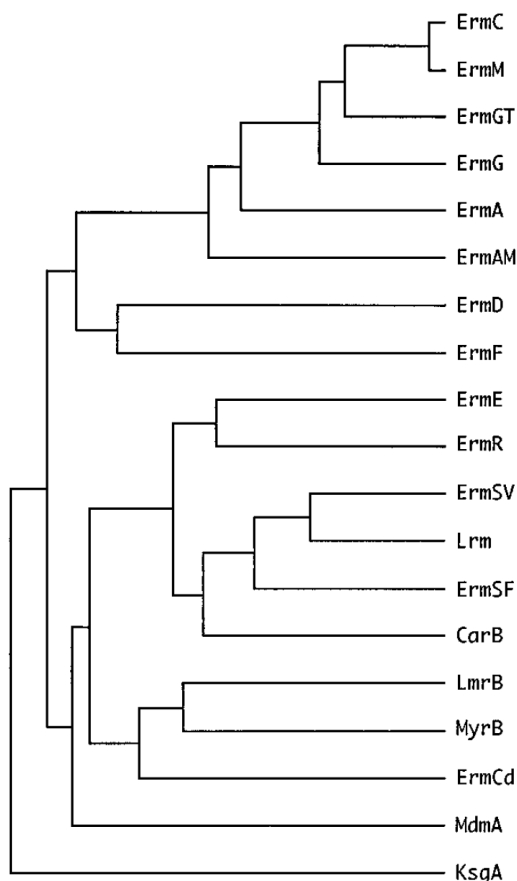
Ke změně zásahového místa může dojít krom zmíněné posttranslační modifikace také díky mutacím. Na uvedené druhy antibiotik mají vliv mutace v pozici 2058 a 2059 (uvedené číslování z *Escherichia coli*), způsobující rezistenci k makrolidům a linkosamidům (ML rezistence). Pokud dojde k mutaci v obou pozicích zároveň, rozšíří se rezistence o streptograminy B (MLS<sub>B</sub>) (Leclercq, R. 2002). Vliv na rezistenci k makrolidům mají také pozice 2057, 2452 a 2611, a v II. doméně pozice 754, které se vyskytují v blízkosti vazebného místa, ale udílí nižší úroveň rezistence. Počet operonů kódující rRNA a nesoucí mutace rozhoduje o intenzitě udílené rezistence (Vester, B. et al. 2001). Rezistenci mohou ovlivňovat také mutace v genech kódujících ribozomální proteiny (Tait – Kamradt, A. et al. 2000; Leclercq, R. 2002; Bøsling, J. et al., 2003).

### **2.3.2.1.1. Erm metyltransferasy**

Zástupci této relativně velké proteinové rodiny, díky kterým dochází k N<sub>6</sub> mono- nebo N<sub>6,6</sub> dimetylacii adeninu v pozici 2058 23S rRNA, jsou rozšířeni mezi gram-pozitivními bakteriemi, jako jsou *Streptococcus pneumoniae*, nebo rod *Corynebacterium*. Nalezneme je ale také u gram-negativních bakterií (*Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*) a spirochet, mezi které patří např. *Borrelia burgorferi*. Mnoho *erm* genů je asociováno s konjugativními, nebo nekonjugativními transpozony, které mají tendenci být lokalizovány v chromozomu. Ovšem některé z nich byly nalezeny také na plasmidech. Široká škála hostitelů pro konjugativní transpozony vysvětluje výskyt těchto genů v klinických izolátech mnoha bakteriálních druhů. Většina genů této rodiny nese označení *erm*, ale jsou zde výjimky v podobě enzymů vyskytujících se u producentů antibiotik. Tyto metyltransferasy, zapojené v ochraně producenta, mají často označení společné pro daný biosyntetický klastr (Roberts, M. C. et al., 1999). Patří mezi ně např. také již zmíněný gen *lmr(B)* ze *Streptomyces lincolnensis* (Zhang, H.–Z. et al., 1992), *carB* z producenta



karbomycinu *Streptomyces thermotolerans* (Zalacain, M. et al., 1990) a nebo *tlrD* z producenta tylosinu *Streptomyces fradiae* (Zalacain, M. et al., 1991). Jedná se o relativně homogenní skupinu enzymů, sdílející mezi sebou sekvenční identitu v rozmezí 24 – 85 % (Schluckebier, G. et al. 1999). Jejich vysoký stupeň aminokyselinové sekvenční identity naznačuje, že mají společného předka (Weisblum, B., 1995). Na dendrogramu (Obr. 10) je znázorněné umístění *lmr(B)* v kontextu s jinými metyltransferasami.



**Obrázek 10: Dendrogram odvozený od aminokyselinových sekvencí Erm proteinů (převzato z Weisblum, B. 1995).**

Ohledně klasifikace můžeme tuto proteinovou rodinu dělit do 21 tříd nesoucí označení A – Z s vynecháním písmen J, K, L, M a P. V závislosti na funkci lze tyto enzymy dělit na mono- nebo dimethyltransferasy (Roberts, M. C. et al., 1997). Monomethyltransferasy, jako je např. Lmr(B), udílejí tzv. MLS<sub>B</sub> fenotyp typu I, tedy vysokou rezistenci k linkosamidům, ale pouze nízkou či střední rezistenci k makrolidům a streptograminům B (Madsen, Ch. T. et al., 2005). Schopnost genu *lmr(B)* udílet rezistenci byla testována v heterologním hostiteli *Streptomyces lividans* 66 kmen TK23. Bylo zjištěno, že gen udílí vysokou hladinu rezistence k linkomycinu, avšak pro klindamycin žádná změna pozorována nebyla (Tab. 4) (Zhang, H.–Z. et al., 1992). Naopak dimethyltransferasy udílejí vysokou rezistenci ke všem MLS<sub>B</sub> antibiotikům (MLS<sub>B</sub> fenotyp typu II) (Madsen, Ch. T. et al., 2005). Exprese *erm* genů je primárně inducibilní, přičemž je regulována mechanismem atenuace translace nebo i transkripce. V nepřítomnosti induktoru, např. erytromycinu, zaujímá mRNA inaktivní konformaci, díky které dochází k zakrytí Shine-Dalgarnovy sekvence. Tím dochází k zamezení úspěšné iniciace translace *erm* transkriptu (Roberts, M. C. et al., 1999). Atenuace transkripce byla popsána u *erm(K)*. V tomto případě dochází prostřednictvím dvou

$\rho$ -nezávislých terminátorů k předčasnému ukončení transkripce mRNA v nepřítomnosti induktoru (Choi, S.-S. et al., 1997). Sekundárně může dojít ke konstitutivní expresi a to v důsledku strukturních změn v části atenuátoru způsobených delecí, duplikací anebo bodovou mutací. Poslední dobou dochází k častější izolaci kmenů nesoucí konstitutivně se exprimující proteiny (Roberts, M. C. et al., 1999; Werckenthin, Ch. et al. 1999). Při konstitutivní expresi Erm metylas dochází k rozšíření MLS<sub>B</sub> rezistence také na 16-členné makrolidy a ketolidy (Schmitz, F. J. et al., 2001).

Na základě strukturní analýzy proteinů Erm je známo, že se skládají ze dvou strukturních domén, konzervované N-terminální katalytické domény a C-terminální RNA-vazebné domény. N-terminální doména je podobná s nukleotid nebo dinukleotid vazebnými proteiny (Bussiere, D. E. et al. 1998; Schluckebier, G. et al., 1999).

**Tabulka 4: Stanovené hodnoty MIC (převzato a upraveno Zhang, H. –Z. et al., 1992)**

Bakteriální kmeny	MIC <sup>1</sup> antibiotik (µg/ml)			
	LIN	CLI	Celesticetin	ERY
<i>Streptomyces lincolnensis</i> 78-11	>1000	64	<8	64
<i>Streptomyces lividans</i> TK23 (pIJ702)	64	64	1000	32
<i>Streptomyces lividans</i> LR2 ( <i>lmr(B)</i> )	>1000	64	>1000	64

Pozn. <sup>1</sup> Minimální inhibiční koncentrace

### 2.3.2.2. *Lmr(A)* – rezistence způsobená efluxem antibiotik

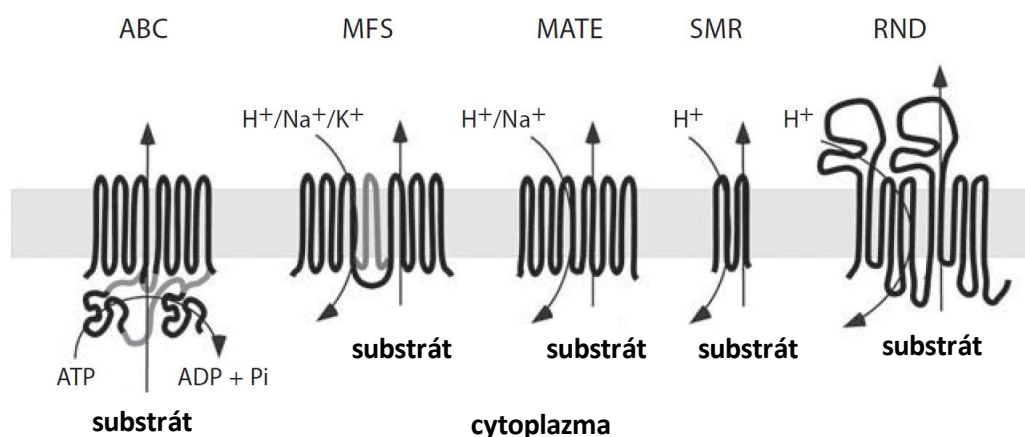
Rezistence způsobená snížením akumulace antibiotik uvnitř buňky může být spjata s aktivním transportem. Gen *lmr(A)* o velikosti 1446 bp kóduje transportér patřící do proteinové rodiny MFS. Jeho primární funkcí je pravděpodobně export nově nasyntetizovaného antibiotika ven z buňky, čímž však také může přispět k rezistenci. Schopnost genu *lmr(A)* udílet rezistenci byla testována jeho přenesením do heterologního hostitele *Streptomyces lividans* 66 kmen TK23. Ze získaných hodnot minimálních inhibičních koncentrací (MIC) (Tab. 5) bylo zjištěno, že gen *lmr(A)* udílí vysokou úroveň rezistence k linkomycinu. (Zhang, H.–Z. et al., 1992).

**Tabulka 5: Stanovené hodnoty MIC (převzato a upraveno Zhang, H.–Z. et al., 1992)**

Bakteriální kmeny	MIC antibiotik (µg/ml)			
	LIN	CLI	Celesticetin	ERY
<i>Streptomyces lincolnensis</i> 78-11	>1000	64	<8	64
<i>Streptomyces lividans</i> TK23 (pIJ702)	64	64	1000	32
<i>Streptomyces lividans</i> LR1 ( <i>lmr(A)</i> )	>1000	32	500	16
<i>Streptomyces lividans</i> LR3 ( <i>lmr(A)</i> )	>1000	64	1000	64

Geny kódující transportéry, díky kterým dochází k efluxu antibiotik vně buňky, můžeme nalézt jak u gram-negativních, tak i gram-pozitivních bakterií. Transportéry jsou schopné rozeznávat buď omezenou

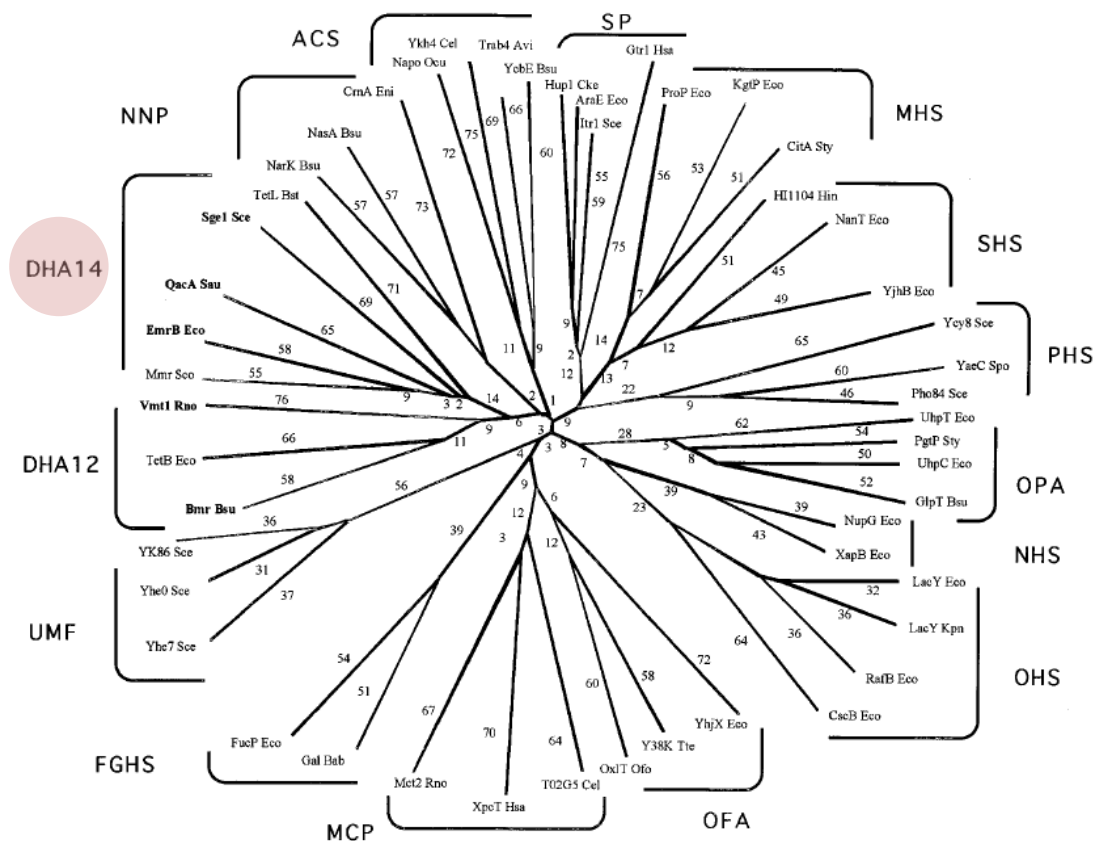
škálu látek, specifické transportéry, nebo široké spektrum látek, tzv. multidrug transportéry (MDR) (Butaye, P. et al. 2003). Aktivní eflux MLS antibiotik je nejčastěji zprostředkováván pomocí proteinů z rodin ABC proteinů (ATP-binding cassette) a MFS (major facilitator superfamily). Dalšími rodinami transportních proteinů jsou RND (resistance-nodulation-division), MATE (multidrug and toxic compound extrusion) a SMR (small multidrug resistance), která je členem větší nadrodiny DMT (drug/metabolite transporter). Jejich schematické znázornění je uvedeno na obrázku 11 (Wilson, D. N., 2014).



Obrázek 11: Schematické znázornění hlavních rodin transportérů (Převzato a upraveno z Hassan, K. A. et al., 2007)

### 2.3.2.2.1. MFS (Major facilitator superfamily) proteiny

Jedná se o největší a nejrozmanitější proteinovou nadrodinu sekundárních transportérů. Z funkčního hlediska se jedná buď o uniportéry, symportéry, nebo antiportéry přenášející široké spektrum látek včetně iontů, aminokyselin, peptidů, sacharidů, polyolů, toxinů, lipidů, antibiotik a jiných léčiv. energii pro transport získávají z elektrochemického gradientu nejčastěji H<sup>+</sup>, nebo Na<sup>+</sup> iontů. Jsou velmi rozšířené. Nalézt je můžeme v organismech od bakterií, až po člověka (Law, Ch. J. et al. 2008; Pao, S. S. et al., 1998). V případě bakterií lze jejich zástupce nalézt jak u producentů antibiotik, mezi které se řadí právě Lmr(A), tak u patogenů. Jako příklad lze uvést Mef(A) vyskytující se u gram-pozitivních bakterií (rody *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* a další), kde udílí rezistenci k makrolidům (M fenotyp) (Butaye, P. et al. 2003). Na základě stupně sekvenční podobnosti lze pro tuto obrovskou nadrodinu sestavit fylogenetický strom, na základě kterého lze MFS proteiny rozdělit do 17 rodin, přičemž Lmr(A) spadá do rodiny označované jako DHA14 (Obr. 12) (Pao, S. S. et al., 1998).



**Obrázek 12: Phylogenetický strom MFS proteinů – růžově vyznačená rodina obsahuje *lmr(A)* ze *Streptomyces lincolnensis* (Převzato a upraveno z Pao, S. S. et al. 1998)**

Přesto, že se jedná o významnou proteinovou nadrodinu s velkým počtem osekvenovaných proteinů, není tato rodina, vzhledem k tomu, že se jedná o membránové proteiny, prozatím dostatečně probádána. Většinou se jedná o proteiny s délkou 400 – 600 aminokyselin, které disponují nejčastěji s 12, nebo 6, 14 a 24 transmembránovými  $\alpha$  helixy (TM). Pro některé MFS proteiny byla vyřešena krystalová struktura, např. pro LacY, EmrD nebo Xyle z *Escherichia coli* (Abramson, J. et al., 2003; Yin, Y. et al., 2006; Sun, L. et al. 2012). Proteiny navzájem sdílí jen velmi nízkou sekvenční a substrátovou podobnost, ale všechny mají společný strukturální motiv nazývaný MFS fold. Strukturu proteinu lze rozdělit na dvě části, N- a C-doménu (Yan, N. 2013). N- a C- koncové části proteinu jsou umístěny na cytoplazmatické straně membrány. Přes vzájemnou rozdílnost mimo rodiny lze u MFS proteinů nalézt dvě konzervované sekvence, DRXXRR, nalézající se ve smyčce mezi druhým a třetí TM helixem u N-domény a mezi osmým a devátým TM helixem v C-doméně. Obě domény vykazují slabou sekvenční homologii naznačující, že molekula mohla vzniknout přes duplikaci nebo fúzi (Law, Ch. J. et al. 2008). Využitím počítačové analýzy a hydrophaty profilu aminokyselinové sekvence bylo odvozeno, že by protein Lmr(A) mohl obsahovat 12 transmembránových segmentů. Na základě výsledků porovnání sekvencí byly také navrženy funkce N- a C- koncových domén proteinu. N- koncová doména by mohla být zapojena v protonové translokaci a C-koncová v rozeznávání substrátu (Zhang, H.-Z. et al., 1992).

### 2.3.2.2.2. ABC proteiny

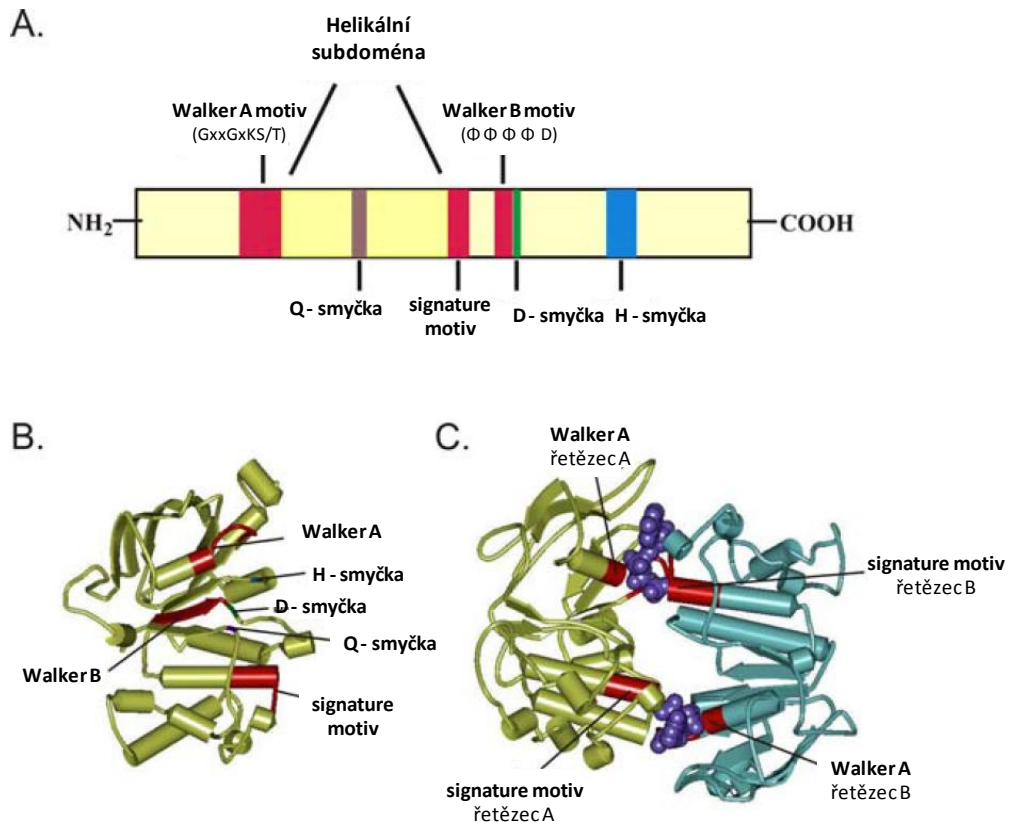
ABC proteiny (ATP-binding cassete) jsou jednou z největších proteinových nadrodin, která se krom transportu obrovské škály látek účastní také netransportních funkcí. energii pro svou funkci získávají tyto proteiny hydrolýzou ATP. ABC proteiny byly nalezeny u zástupců všech tří nadříší (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*) a mimo to byly nalezeny i u velkých virů (Licht, A. et al. 2011). To podporuje domněnku, že se jedná o evolučně velmi starou skupinu proteinů (Saurin W. et al., 1999). Svůj význam mají i z pohledu medicínského, neboť disfunkce těchto proteinů je příčinou závažných dědičných onemocnění, jakým je např. cystická fibróza. U bakterií ABC proteiny významně ovlivňují fyziologii a jsou důležité ve spojitosti s životaschopností, virulencí a patogenitou (Davidson, A. L. et al., 2008).

Ač se jedná o velmi rozmanitou skupinu proteinů, mají společnou základní strukturu. Funkční ABC transportér je obecně tvořen dvěma transmembránovými (TMD) a dvěma nukleotid vazebnými (NBD) doménami.

TMD tvořící průchod přes membránu není příliš konzervována, což reflektuje širokou substrátovou specificitu těchto proteinů. Všeobecně je tvořena 5 – 10 transmembránovými helixy. Přes její různorodost byl u importérů charakterizován tzv. EAA motiv, který je zapojen v interakci mezi TMD a NBD (Kos, V. et al. 2009; Licht, A. et al., 2011).

Hydrofilní NBD je schopná vázat a hydrolyzovat ATP, čímž získává potřebnou energii pro funkci celého proteinu. Je konzervována napříč celou proteinovou nadrodinou a obsahuje specifické motivy (Obr. 13). Některé z nich definují ABC proteiny. NBD lze ještě dále dělit na Rec-A like katalytickou subdoménu a menší, strukturně více rozdílnou helikální subdoménu (Rees, D. C. et al. 2009; Licht, A. et al., 2011). Rec-A like subdoména je typicky složena ze dvou  $\beta$ -skládaných listů a šesti  $\alpha$ -helixů. Mezi vysoce konzervované motivy této domény patří Walker A motiv, neboli P-smyčka (GxxGxGKS/T, kde x je libovolná aminokyselina), Walker B motiv ( $\phi \phi \phi \phi D$ , kde  $\phi$  představuje hydrofobní aminokyselinový zbytek) a D - smyčka (D - loop), která obsahuje konzervovanou sekvenci SALD a je lokalizována v blízkosti Walker B motivu (Davidson, A. L. et al., 2008; Kos, V. et al., 2009). Helikální subdoména je často tvořena třemi nebo čtyřmi helixy a obsahuje signature motiv, který je také znám pod označením LSGGQ motiv a nalézá se mezi Walker A a Walker B motivy (Obr. 13A a B). Jedná se o typický motiv pro ABC proteiny (Davidson, A. L. et al., 2008; Kos, V. et al., 2009). Subdomény jsou spojeny dvěma flexibilními smyčkami. Jedna z nich tzv. Q – smyčka (Q – loop) obsahuje konzervovaný glutaminový zbytek (Davidson A. L. et al., 2008).

NBD domény váží dvě molekuly ATP. Molekula ATP se váže mezi Walker A motiv jedné domény a signature motiv druhé. Vzniklá struktura je označována jako sandwich dimer (Obr. 13C). S ATP dále interagují také Walker B motiv a konzervovaný histidin v tzv. H-smyčce (swich region) (Kos, V. et al., 2009).



**Obrázek 13: Konzervované motivy NBD domén.** A - Lineární zobrazení NBD (x - libovolná aminokyselina; h – hydrofobní aminokyselina); B – Struktura NBD monomeru; C – Struktura NBD dimeru (Převzato a upraveno z Licht, A. et al. 2011).

Z funkčního a strukturního hlediska lze tyto proteiny dělit do tří tříd. První a třetí třídu tvoří proteiny zapojené v transportních funkcích. Konkrétně se v první třídě nalézají exportéry, které mají nejčastěji NBD-TMD fúzovanou do jednoho polypeptidového řetězce a jsou zapojeny v sekreci různých molekul. Do třetí třídy patří většinou importéry, jejichž doménové uspořádání je značně různorodé a jsou zapojeny v příjmu živin. Druhá třída se významně od zbylých dvou odlišuje. Zahrnuje proteiny, které mají dvě NBD fúzované na jednom polypeptidovém řetězci avšak postrádají TMD. Z funkčního hlediska jsou zapojeny buď v rezistenci, nebo netransportních funkcích (Davidson, A. L. et al., 2008; Licht, A. et al., 2011).

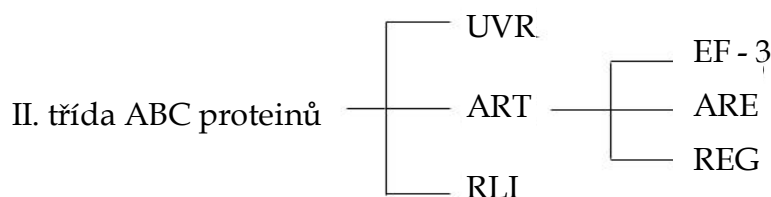
### 2.3.2.3. Lmr(C) – rezistence spojena s aktivním transportem, či pasivní difusí?

Gen *lmr(C)* nalézající se na okraji biosyntetického genového klastru kóduje protein patřící do II. třídy ABC proteinů, konkrétně do podrodiny ARE proteinů. Při porovnání *Lmr(C)* s jinými proteiny této podrodiny (*Tlr(C)*, *Car(A)*, *Smr(B)* a *Msr(A)*) bylo zjištěno, že s nimi sdílí aminokyselinovou identitu v rozmezí 27 – 30 %. Schopnost proteinu *Lmr(C)* udílet rezistenci byla testována v heterologním hostiteli *Streptomyces lividans* TK23. MIC pro linkomycin se zvýšila z 63 µg/ml na 500 µg/ml. Pro erytromycin bylo také pozorováno zvýšení, a to z původních 31 µg/ml na 125 µg/ml (Peschke, U. et al. 1995). V roce

2014 byl v čínském periodiku publikován článek, ve kterém jeho autoři zjišťovali jak delece genu *lmr(C)* ve vysokoprodukčním kmeni *Streptomyces lincolnensis* LC-G ovlivňuje produkci linkomycinu a rezistenci. Po deleci genu došlo k snížení jak produkce linkomycinu do media přibližně o 50 %, tak i rezistence z původní hodnoty 300 µg/ml na 150 µg/ml. U deleční mutanty byla také pomocí RT – PCR sledována úroveň transkripce tří vybraných *lmb* genů (*lmbA*, *lmbR* a *lmbU*). Pro geny *lmbA* a *lmbR* došlo k snížení úrovně exprese, naopak u genu *lmbU* změna pozorována nebyla. Tento výsledek by mohl vypovídat o možné regulační funkci *Lmr(C)*. V tomto článku bylo dále sledováno, zda zvýšená exprese genu *lmr(C)* nějakým způsobem ovlivňuje produkci linkomycinu a expresi sledovaných *lmb* genů. Žádný zásadní vliv ovšem pozorován nebyl (Xu, J.-J. et al. 2014).

### 2.3.2.3.1. II. třída ABC proteinů

Jak již bylo zmíněno, proteiny II. třídy ABC proteinů na rozdíl od ostatních zástupců této nadrodiny obsahují pouze dvě NBD domény kódované na jednom polypeptidickém řetězci. TMD doména nebyla pro tyto proteiny zatím identifikována. Fakt, že postrádají část, která tvoří průchod buněčnou membránou, koresponduje se zapojením těchto proteinů v netransportních funkcích. Další funkcí těchto proteinů je udílení rezistence. II. třída se dále dělí na tři rodiny (Obr. 14) (Dassa E. et al., 2001).



Obrázek 14: Členění II. třídy ABC proteinů

Proteiny patřící do UVR rodiny jsou buď zapojeny v opravě poškozené DNA, jako příklad můžeme uvést protein UvrA, nebo se podílejí na rezistenci, jako například protein DrrC ze *Streptomyces peucetius* udílející rezistenci k protinadorovému chemoterapeutiku daunorubicinu (Davidson, A. L. 2008; Lomovskaya, N. et al., 1996).

Proteiny z RLI (RNasa L inhibitor) rodiny jsou konzervované mezi eukaryoty i archea. V několika nezávislých studiích byl nalezen RLI1 asociovaný s 40S podjednotkou ribozomu a eukaryotickými translačními iniciačními faktory eIF3, eIF5 a eIF2 (Davidson, A. L. et al., 2008).

ART rodina se dále dělí na tři podrodiny. Mezi zástupce podrodiny EF-3 zapojené v translační elongaci patří esenciální kvasinkový elongační faktor eEF-3 (Dassa, E. et al., 2001). Tak, jako jiné proteiny II. třídy ABC proteinů, disponuje pouze dvěma ATP-vazebnými doménami doplněnými o další domény. První NBD doméně předchází HEAT doména a druhá je přerušena tzv. chromodoménou. Pro eEF-3 z *Saccharomyces cerevisiae* byla publikována krystalová struktura a je také potvrzena jeho

interakce s ribozomem (Andersen, Ch. B. F. et al., 2006). Zástupci další podrodiny, tedy podrodiny REG, se účastní regulačních funkcí v buňce. Zástupci této podrodiny se vyskytují jak u eukaryotních, tak prokaryotních organismů. Poslední třetí podrodinou je pro nás tolik zajímavá podrodina ARE (antibiotic resistance) proteinů udílející rezistenci k makrolidům, streptograminům, linkosamidům a pleuromutilinům (Dassa, E. et al., 2001).

### 2.3.2.3.2. ARE proteiny

ARE proteiny patří mezi klinicky významné skupiny proteinů, neboť jejich zástupce lze nalézt krom producentů MLS antibiotik (Méndez, C. et al., 2001), také u závažných lidských patogenů, kde komplikují léčbu. V tabulce 6 jsou uvedeni někteří zástupci této podrodiny. Mezi klinicky významné zástupce patří Msr(A) nebo Vga(A) proteiny typické pro rod *Staphylococcus*. Tyto dva proteiny jsou zároveň nejlépe prostudovanými ARE proteiny (Dassa, E. et al., 2001). Gen *msr(A)* byl také nalezen u rodů *Streptococcus* ssp., *Enterococcus* ssp., *Corynebacterium* ssp. a *Pseudomonas* ssp. Tyto geny vykazují vzájemnou identitu v rozmezí 99 – 100 % (Ojo, K. K. et al., 2006). Na fylogenetickém stromu experimentálně testovaných ARE proteinů (Obr. 15) lze vidět, že ARE proteiny z producentů antibiotik, včetně Lmr(C), tvoří vlastní podskupinu.

**Tabulka 6: Přehled vybraných ARE proteinů**

Enzym	Rezistence	Organismus	Reference
Vga(A)	$LS_A$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cheaneau, O. et al., 2005
Vga(A) <sub>LC</sub>	$LS_A$	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Novotna, G. et al., 2006
Vga(E)	$LS_{AP}$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Schwendener, S. et al., 2011
Msr(A)	$MS_B$	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ross, J. I. et al., 1990
Sal(A)	$LS_A$	<i>Staphylococcus scifi</i>	Hot, Ch. et al., 2014
Lsa(C)	$LS_{AP}$	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Malbruny, B. et al., 2011
Ole(B)	Oleandomycin (M)	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Olano, C. et al., 1995
Tlr(C)	Tylosin ( $M_{16}$ )	<i>Streptomyces fradiae</i>	Kerr, I. D. et al., 2005
Car(A)	Karbomycin( $M_{16}$ )	<i>Streptomyces thermotolerans</i>	Kerr, I. D. et al., 2005

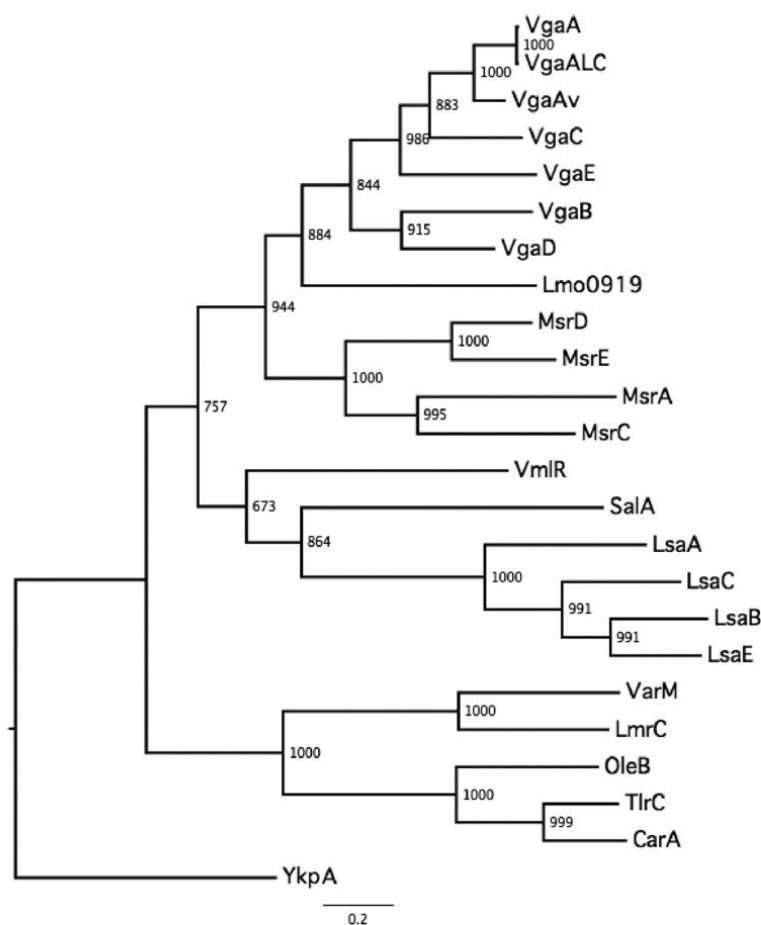
Pozn.  $LS_A$  – rezistence k streptograminům A a nízká hladina rezistence k linkosamidům;  $LS_{AP}$  – linkosamidy, streptograminy A;  $LS_{AP}$  – linkosamidy, streptograminy A a pleuromutiliny;  $MS_B$  – makrolidy, streptograminy B; M – makrolidové antibiotikum;  $M_{16}$  – 16-členný makrolid

Pro Ole(B) bylo zjištěno, že exprese je regulována v závislosti na produkci oleandomycinu (OM) (Olano C. et al., 1995). Což je v souladu s faktem, že biosyntetické genové klastry mají své geny uspořádané do několika transkripčních jednotek (Hopwood, D. A., 1988). Genu *msr(A)* naopak předchází kontrolní oblast obsahující promotor, čtyři invertované repetitivní sekvence, dvě ribozom vazebná místa a krátký ORF kódující tzv. „leader peptid“ (LP), což naznačuje, že exprese je regulována pravděpodobně atenuací translace, tak jako v případě *erm* genů. Delece části této kontrolní oblasti měla za následek, stejně jako v případě *erm* genů, konstitutivní rezistenční fenotyp  $MS_B$ , který nebyl ovlivněn přidáním



erytromycinu jako induktoru (Ross, J. I. et al., 1996). Podobná regulační oblast byla nalezena také u genu *msr(C)* z *Enterococcus faecium* (Reynolds, E. D. et al., 2005).

Z příslušnosti k II. třídě ABC proteinů vyplývá jejich struktura. ARE proteiny obsahují dvě NBD domény, které leží na jednom polypeptidovém řetězci, bez identifikované TMD domény (Licht, A. et al., 2011). Obě NBD domény jsou odděleny různě dlouhým, na glutamin bohatým, úsekem označeným jako Q-linker. Mechanismus udílení rezistence těmito proteiny není zatím znám. V literatuře jsou diskutovány dvě hypotézy. Možnou funkcí těchto proteinů by mohl být aktivní transport antibiotik ven z buněk. Alternativní hypotézou je ochrana ribozomu před vazbou antibiotik (Kerr, I. D. et al., 2005; Chesneau, O. et al., 2005; Reynolds, E. D. et al., 2005).



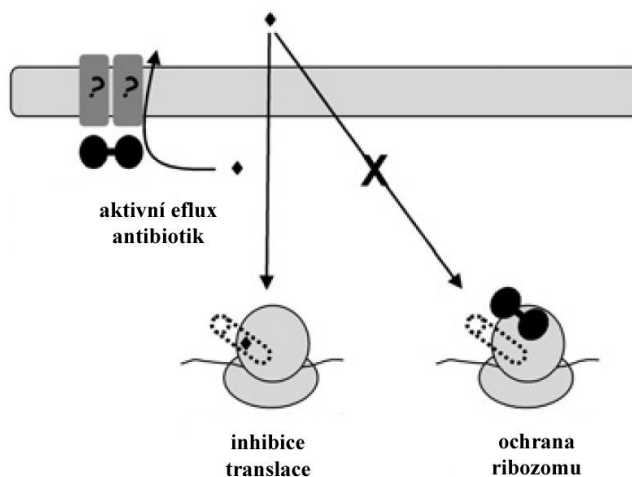
Obrázek 15: Fylogenetický strom ARE proteinů (převzato Hot, Ch. et al., 2014)

### 2.3.2.3.3. Mechanismus funkce ARE proteinů

Mechanismus funkce těchto proteinů, jak již bylo zmíněno výše, není prozatím známý. V dostupné literatuře jsou diskutovány dva mechanismy funkce (Obr. 16): (i) aktivní eflux a (ii) ochrana ribozomu. Pro různé ARE proteiny byly provedeny experimenty za účelem potvrzení jednoho z uvedených mechanismů. Do současné doby ale není ani jeden z navrhovaných mechanismů s určitostí potvrzen.

V případě rezistence spojené s aktivním transportem se předpokládá, že existuje interagující membránový protein, který nahradí chybějící TMD doménu, čímž vznikne celý funkční transportér (Reynolds, E. et al., 2003). Objevení takového interagujícího proteinu by tuto teorii potvrdilo. Na plasmidu pUL5050 ze *Staphylococcus epidermidis* byl kromě genu *msr(A)* nalezen druhý ABC transportér kódovaný dvěma ORF, *stpA* a *smpA*. Gen *stpA* kóduje NBD doménu a druhý čtecí rámec *smpA* kóduje TMD, u kterého se předpokládalo, že by mohl být hledaným interagujícím partnerem. Sekvenčně podobné geny *stpC* a *smpC* byly také nalezeny v chromozomu *Staphylococcus aureus* RN420 (Ross, J. I. et al., 1995). Tato hypotéza se však nepotvrdila, neboť inaktivace *smpA-stpA* ani *stpC-smpC* neměla vliv na schopnost *msr(A)* udílet rezistenci (Ross, J. I. et al., 1996). Nedávno byla pro ARE protein Msr(D) a MFS transportér Mef(E) zjištěna jejich vzájemná funkční kooperace. Ovšem přímé zapojení Msr(D) v transportu makrolidů nebylo prozatím prokázáno (Nunez-Samudio, V. et al., 2013). Protože ARE proteiny jsou schopné udílet rezistenci i v některých heterologních hostitelích, je pravděpodobné, že pokud se opravdu jedná o transport, nemusí jít pouze o jeden specifický interagující protein.

Pro některé ARE proteiny byla zkoumaná jejich buněčná lokalizace. V klinických izolátech *Staphylococcus epidermidis* BM10385 a IPF69 byl protein Vga(A) detekován stejně tak jako  $\beta$ -podjednotka  $F_1-F_0$  ATPasy v membránové buněčné frakci. V ostatních buněčných frakcích, ribozomální a cytosolické, protein zjištěn nebyl. Toto pozorování by mohlo naznačovat, že Vga(A) je opravdu schopen interakce s membránou a to alespoň u rodu *Staphylococcus* (Chesneau, O. et al., 2005). V membránové buněčné frakci u *Staphylococcus aureus* byl v naší laboratoři detekován také protein Msr(A) (Vimberg, V., nepublikovaná data). V případě proteinu Ole(B) ze *Streptomyces antibioticus* byl ovšem protein rovnoměrně rozdělen mezi membránovou a cytosolickou frakci (Olano, C. et al., 1995).



**Obrázek 16: Navrhované mechanismy rezistence ARE proteinů** – Antibiotikum (černý kosočtverec) vstupuje pasivně do buňky, řídicí silou je jeho vazba na ribozom (tečkovaná část) způsobující inhibici translace. Levá varianta ukazuje neznámý membránový protein využívaný ARE proteiny (černé činky) k aktivnímu transportu antibiotika. Alternativní mechanismus popisuje zamezení přístupu antibiotika k místu působení, čímž také dochází k snížení importu antibiotik do buňky (převzato a upraveno Kerr, I. D. et al., 2005).

ARE proteiny by při platnosti varianty aktivního transportu musely být schopné rozeznávat substrát. To bylo potvrzeno pro Ole(B) a Vga(A) proteiny. V případě Ole(B) dochází k interakci nejen s OM, ale také s jeho inaktivní glykosylovanou formou, která je při syntéze sekretována ven z buňky, kde teprve

dojde k jeho aktivaci odštěpením cukru. V případě Ole(B) bylo dokonce potvrzeno jeho zapojení v sekreci antibiotika (Olano, C. et al., 1995; Buche, A. et al., 1997). Vliv variabilní oblasti ARE proteinů na substrátovou specifitu byl pozorován při porovnání proteinů Vga(A) s Vga(A)<sub>LC</sub>. Tyto dva proteiny se liší sedmi aminokyselinovými záměnami, přičemž pět z nich (L212S, G219V, A220T, G226S a S247R) je umístěno v linkeru spojující obě NBD. Při porovnání rezistenčního fenotypu udíleného těmito proteiny došlo v případě Vga(A)<sub>LC</sub> ke zvýšení úrovně rezistence k linkosamidům. Vga(A) udílel vysoké hladiny rezistence pouze ke streptograminu A. Detailnějším studiem variant Vga(A) proteinů lišících se v pozicích 212, 219, 220 a 226 byly identifikovány kombinace pozic, jejichž přítomnost byla rozhodující pro rezistenční fenotyp Vga(A) proteinů (Novotna, G. 2006; Lenart, J. et al., 2015).

K stanovení akumulace příslušných antibiotik v buňkách byly použity jejich radioaktivně značené varianty. Ross a jeho kolegové využili [<sup>14</sup>C]-erytromycin pro testování proteinu Msr(A). Po prvotním zvýšení radioaktivně značeného erytromycinu uvnitř buněk *Styphylococcus aureus* RN4229 došlo k jeho následnému snížení (Ross, J. I. et al., 1990). Podobný experiment byl také proveden s Vga(A)<sub>LC</sub> u *Staphylococcus haemolyticus* s využitím [<sup>3</sup>H]-linkomycinu (Novotna, G. et al., 2006). Výsledky obou experimentů ukazovaly na snížení radioaktivity asociované s bakteriemi spojené s funkčními ARE proteiny. E. Reynolds a jeho kolegové (2003) se zmiňují o podobném, dosud nepublikovaném experimentu při konstitutivní expresi Msr(A) s využitím [<sup>3</sup>H]-pristinamycinu.

Výsledky získané z měření radioaktivně značených antibiotik lze sice interpretovat jako transport antibiotik ven z buněk. Pro tento závěr hovoří také fakt, že byla pozorována inhibice transportní funkce proteinu Msr(A) za přítomnosti dinitrofenolu a arzeničnanu (Ross, J. I. et al., 1990). Ale snížení akumulace antibiotik v buňkách je možné vysvětlit také alternativním mechanismem. Prvotní akumulace antibiotik v buňkách může být způsobena jejich vazbou k ribozomům. Po ovlivnění této vazby zprostředkované ARE proteiny by docházelo spíše k jejich průchodu přes membránu pasivní difúzí po koncentračním gradientu, než aktivním transportem. Pozorovaný výsledek by byl stejný. Můžeme poznamenat, že reserpin, velmi dobrý inhibitor ABC transportérů, je proti Msr(A) neúčinný (Reynolds E. D. et al., 2003). II. třída ABC proteinů je obecně spjata s netransportními funkcemi, mezi které patří také funkce v procesu translace. V případě eEF3 (Andersen, Ch. B. F. et al., 2006), nebo translačního faktoru EttA z *Escherichia coli* (Chen, B. et al., 2014) byla dokonce potvrzena jejich interakce s ribozomem. Tento fakt spojený s tím, že MLS antibiotika spolu s pleuromutiliny jsou chemicky rozdílné látky sdílející překrývající se vazebná místa na ribozomu, hovoří pro alternativní mechanismus funkce (Reynolds, E. D. et al., 2005). Pozorovaný vliv linkeru Vga(A)<sub>LC</sub> na substrátovou specifitu a možný mechanismus funkce ARE proteinů na ribozomu lze také interpretovat pomocí nedávno publikované struktury proteinu EttA v komplexu s ribozomem. PtIM (P-site tRNA interaction motif) subdoména u translačního faktoru EttA z *Escherichia coli* spojuje, stejně jako linker u ARE proteinů, obě NBD domény. PtIM subdoména zprostředkovává u EttA interakci s iniciátorovou tRNA navázanou v P-místě ribozomu, což je velmi blízko místa vazby linkosamidových antibiotik (Boěl, G. et al., 2014). Z dostupných výsledků je zřejmé, že nelze ani jednu z předpokládaných hypotéz o mechanismu funkce ARE proteinů potvrdit, ani vyvrátit.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Bakteriální kmeny

##### *Escherichia coli*

###### **JM109** (Promega)

Bakteriální kmen *Escherichia coli* JM109 byl použit ke klonování DNA a k namnožení plazmidů a kosmidu LK6.

**Genotyp:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15]*

###### **XL1-Blue** (Agilent Technologies)

XL1-Blue byly použity ke klonování DNA a pro namnožení plazmidů a kosmidu LK6.

**Genotyp:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

###### **ET12567/pUZ8002** (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Tento bakteriální kmen byl použit pro vnesení vektorů do *Streptomyces coelicolor* M1154 a *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466, nebo odvozených mutant pomocí konjugace. Jedná se o nemetylující kmen, který nese plazmid pUZ8002 zprostředkující přenos DNA.

**Genotyp:** *dam-13::Tn9 dcm-6 hsdS Cm<sup>r</sup>*

##### *Streptomyces lincolnensis*

###### **ATCC 25466 (DSM 40355)**

Jedná se o typový kmen produkující linkomyecin.

##### *Streptomyces coelicolor*

###### **M145**

Bakteriální kmen *Streptomyces coelicolor* M145 byl odvozen od *Streptomyces coelicolor* A3(2) odstraněním plazmidů SCP1 a SCP2. V této diplomové práci byl tento kmen využit pro srovnání vůči kmenu *Streptomyces coelicolor* M1154.

###### **M1154**

Kmen *Streptomyces coelicolor* M1154 byl odvozen z kmene *Streptomyces coelicolor* M145 delecí čtyř genových klastrů pro biosyntézu sekundárních metabolitů a zavedením bodových

mutací do genů *rpoB* a *rpsL*. Tento kmen má zhoršenou schopnost sporulace na pevném médiu v porovnání s divokým kmenem M145 a je i snižena pigmentace spor (Gomez-Escribano, J. P. et al., 2011). Kmen M1154 byl využit jako heterologní hostitel pro expresi genu *lmr(C)*.

**Genotyp:** *ΔactAred Δcpk Δcda rpoB [C1298T] rpsL[A262G]*

### *Kocuria rhizophila* CCM 552

Kmen citlivý k antibiotikům používaný jako biomarker pro testování produkce antimikrobiálních látek.

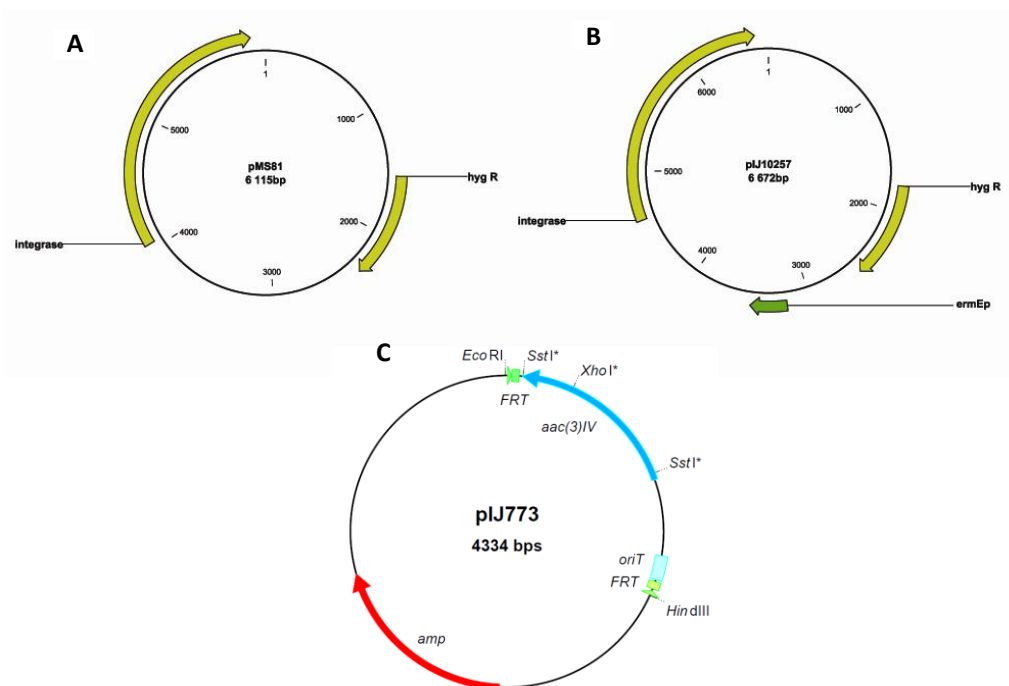
## 3.1.2. Vektory

**pMS81** (6,115 kb, získáno z University of Cambridge, Velká Británie)

V této práci byl plazmid pMS81 využit k přípravě komplementačních plazmidů. Jedná se o integrační vektor nesoucí integrasu z bakteriofága ΦBT1, *oriT* pro mezidruhovou konjugaci mezi *Escherichia coli* a rodem *Streptomyces*, a gen pro rezistenci k hygromycinu (Obr. 17A.). Je využitelný pro práci s mnoha druhy rodu *Streptomyces* (Gregory, M. A. et al., 2003).

**pIJ10257** (6,672 kb, získáno z University of Cambridge, Velká Británie)

Vektor pIJ10257 je odvozen od plazmidu pMS81 přidáním konstitutivního promotoru *ermE*\* (Hong, Hee-Jeon et al., 2005). Jde tedy o integrační vektor s integrasou z bakteriofága ΦBT1, který nese hygromycinovou rezistenci a *oriT* (Obr. 17B.). Vektor pIJ10257 byl využit ke konstitutivní expresi genu *lmr(C)* a jeho varianty s histidinovou kotvou.



**Obrázek 17: Schematické znázornění použitých vektorů.** A - pMS81; B - pIJ10257 (hygR – gen hygromycinové rezistence; ermEp – konstitutivní promotor)

### **pUZ8002** (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

V této práci byl plazmid pUZ8002 využit v buňkách *Escherichia coli* ET12567 pro přenesení vektoru pomocí mezidruhové konjugace z *Escherichia coli* do *Streptomyces lincolnensis*, nebo *Streptomyces coelicolor*. pUZ8002 je odvozen od plazmidu RP4 a nese kanamycinovou rezistenci. Postrádá však vlastní funkční *oriT* pro svůj vlastní přenos. Je ovšem schopen přenést jiné vektory obsahující svůj vlastní funkční *oriT*.

### **pIJ773 a pIJ775** (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Vektory pIJ773 (4,334 kb, Obr. 17C) i pIJ775 (4,298 kb) mají svá jména odvozeny od inaktivačních kazet (kazeta 773 a kazeta 775), které jsou jejich součástí. Inaktivační kazety slouží k deleci genů u rodu *Streptomyces* metodou PCR targeting systém. V této diplomové práci byly využity k přípravě delecí mutant u *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Oba vektory nesou krom inaktivační kazety, která v obou případech nese gen *aac(3)IV* udílející rezistenci k apramycinu, rezistenční marker *amp* udílicí rezistenci mimo jiné ke karbenicilinu.

### **LK6** (46,117 kb)

Kosmid LK6 byl připraven v naší laboratoři (Koběřská, M. et al., 2008) z vektoru Super Cos I (7,9 kbp), do kterého byl vložen celý genový klastř pro biosyntézu linkomycinu z typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 o velikosti 38 217 bp. Kosmid nese geny udílející rezistenci ke kanamycinu a karbenicilinu. Sekvence kosmidu LK6 je uložena pod číslem EU124663 v databázi GenBank.

### **3.1.3. Primery**

Syntéza oligonukleotidů byla objednána u společnosti Sigma-Aldrich. K naředění primerů byla použita buď sterilní destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O) bez DNAs, nebo TE<sup>-1</sup> pufr. Primery použité v této diplomové práci jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7: Seznam použitých primerů**

Název	Sekvence	Použití	Navrženo
LmrCForPIJ10257	GCAGAAGCTTTCACCTATCCCGAT GAGG	Amplifikace genu <i>lmr (C)</i> pro inzerci do plazmidu pIJ10257	L. Veselá
LmrCRevPIJ10257	GCGTCATATGGCTGACGCGAGTAT TG		L. Veselá
LmrCForPIJ10257 HisTag	GCAGAAGCTTTCAGTGGTGGTGGT GGTGGTGCTTATCCCGATGAGGCC	Amplifikace genu <i>lmr (C)</i> s histidinovou kotvou pro inzerci do plazmidu pIJ10257	L. Veselá
testpIJ10257FWnew	TTGAAAAACGCTCACTGGTAC	Sekvence – ověření konstruktů	L. Veselá
testpIJ10257REV	CGAGCTGAAGAAAGACAATC		G. Novotná
lmrA for	CGCGCACGGCTCCCTGGAAATCG GAGTCATCTCTCCATGATTCCGG GGATCCGTCGACC	Delece genu <i>lmr(A)</i>	M. Koběřská
lmrA rev	CCCTGCGCTGCCGCGGTCCTCA GCGCACGGCGCGGTCATGTAGGC TGGAGCTGCTTC		M. Koběřská
fA10257N	ATACATATGCACCACCACCACCA CCACCTCCATCGAAGCCGGAGC	Ověření delečních mutant v genu <i>lmbA</i>	P. Jirásková
rA10257N	AGTCTCGAGTCATCCGCAGATCG CGTAGG		P. Jirásková
chAf	ACCTTCCCGACAACACA		P. Jirásková
chAr	GGTCCAGGAAACGGTACA		P. Jirásková

### 3.1.4. Kultivační media

Není-li dále uvedeno jinak, byla všechna kultivační media připravovaná v destilované vodě, připravené v aparatuře GORO Aqua 100. Media byla sterilizována v autoklávu značky Tuttnauer při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

#### LB medium

Složení roztoku	$c_m$ [g.dm <sup>-3</sup> ]
Trypton	10
Kvasničný extrakt	5
NaCl	10

pH upraveno na 7,5

#### LB agar

Složení roztoku	$c_m$ [g.dm <sup>-3</sup> ]
Trypton	10
Kvasničný extrakt	5
NaCl	10
Agar	15

pH upraveno na 7,5

## SOC medium

Složení roztoku	Množství
Trypton	2 %
Kvasničný extrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
<i>Po sterilizaci v autoklávu</i>	
MgCl <sub>2</sub> (sterilizováno filtrací)	20 mM
Glukosa (sterilizováno filtrací)	20 mM

pH upraveno na 7,5

## AVM medium

Složení roztoku	Množství
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 mM
Kvasničný extrakt	0,2 %
NaCl	34 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,29 mM
CaCO <sub>3</sub>	50 mM
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,18 mM
MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,18 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,4 mM
<i>Po sterilizaci v autoklávu</i>	
Glukosa (sterilizováno filtrací)	3 %

pH upraveno na 7,4

## YEME produkční

Složení roztoku	c <sub>m</sub> [g.dm <sup>-3</sup> ]
Kvasničný extrakt	4
Pepton	5
Sladový extrakt	10

pH upraveno na 7,2

## 2xYT medium

Složení roztoku	c <sub>m</sub> [g.dm <sup>-3</sup> ]
Trypton	16
Kvasničný extrakt	10
NaCl	5

pH upraveno na 7,2

## MS agar

Složení roztoku	c <sub>m</sub> [g.dm <sup>-3</sup> ]
Manitol	20
Sójová mouka	20
Agar	20

pH neupravováno

K přípravě media byla použita vodovodní voda.

Medium bylo autoklávováno dvakrát.

## DNA agar

Složení roztoku	c <sub>m</sub> [g.dm <sup>-3</sup> ]
Difco Nutrient Agar	23

pH neupravováno

## MH (Müller-Hinton) agar

Složení roztoku	c <sub>m</sub> [g.dm <sup>-3</sup> ]
Müller-Hinton broth	21
Agar	15

pH neupravováno

## B1 agar

Složení roztoku	c <sub>m</sub> [g.dm <sup>-3</sup> ]
Hověží extrakt	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar	20

pH upraveno na 7,2



### Doplněné LB (medium A)

Složení roztoku	Množství
Trypton	10 g.dm <sup>-3</sup>
Kvasničný extrakt	5 g.dm <sup>-3</sup>
NaCl	10 g.dm <sup>-3</sup>
<i>Po sterilizaci v autoklávu</i>	
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glukosa	0,2 %

pH upraveno na 7,5

### 3.1.5. Pufry a roztoky

#### 1x TAE

Složení roztoku	Množství
Tris-acetát	40 mM
EDTA	1 mM

pH upraveno na 7,5

#### 1x TE<sup>-1</sup>

Složení roztoku	Množství
Tris-HCl	10 mM
EDTA	0,1 mM

#### Fyziologický roztok

Složení roztoku	Množství
NaCl	0,9 %

Sterilizace v autoklávu

#### 10x DNA vzorkový pufr

Složení roztoku	Množství
EDTA	100 mM
Glycerol	20 %
SDS	1 %
Bromfenolová modř	0,25 %

#### 1x SDS–PAGE pufr

Složení roztoku	Množství
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

#### 2x SDS–PAGE vzorkový pufr

Složení roztoku	Množství
Tris – HCl	125 mM
SDS	2 %
Merkaptoetanol	5 %
Glycerol	20 %
Bromfenolová modř	0,002 %

pH upraveno na 6,8

## Barvicí roztok - Coomassie

Složení roztoku	Množství
Metanol	50 %
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1 %
Kyselina octová	10 %

## Destain

Složení roztoku	Množství
Metanol	20 %
Kyselina octová	10 %

## Přenosový pufr

Složení roztoku	Množství
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %
Metanol	15 %

## Medium pro uchovávání kompetentních buněk

Složení roztoku	Množství
PEG ( $M_r = 8000$ )	15 mM
Glycerol	36 %
MgSO <sub>4</sub>	12 mM

Roztok byl připraven v LB mediu  
Roztok se sterilizoval filtrací

## Roztoky připravené k DNA Lego kitu pro izolaci plazmidové DNA

**Suspenzní roztok** – 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A

**Lyzační roztok** – 0,2 M NaOH, 1% SDS

**Neutralizační roztok** – 3 M octan draselný

**Eluční roztok** – 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA

## Roztoky pro přípravu vzorků pro SDS-PAGE

**Roztok I** – 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8,0)

**Roztok II** – 50 mM Tris-HCl, 1x inhibitor proteas (pH 8,0)

## Jednoduché roztoky

**5% SDS** - 5g SDS/100 ml d H<sub>2</sub>O

**2M NaOH** – 8g NaOH/100 ml dH<sub>2</sub>O

## Antibiotika

Zásobní roztoky antibiotik byly připraveny 1000x koncentrované a sterilizované pomocí filtrace (Tab. 8). Využívaly se k selekci bakteriálních kmenů.

**Tabulka 8: Seznam využívaných antibiotik**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Pracovní koncentrace [mg/ml]</b>	<b>Rozpustnost</b>	<b>Firma</b>
Apramycin	50	dH <sub>2</sub> O	Duchefa Biochemie bv
Hygromycin	40	dH <sub>2</sub> O	Invitrogen™
Chloramfenikol	25	Etanol	Duchefa Biochemie bv
Kanamycin	50	dH <sub>2</sub> O	Duchefa Biochemie bv
Karbenicilin	100	dH <sub>2</sub> O	Duchefa Biochemie bv
Nalidixová kyselina	25	0,3 M NaOH	Duchefa Biochemie bv
Tetracyklin	10	dH <sub>2</sub> O	-

Pro zjištění minimálních inhibičních koncentrací (MIC) testovaných bakteriálních kmenů byly připraveny zásobní roztoky erytromycinu a klindamycinu o koncentraci 10 mg/ml a linkomycinu o koncentraci 500 mg/ml.

### 3.1.6. Enzymy

Většina enzymů, není-li dále uvedeno jinak, byla objednána u firmy New England BioLabs (NEB).

#### Restrikční endonukleasy

AgeI  
ApaI  
BamHI - HF  
BglII  
EcoRI  
EcoRV - HF  
HindIII - HF  
NdeI  
PstI  
XbaI

#### DNA polymerasy

LA DNA Polymerasa Mix (Top-Bio)  
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase  
Taq-Purple DNA polymerasa (Top-Bio)

#### Ostatní

Alkalická fosfatasa (CIP)  
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment  
Ribonukleasa A (Carl Roth)  
T4 DNA ligasa

Lysozym (Sigma-Aldrich)

### 3.1.7. Protilátky

#### Primární protilátka

**His·Tag<sup>®</sup> Monoclonal Antibody** (Novagen<sup>®</sup>) – Myší monoklonální protilátka (IgG1) specifická pro His·Tag sekvenci

#### Sekundární protilátka

**Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse (H+L)** (Thermo Scientific) – Kozí polyklonální protilátka proti myšimu IgG konjugována s křenovou peroxidasou

### 3.1.8. Komerční soupravy a standardy

#### Izolace plazmidové DNA

DNA Lego kit (Top-Bio)

Fast-n-Easy Plasmid Mini-prep Kit (Jena Bioscience)

NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel)

Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

#### Izolace genomové DNA

Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega)

#### Izolace DNA z gelu

Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience)

### Standard molekulové hmotnosti pro DNA elektroforézu

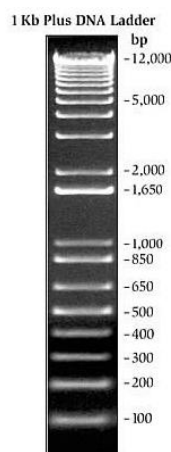
**1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)** - Standart obsahuje fragmenty od 100 bp do 12 000 bp (Obr. 18). Při nanesení 5 µl standardu obsahuje fragment 1 650 bp 40 ng DNA. Tato informace může být využita pro přibližné určení koncentrace DNA ve vzorku.

#### Příprava:

100 µl 1 kb Plus DNA ladder

100 µl 10x DNA vzorkový pufr

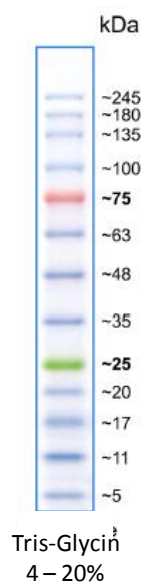
800 µl TE<sup>-1</sup> pufr



Obrázek 18: 1Kb Plus DNA ladder  
(převzato a upraveno z [www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10787018](http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10787018))

## Standard molekulové hmotnosti pro SDS-PAGE elektroforézu

**BlueElf Prestained Protein Marker (Jena Bioscience)** – Proteinový marker obsahuje 13 purifikovaných proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 5 – 245 kDa (Obr. 19). V praxi byl marker nanášen do jamky polyakrylamidového gelu v objemu 5  $\mu$ l, dle doporučení výrobce.



Obrázek 19: BlueElf Prestained Protein Marker  
(převzato z [www.jenabioscience.com/images/PDF/PS-105.pdf](http://www.jenabioscience.com/images/PDF/PS-105.pdf))

### 3.1.9. Software a internetové aplikace

**CLC Main Workbench 6.8.1.** – software pro práci se sekvencemi

**GenBank** – databáze sekvencí (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

### 3.1.10. Použité chemikálie

Chemikálie	Zkratka	Výrobce
30 % Akrylamid	-	Merck KGaA
Adenosin trifosfát	ATP	Fermentas
Agaróza (elektroforéza)	-	Lonza
Albumin hovězího séra	BSA	NEB
Apramycin	-	Duchefa Biochemie bv
Bakteriologický agar	-	Oxoid
Blotting-Grade Blocker	-	Bio-Rad
Bromfenolová modř	-	Bio-Rad
Deoxyadenosin trifosfát	dATP	NEB
Deoxycytidin trifosfát	DTP	NEB

Deoxyguanosin trifosfát	DTP	NEB
Deoxythymidin trifosfát	dTTP	NEB
Difco™ Nutrient Agar	DNA	BD
Dimethylsulfoxid	DMSO	NEB; Top-Bio
Dodecylsírán sodný	SDS	Sigma-Aldrich
Erytromycin	ERY	Duchefa Biochemie bv
Ethidium bromid	EtBr	Sigma-Aldrich
Etylendiamintetraoctová kyselina	EDTA	Sigma-Aldrich
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	-	Biotium
Glukosa	Glu	Lach-Ner
Glycerol	-	Lach-Ner
Glycin	-	Lachema
GreenSafe Premium	-	NZYTEch
Heptahydrát síranu hořečnatého	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	AppliChem
Heptahydrát síranu manganatého	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Merck
Heptahydrát síranu železnatého	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Lach-Ner
Hovězí extrakt	-	BD
Hydrogenfosforečnan draselný	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner
Hygromycin	-	Invitrogen™
Chloramfenikol	-	Duchefa Biochemie bv
Chlorid draselný	KCl	Lachema
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Isopropanol	-	Lachema
Kanamycin	-	Duchefa Biochemie bv
Karbenicilin	-	Duchefa Biochemie bv
Klindamycin	CLI	Duchefa Biochemie bv
Kvasničný extrakt	-	Oxoid
Kyselina ethylendiamintetraoctová	EDTA	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková	HCl	Lach-Ner
Kyselina octová	CH <sub>3</sub> COOH	Lach-Ner
Linkomycin	LIN	Sigma-Aldrich
Manitol	-	AppliChem
Merkaptoetanol	-	Serva
Metanol	MetOH	Lachema
Müller-Hinton broth	-	Oxoid
N, N, N', N' - tetrametyletylendiamin	TEMED	AppliChem
Nalidixová kyselina	-	Duchefa Biochemie bv
Nonidet P-40 oktylfenoxypolyethoxyethanol	NONIDET	Amresco

Octan draselný	CH <sub>3</sub> COOK	Lach-Ner
Pepton	-	BD
Peroxodisíran amonný	APS	ICN Biomedicals
Phosphate buffered saline	PBS	Oxoid
Polyethylen glykol (M <sub>r</sub> = 8000)	PEG	Sigma-Aldrich
Protease inhibitor cocktail tablets	-	Roche
Sacharosa	-	Lach-Ner
Síran amonný	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Síran hořečnatý	MgSO <sub>4</sub>	Lachema
Sladový extrakt	-	Oxoid
Sójová mouka	-	Paleta
Tris(hydroxymetyl)aminomethan	Tris	Fluka analytical
Trypton	-	BD
Uhličitan vápenatý	CaCO <sub>3</sub>	AppliChem

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Kultivace a následné uchovávání bakterií

#### 3.2.1.1. Kultivace *Escherichia coli*

Kultivace *Escherichia coli* probíhala přes noc (16 – 18 hodin) při teplotě 37 °C, a to buď na pevné půdě (LB agar), nebo v tekutém mediu (LB medium, SOC). Tekuté medium bylo třepáno při 200 RPM (otáčky za minutu). Pro selekci buněk nesoucích vektor bylo využíváno příslušné antibiotikum. Petriho misky s narostlými koloniemi byly pro krátkodobé uschování obaleny parafilmem a uchovávány při teplotě 4 °C. Buňky napěstované v tekutém mediu a určené k dlouhodobému uschování byly uchovávány při teplotě – 80 °C v 20% glycerolu s LB mediem.

#### 3.2.1.2. Kultivace rodu *Streptomyces*

Kultivace *Streptomyces lincolnensis* a *Streptomyces coelicolor* probíhala na pevné půdě (MS agar, DNA agar) nebo v tekutém mediu (YEME, YEME produkční, AVM) při teplotě 28 - 30 °C. Doba kultivace byla ovlivněna typem použitého media. Pro DNA agar se jednalo přibližně o 1 až 4 dny. U MS agaru byla doba kultivace delší. A to v rozmezí 4 až 7 dnů, než došlo ke sporulaci. Při kultivaci v tekutém mediu byly pro zabránění tvorby shluků mycelia použity prolamované Erlenmayerovy baňky. Medium bylo třepáno při 220 RPM po dobu 24 – 48 hodin. Pro selekci buněk nesoucích vektor bylo využíváno příslušné antibiotikum. Pro krátkodobé uschování buněk na pevném mediu byly Petriho misky obalené parafinem a uchovávány při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobé uchovávání byla využívána sporová suspenze v 20% glycerolu uchovávaná při teplotě - 80 °C.

#### 3.2.1.3. Kultivace *Kocuria rhizophila*

Buňky *Kocuria rhizophila* byly kultivovány na B1 agaru při 37 °C přes noc (16 – 18 hodin). Způsob uchovávání je stejný, jako v případě *Escherichia coli*.

#### 3.2.1.4. Kultivace *Streptomyces lincolnensis* pro sledování produkce linkomycinu pomocí UHPLC

Sporami z MS agaru bylo zaočkováno 50 ml YEME produkčního media. Inokulum bylo kultivováno při teplotě 28 °C v prolamovaných Erlenmayerových baňkách při 220 RPM. Po 30ti hodinách bylo 1,25 ml inokula přeočkováno do 25 ml AVM media a dále kultivováno při 28 °C po dobu 5 dnů. Následně byla narostlá kultura zcentrifugována (4 000 g, 10 minut, 4 °C), čímž došlo k oddělení peletu od supernatantu (fermentačního media). Poté byla provedena analýza fermentačního media Mgr. Zdeňkem Kameníkem, Ph.D. pomocí UHPLC (ultra high-performance liquid chromatography) v MBÚ AV ČR, v. v. i.



### 3.2.1.5. Příprava spor rodu *Streptomyces*

Spory byly setřeny z vysporulované kultury narostlé na MS agaru po 4 – 7 dnech a resuspendovány v sterilní destilované vodě. Poté byla směs přefiltrována přes sterilní vatový filtr k odstranění případných nečistot, jako jsou části agarové půdy a vzdušné mycelium. K oddělení spor byla použita centrifugace (1 500 g, 15 minut, 4 °C). Pelet byl následně resuspendován v 20% glycerolu a spory byly rozděleny do alikvót po 50 µl do sterilních plastových mikrozkušavek typu Eppendorf o objemu 1,5 ml. Zásobní alikvoty se uchovávají při teplotě – 80 °C a jsou vhodné pro dlouhodobé uchovávání kmenů *Streptomyces*.

### 3.2.2. Transformace

Pro vnesení cizorodé DNA metodou transformace se musí akceptorové buňky nacházet ve stavu tzv. kompetence. U bakterií *Escherichia coli* můžeme k navození kompetence uměle přispět přidáním  $Mg^{2+}$  iontů do kultivačního media. Zvýšení účinnosti transformace pomáhá také přidavek glukózy do media.

#### 3.2.2.1. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro transformaci tepelným šokem

Oba kmeny *Escherichia coli* (JM109 a XL1-Blue), využívané v této diplomové práci pro transformaci tepelným šokem, byly připraveny stejným způsobem.

1. 10 µl zásobní buněčné suspenze bylo zaočkováno do 5 ml LB media a při 37 °C kultivováno přes noc (16 – 18 hodin) při 200 RPM. Pro přípravu kmene *Escherichia coli* XL1-Blue byl přidán tetracyklin o konečné koncentraci 10 µg/ml.
2. 100 ml doplněného LB media (media A) bylo vytemperováno na 37 °C a následně zaočkováno 1 ml inokula narostlého přes noc. V případě kmene XL1-Blue byl přidán tetracyklin.
3. Buněčná suspenze byla kultivována při teplotě 37 °C a 200 RPM do dosažení  $OD_{600nm}$  (optické denzity) v rozmezí 0,4 – 0,6.
4. Kultura byla po dosažení příslušné  $OD_{600}$  ihned zchlazena v ledové lázni po dobu 10 minut a od této doby byla držena v chladu.
5. Buněčná suspenze byla přenesena do vychlazených 50ml falkonek a centrifugována (1 500 g, 15 minut, 4 °C).
6. Pelet byl opatrně resuspendován v 1 ml media A, ke kterému bylo následně přidáno 5 ml předchlazeného média pro uchovávání kompetentních buněk.

7. Takto připravené buňky byly na ledu rozděleny do alikvót po 100  $\mu$ l do vychlazených sterilních plastových mikrozkuvek typu Eppendorf o objemu 1,5 ml a buď okamžitě použity k transformaci, nebo uschovány při teplotě - 80 °C.

Při přípravě kompetentních buněk za pokojové teploty (RT) dochází k snížení účinnosti transformace (Nishimura, A. et al., 1990).

### 3.2.2.2. Transformace tepelným šokem

1. K zamražené alikvótě kompetentních buněk, nebo k čerstvě připraveným kompetentním buňkám bylo přidáno minimálně 100 ng plazmidové DNA, nebo ligační směs (1 – 15  $\mu$ l).
2. Kompetentní buňky byly poklepem na mikrozkuvku promíchány s přidanou DNA.
3. Buněčná suspenze byla inkubována 25 minut na ledu, aby došlo k adhezi vnášené DNA na povrch buněk.
4. Buňky byly po inkubaci vystaveny na 1 minutu teplotě 42 °C.
5. Následně byla suspenze okamžitě zchlazena na ledu po dobu 2 minut.
6. K buňkám bylo přidáno 800  $\mu$ l SOC media a byly kultivovány (37 °C, 200 RPM) po dobu 75 minut. V tomto časovém intervalu dochází k expresi plazmidem kódované rezistence.
7. Kultura byla vyseta na LB agar s přidavkem příslušného antibiotika, pro selekci transformantů.
8. Petriho misky byly inkubovány přes noc v 37 °C.

### 3.2.2.3. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro elektroporaci

Oba kmeny *Escherichia coli* (XL1-Blue a ET12567/pUZ8002), využívané v této diplomové práci pro transformaci elektroporací, byly připraveny stejným způsobem.

1. Do SOC media s příslušnými antibiotiky bylo zaočkováno inokulum narostlé přes noc ve 37 °C při 200 RPM. Přidaná antibiotika byla ve výsledných koncentracích 10  $\mu$ g/ml tetracyklinu pro kmen XL1-Blue a 25  $\mu$ g/ml kanamycinu a chloramfenikolu pro ET12567/pUZ8002.
2. Kultura byla kultivována v třepačce (37 °C, 200 RPM) do  $OD_{600} \approx 0,4$ .
3. Kultura byla ihned zchlazena v ledové lázni na dobu 10 minut. Dále se s buňkami pracovalo v chladu.
4. Buňky byly centrifugovány (1 500 g, 10 minut, 4 °C) a supernatant byl odstraněn.
5. Pro snížení iontové síly byl získaný pelet buněk dvakrát promyt 20 ml studeného 10% glycerolu.

6. Následně byly buňky resuspendovány v 1 ml 10% glycerolu a v ledové lázni rozděleny po 25 µl do alikvót do vychlazených sterilních plastových mikrozkušavek typu Eppendorf o objemu 1,5 ml a buď okamžitě použity k transformaci, nebo uschovány při teplotě - 80 °C.

#### 3.2.2.4. Transformace elektroporací

Transformace elektroporací je založena na vzniku přechodných pórů v membráně, přes které dochází k oboustranné výměně materiálu. Tato metoda je vhodná pro mnoho druhů organismů a je obvykle účinnější než transformace tepelným šokem. Nicméně je potřeba optimalizace faktorů ovlivňující její účinnost. Je také vhodnější pro vnesení velkých molekul DNA, jako jsou např. kosmidy. V tomto případě je dobré účinnost transformace ještě zvýšit použitím čerstvě připravených kompetentních buněk.

1. K alikvótě kompetentních buněk bylo přidáno minimálně 100 ng DNA v maximálním objemu 2 µl a poklepem na mikrozkušavku byla suspenze opatrně promíchána.
2. Směs byla inkubována na ledu po dobu 20 minut, aby došlo k adhezi DNA k povrchu buněk.
3. Transformační směs byla následně přesunuta do vychlazených elektroporačních kyvet a poklepem odstraněny případné vzduchové bubliny.
4. V závislosti na použité kyvetě (0,1 cm, nebo 0,2 cm) byly dle manuálu zvoleny podmínky transformace (18 kV/cm, nebo 12,5 kV/cm).
5. Okamžitě po elektrickém pulzu byl k buněčné suspenzi přidán 1ml vychlazeného LB media. Pokud by došlo k prodlevě, mělo by to za následek snížení účinnosti transformace.
6. Pro expresi rezistentního fenotypu bylo inokulum kultivováno po dobu 75 minut (37 °C, 200 RPM).
7. Buňky byly následně vysety na LB agar doplněný o antibiotika pro příslušnou selekci transformantů a kultivovány v 37 °C do dalšího dne.

#### 3.2.3. Mezidruhová konjugace

Mezidruhová konjugace je vhodnou metodou pro přenos cizorodé DNA do rodu *Streptomyces*, která je účinnější než transformace protoplastů. Z důvodu obejití případných restričních systémů akceptorového kmene, které by snižovaly účinnost přenosu restrikcí vnášené, metylované DNA, se ke konjugaci využívá nemetylující bakteriální kmen *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 (Flett, F. et al., 1997).

1. Do čerstvě připravených elektrokompetentních buněk *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 byl pomocí elektroporace vnesen plazmid, či kosmid, který byl určen pro přenos do rodu *Streptomyces*.
2. Buňky byly po transformaci vysety na Petriho misky s LB agarem doplněným o antibiotika, pro které nesou vektory rezistenční geny, a kultivovány přes noc (16 – 18 hodin) v 37 °C.

3. Do 10 ml LB media obohaceného o glukosu v konečném množství 0,1 % byla zaočkována kolonie narostlá po transformaci. Kultura se nechala růst přes noc v 37 °C při 200 RPM. Kvůli časté ztrátě rezistence u *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 bylo pracováno nejčastěji v 5 paralelách a do media byla přidána příslušná antibiotika pro udržení požadovaného genotypu (25 µg/ml chloramfenikolu (*dam* mutace), 25 µg/ml kanamycinu (selekce plazmidu pUZ8002) a příslušná antibiotika pro udržení přenášeného vektoru).
4. Do vytemperovaného LB media s přidavkem glukosy a antibiotik (viz. bod 3) bylo zaočkováno 100 µl přes noc narostlého inokula.
5. Buněčná suspenze byla kultivována při 37 °C a 200 RPM do dosažení  $OD_{600} \approx 0,4$ . Doba růstu se pohybovala zhruba mezi 4 až 8 hodinami.
6. Buněčná suspenze byla po dosažení požadované OD zcentrifugována (1 500 g, 15 minut, 4 °C) a pelet se opětovně resuspendoval v 10 ml nového LB media.
7. Promytí buněk se opakovalo ještě jednou za stejných podmínek. Důvodem promytí narostlé kultury *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 bylo odstranění antibiotik, které by mohly inhibovat růst akceptorového kmene. Na závěr byl pelet resuspendován v 1 ml LB media.
8. Během promývání kultury *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 bylo 10 µl spor akceptorového kmene *Streptomyces* přidáno do sterilní plastové mikrozkušavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml obsahující 500 µl 2x YT media. Pro indukci klíčení spor byla suspenze inkubována při 50 °C po dobu 10 minut.
9. Po zchlazení suspenze spor bylo do mikrozkušavky přidáno 500 µl promyté kultury *Escherichia coli* a směs byla okamžitě centrifugována (13 000 g, 1 minuta, RT).
10. Pelet tvořený spory a buňkami *Escherichia coli* byl resuspendován ve zbylém mediu, které zůstalo po odstranění supernatantu.
11. Buněčná kultura byla rozočkována na MS agar s přidavkem 10 mM  $MgCl_2$  a byla inkubována při 30 °C po dobu 16 – 20 hodin.
12. Miska s MS agarem byla následně přelita 1 ml roztoku destilované vody s přidanou kyselinou nalidixovou o výsledné koncentraci 25 µg/ml (inhibice růstu *Escherichia coli*) a antibiotikem pro selekci přenášeného vektoru. Miska byla poté dále kultivována při 30 °C.
13. Po 5 dnech byly pro potvrzení transkonjugant narostlé kolonie přeočkovány na čerstvý MS agar obsahující příslušná selekční antibiotika.

### 3.2.4. Metody práce s DNA

#### 3.2.4.1. DNA elektroforéza v agarosovém gelu

Elektroforéza nukleových kyselin je jednou ze základních metod molekulární biologie. Je založena na migraci nabitých molekul v elektrickém poli, čímž dochází k separaci fragmentů DNA v závislosti na jejich velikosti. Rychlost a přesnost separace ovlivňuje koncentrace agarosy v použitém gelu, tvar a molární hmotnosti fragmentů DNA, použitý pufr a zvolené napětí. Pro zviditelnění molekul DNA pod

ultrafialovým (UV) světlem se používají různé detekční látky. V průběhu mé práce, jsem postupně používala ethidium bromid (EtBr), GelRed™ a GreenSafe Premium. DNA elektroforéza se také může využívat k izolaci námi žádaného fragmentu.

V závislosti na velikosti zkoumaných fragmentů DNA byly používány 0,8 – 1% agarosové gely v 1x TAE pufru. Z důvodu rozpuštění agarosy v pufru bylo nutné připravenou směs zahřát a pro zviditelnění DNA přidat detekční látku. Využívané ředění detekčních látek bylo 1:500 000 pro EtBr a GreenSafe Premium a 1:10 000 pro GelRed™. Analyzované vzorky byly před nanesením na gel smíchány s 10x DNA vzorkovým pufrům. Jako standart byl použit 1Kb Plus DNA ladder v nanášeném množství 5 µl. Vzorky byly děleny v aparatuře při stálém napětí 3 – 5 V/cm.

### 3.2.4.2. Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu

Pro extrakci a následnou purifikaci fragmentu DNA určité velikosti z agarosového gelu byl nejčastěji použit komerčně dostupný Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Při přípravě komplementačního plazmidu nesoucího gen *lmr(A)* jsem používala místo výše zmíněného produktu Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience). Oba produkty jsou založeny na navázání molekul DNA na kolonku s membránou z křemičitého skla při vysoké iontové síle. Po následném odstranění nečistot dojde k uvolnění DNA do roztoku o nižší iontové síle, v našem případě šlo o sterilní destilovanou vodu. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System byl také využit k čištění PCR produktů.

Po elektroforetickém rozdělení DNA vzorku byl z gelu pod UV světlem vyříznut fragment obsahující DNA požadované délky. Pro extrakci DNA bylo dále postupováno dle manuálu od výrobce.

### 3.2.4.3. Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byly využívány čtyři komerční soupravy: DNA Lego kit (Top-Bio), Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), Fast-n-Easy Plasmid Mini-prep Kit (Jena-Bioscience) a NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel), jejichž použití je shrnuto v tabulce 9.

**Tabulka 9: Seznam využívaných komerčních souprav pro izolaci plazmidové DNA**

Komerční souprava	Výrobce	Použití
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega	Ověření získaných konstruktů, další práce s izolovanými plazmidy a vzorky určené k uschování
DNA Lego kit	Top-Bio	Ověření získaných konstruktů
Fast-n-Easy Plasmid Mini-prep Kit	Jena-Bioscience	Příprava komplementačního plazmidu nesoucího gen <i>lmr(A)</i>
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel	Izolace plazmidové a kosmidové DNA s požadavkem na vyšší koncentraci a vzorky určené k uschování

NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi/Maxi byl krom izolace plazmidové DNA využíván také k izolaci větších konstruktů, jakými jsou např. kosmidy. Metoda je založena na vazbě DNA ke kuličkám z křemičitého skla obsahujících kladně nabitý iont. Po promytí je DNA uvolněna do elučního pufru s vysokým obsahem solí při posunu pH z kyselého do mírně zásaditého. DNA je ještě odsolena pomocí alkoholového srážení. Výchozí objem kultury používaný při izolaci vektoru touto soupravou je větší (100 ml), než v případě zbylých komerčních produktů pro izolaci plazmidů používaných v této diplomové práci (5 ml). Buňky z narostlé kultury určené k izolaci DNA libovolným kitem byly získány pomocí centrifugace (5 000 g, 20 minut, 4 °C). Dále bylo postupováno dle protokolu příslušného výrobce.

### 3.2.4.4. Izolace genomové DNA

Izolace genomové DNA z 5 ml narostlé kultury *Streptomyces lincolnensis* byla provedena komerčně dostupným kitem Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega). Pro získání peletu buněk byla kultura centrifugována (13 000 g, 1 minuta, RT) a supernatant byl odstraněn. Vlastní izolace je založena na čtyřkrokovém procesu purifikace DNA. Nejprve dojde k lyzi buněk spojené s druhým krokem v podobě štěpení RNA pomocí RNasy. Při lytickém kroku se v případě *Streptomyces lincolnensis* přidává 120 µl lysozymu o koncentraci 10 mg/ml. Následně dojde k srážení proteinů pomocí vysolování, při kterém zůstává genomová DNA v roztoku. Posledním krokem izolace je zahuštění DNA díky alkoholovému srážení.

V této diplomové práci sloužila vyizolovaná genomová DNA jako templát pro ověřování delečních mutant *Streptomyces lincolnensis* pomocí PCR.

### 3.2.4.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jedná se o jednu ze základních metod molekulární biologie sloužící k *in vitro* amplifikaci požadovaného úseku DNA vymezeného použitými oligonukleotidy (primery).

#### **Amplifikace genu *lmr(C)***

Pro amplifikaci genu *lmr(C)* byla využita polymerasa Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). Důvodem zvolení tohoto enzymu je jeho nízká chybovost. Má 5' → 3' polymerasovou a 3' → 5' exonukleasovou aktivitu a generuje produkty s tupými konci. Kvůli vysokému podílu GC páru v templátové DNA byl využíván komerčně připravený pufr se složením přizpůsobeným pro tento typ templátů. Reakční směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce 10, byla připravena o celkovém objemu 50 µl. Podmínky reakce jsou uvedeny v tabulce 11. Přítomnost PCR produktu byla analyzována pomocí DNA elektroforézy.

**Tabulka 10: Složení reakční směsi**

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
5x GC pufr	10 µl
Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP	1 µl
100% DMSO	1,5 µl
Templátová DNA (740 ng/µl)	0,5 µl
100 µM Primery	á 0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	35 µl

**Tabulka 11: Podmínky PCR reakce**

Teplota	Čas	Fáze	Počet cyklů
98 °C	5 minut	Úvodní denaturace	1
98 °C	45 sekund	Denaturace	35
55 °C	45 sekund	Nasedání primerů	
72 °C	1 minuta	Extenze	
72 °C	10 minut	Finální extenze	1
4 °C	∞	Chlazení	

**Ověřovací PCR**

Tato PCR reakce byla využita k ověření přítomnosti genu *lmbA* u deleční mutanty v genu *lmr(A)*. K amplifikaci byla použita Taq-Purple DNA polymerasa (Top-Bio). Reakční směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce 12, byla připravena o celkovém objemu 50 µl. Průběh PCR je uveden v tabulce 13. Na kontrolní DNA elektroforézu bylo nanášeno 15 – 20 µl reakční směsi.

**Tabulka 12: Složení reakční směsi**

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x reakční pufr	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
Taq-Purple DNA polymerasa (1 U/µl)	2,5 µl
100% DMSO	2,5 µl
Templát	2,5 µl
100 µM Primery	á 0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	35,5 µl

**Tabulka 13: Podmínky PCR reakce**

Teplota	Čas	Fáze	Počet cyklů
94 °C	5 minut	Úvodní denaturace	1
94 °C	1 minuta	Denaturace	
55 °C	45 sekund	Nasedání primerů	35
72 °C	2,5 minuty	Extenze	
72 °C	10 minut	Finální extenze	1
4 °C	∞	Chlazení	

### Koloniová PCR

Koloniová PCR byla v této diplomové práci využívána k ověření genetických změn v delečních mutantách. Mechanismus reakce je stejný jako v jiné PCR reakci, jen se místo vyizolované DNA přidává nakultivovaný testovaný kmen. Pro úspěšnost reakce tedy musí dojít k zpřístupnění genomové DNA pro DNA polymerasu. Proto se do reakce přidává detergent (NONIDET) a dochází k delší úvodní denuraci. Při práci jsem využívala LA DNA Polymerasa Mix (5 U/μl; Top-Bio), nebo Taq-Purple DNA polymerasa (1 U/μl; Top-Bio).

Testované kmeny se nechaly přes noc růst na DNA agaru, ze kterého byly pomocí sterilního dřevěného párátko přeneseny do reakční směsi o celkovém objemu 50 μl. Složení reakce je uvedeno v tabulce 14. Jako kontroly byly využívány reakce s izolovanou DNA (kosmid LK6 obsahující testovanou delecí a jeho originál). Při přenášeni testovaného kmene se muselo dbát na to, aby kousky agaru nekontaminovaly reakci, neboť by ji mohly inhibovat. Průběh PCR je uveden v tabulce 15. Na kontrolní DNA elektroforézu bylo nanášeno 10 – 15 μl reakční směsi.

**Tabulka 14: Složení reakční směsi**

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x reakční pufr	5 μl
DNA polymerasa	1 μl
10 mM dNTP	1 μl
100% DMSO	2,5 μl
NONIDET	0,5 μl
100 μM Primery	á 0,5 μl
dH <sub>2</sub> O	39 μl



**Tabulka 15: Podmínky PCR reakce**

Teplota	Čas	Fáze	Počet cyklů
98 °C	10 minut	Úvodní denaturace	1
65 °C	Pauza	Přidání DNA polymerasy	
94 °C	45 sekund	Denaturace	35
55 °C	45 sekund	Nasedání primerů	
72 °C	90 sekund	Extenze	
72 °C	10 minut	Finální extenze	
4 °C	∞	Chlazení	1

### 3.2.4.6. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas

Restrikční endonukleasy štěpí dvouřetězcovou DNA (dsDNA) v závislosti na rozpoznávací sekvenci, kterou je většinou palindrom. Při štěpení bylo postupováno dle doporučení výrobce příslušných enzymů. Štěpení DNA bylo využito buď ke klonování genů, nebo k otestování získaných konstruktů. Reakce probíhala při teplotě doporučené pro daný enzym, a pokud použitá restrikční endonukleasa šla tepelně inaktivovat, byl enzym inaktivován. Použité teploty a doba inkubace jsou uvedeny v tabulce 16. Úplnost štěpení bylo ověřeno DNA elektroforézou a v případě nutnosti byla reakční doba prodloužena. Obecné složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 17. V případě štěpení dvěma enzymy v jedné reakci byl zvolen takový reakční pufr, ve kterém měly oba proteiny nejvyšší aktivitu. Celkový objem reakce byl upravován v závislosti na účelu reakce. V případě ověření připravených konstruktů byl používán nižší objem 50  $\mu$ l. Pro reakce určené k následné izolaci určitého fragmentu byly zvoleny objemy vyšší kolem 150  $\mu$ l.

**Tabulka 16: Teploty a doby inkubace pro jednotlivé enzymy**

Restrikční endonukleasa	Štěpení		Inaktivace	
	Teplota	Čas [hodiny]	Teplota	Čas [minuty]
AgeI	37 °C	8	65 °C	20
ApaI	25 °C	18	65 °C	20
BamHI – HF	37 °C	4	X	X
BglII	37 °C	3	X	X
EcoRI	37 °C	4	65 °C	20
EcoRV – HF	37 °C	5	80 °C	20
HindIII – HF	37 °C	3	80 °C	20
NdeI	37 °C	3	65 °C	20
PstI	37 °C	8	80 °C	20
XbaI	37 °C	8	65 °C	20

**Tabulka 17: Obecné složení restrikční směsi**

Složení reakční směsi	Množství na 1 reakci
10x pufr	1/10 celkového objemu
BSA	1/100 celkového objemu vyžadoval-li enzym
Restrikční endonukleasa	2,5 U/1 µg DNA
DNA	Dle účelu
dH <sub>2</sub> O	Na doplnění celkového objemu

### 3.2.4.7. Defosforylace molekul DNA

Pro defosforylaci tupých konců linearizovaného vektoru byla použita alkalická fosfatasa (CIP) od firmy NEB. Díky této defosforylaci byl snížen počet zpětných spojení konců vektoru bez vloženého inzertu. Fosfatasa byla přidána k restrikční směsi po inaktivaci příslušné restriktasy o objemu 1 µl (10 U). Směs se nechala inkubovat při 37 °C po dobu 1 hodiny. Protože tento enzym nelze inaktivovat pomocí teploty, byl linearizovaný vektor ihned přečištěn přes DNA elektroforézu a následnou izolaci DNA z agarosového gelu.

### 3.2.4.8. Příprava fragmentů DNA s tupými konci pomocí Klenowa fragmentu

Úprava konců DNA molekul byla zapotřebí během přípravy komplementačních plazmidů, neboť vložení do vektoru probíhalo přes tupé konce. Po restrikci enzymy BglII a ApaI vznikly 5' a 3' přesahující konce, v daném pořadí. Pro úpravu konců byl využit DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (NEB), který je odvozen od DNA polymerasy I z *Escherichia coli* pomocí proteolytického štěpení. Enzym disponuje polymerasovou a 3' → 5' exonukleasovou aktivitou, ale ztratil 5' → 3' exonukleasovou aktivitu (Jacobsen, H. et al., 1974). Slouží tedy k doplnění 5' a odstranění 3' přesahujících konců. Složení reakční směsi o celkovém objemu 60 µl je uvedeno v tabulce 18. Reakce probíhala po dobu 15 minut při 25 °C a byla následně přerušena pomocí zahřátí reakční směsi na 75 °C po dobu 20 minut a přidáním EDTA na finální koncentraci 10 mM. Pro odstranění EDTA, která by zamezila ligaci, a k přečištění DNA byl použit komerčně dostupný kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

**Tabulka 18: Složení reakční směsi**

Složení reakční směsi	Množství na jednu reakci
10x NEB 2 pufr	6 µl
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (5 U/µl)	1 µl
DNA (cca 13 ng/µl)	45 µl
1 mM dNTP	2 µl
dH <sub>2</sub> O	6 µl

### 3.2.4.9. Ligace DNA

Ligace byla používána k spojení fragmentů DNA s linearizovaným vektorem přes vytvoření fosfodiesterové vazby enzymem T4 DNA ligasou od firmy NEB. Molární poměr inzertu k vektoru byl 3:1 s tím, že do reakce bylo vždy přidáváno 100 ng vektoru. Jako negativní kontrola byla používána reakce, ve které byl inzert nahrazen adekvátním množstvím destilované vody (dH<sub>2</sub>O). Složení reakční směsi o celkovém objemu 20 μl je uvedeno v tabulce 19. Reakce probíhala při 16 °C po dobu 16 hodin, následně došlo k inaktivaci ligasy při 65 °C po dobu 10 minut. Poté byla ligační směs buď uschována při teplotě -20 °C, nebo okamžitě transformována pomocí tepelného šoku buď do buněk *Escherichia coli* JM109, nebo XL-1 Blue.

Tabulka 19: Složení ligační směsi

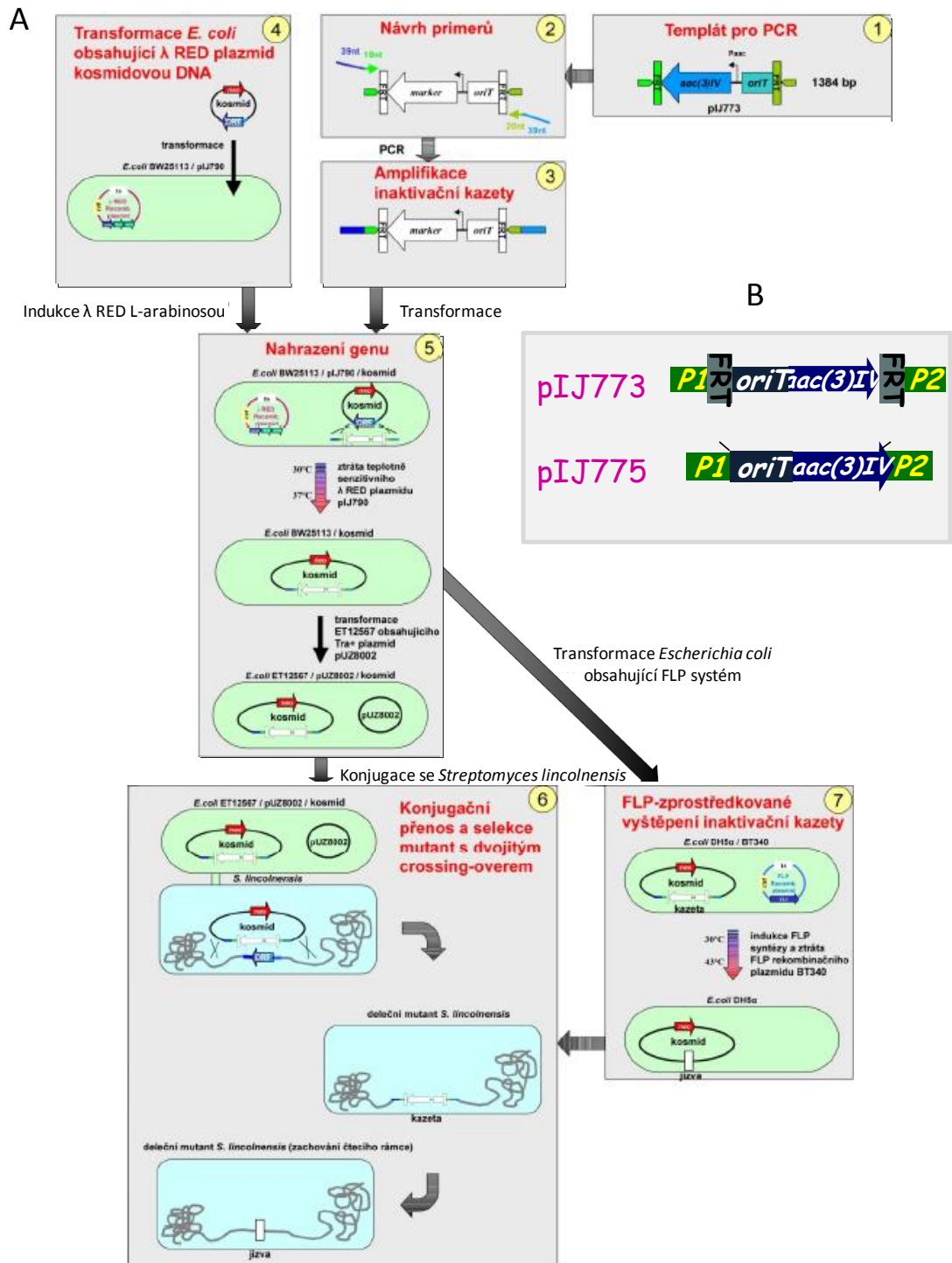
Složení ligační směsi	Množství pro 1 reakci
10x T4 DNA ligační pufr	2 μl
Vektor	X μl
Inzert	Y μl
100mM ATP	0,2 μl
T4 DNA lipasa	1 μl
dH <sub>2</sub> O	do 20 μl

### 3.2.4.10. Sekvenování DNA

Sekvenování bylo provedeno firmou GATC Biotech. Vzorky byly dodány ve vodném roztoku o požadovaných koncentracích vzorku (40 – 50 ng/μl) a primeru (2,5 μM) v celkovém objemu 10 μl. Výsledky byly zpracovány pomocí počítačového programu CLC Main Workbench 6.8.1. V této diplomové práci bylo sekvenování využito k ověření připravených konstruktů.

### 3.2.5. Metoda inaktivace genů u rodu *Streptomyces*

Pro inaktivaci rezistenčních genů v biosyntetickém genovém klastru pro syntézu linkomycinu u *Streptomyces lincolnensis* byla použita metoda REDIRECT PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Gust, B. et al., 2002). Protokol je volně k dispozici na internetu ([http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol\\_V1\\_4.pdf](http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf)). Metoda je založena na výměně cílového genu za inaktivační kazetu pomocí dvojitého „crossing-overu“. Použité inaktivační kazety jsou tvořeny selekčním markerem pro apramycinovou rezistenci, *oriT*, který umožňuje mobilizaci konstruktů, a FRT sekvencemi rozeznávanými FLP rekombinasou. FLP rekombinasa je schopna vyštěpit inaktivační kazetu a v původním místě genu zanechá tzv. jizvu. Jizva je 81 bp dlouhý úsek, který by neměl mít vliv na přepis okolních genů. Schématické znázornění protokolu je uvedeno na obrázku 20A. Pro inaktivaci rezistenčních genů *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)* byly použity inaktivační kazety 773 a 775, obsahující apramycinový rezistenční marker (Obr. 20B).



Obrázek 20: Protokol PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). A - Schematické znázornění protokolu inaktivace genu; B – Použité inaktivační kazety (P1 a P2 vazebná místa pro primery).

První část protokolu vedoucí k přípravě mutovaného kosmidu využívá kmen *Escherichia coli* BW25113. Teprve následně dojde k vložení získaného mutovaného kosmidu do příslušného kmene *Streptomyces lincolnensis*. Při přípravě delecí mutant bylo postupováno dle protokolu. Jako templát k amplifikaci inaktivační kazety pomocí PCR byl využit vyštěpený úsek plazmidu nesoucí příslušnou kazetu pomocí restričních endonukleas EcoRI a HindIII. Primery pro amplifikaci byly navrženy na

základě instrukcí v protokolu. Využitím  $\lambda$  RED zprostředkované rekombinace kódované teplotně sensitivním plazmidem pIJ790, dojde k vytvoření kosmidu nesoucího místo genu inaktivační kazetu. Po následné izolaci mutovaného kosmidu a jeho ověření pomocí restričních endonukleas dojde k jeho vnesení pomocí mezidruhovému konjugaci do recipientního kmene *Streptomyces lincolnensis*. Výsledkem konjugace je kmen obsahující původní nemutovaný gen spolu s kazetou v místě kopie původního, deletovaného genu. Pro získání požadované deleční mutanty je nutné, aby došlo, díky dvojitému „crossing-overu“, k vyštěpení kosmidu spolu s původním genem. Výsledkem je apramycin rezistentní a kanamycin senzitivní mutanta, která má v místě deletovaného genu integrovanou deleční kazetu.

Pro odstranění kazety a k získání deleční mutanty s jizvou místo deletovaného genu musí dojít k aktivaci FLP recombinasy, která odstraní centrální část kazety, na jejímž místě zůstane úsek dlouhý 81 bp ohraničený FRT místy. Plazmid nesoucí tuto rekombinasi je teplotně senzitivní. Získaný kosmid je opět vnesen do recipientního kmene nesoucího deletovaný gen inaktivační kazetou a opětovně homologní rekombinací přes FRT místa dojde k výměně inaktivační kazety za jizvu.

## 3.2.6. Metody práce s proteiny

### 3.2.6.1. Příprava vzorků pro SDS – PAGE

Buněčné frakce byly připraveny dle publikace Novotná, G. et al. (2012) s malými modifikacemi.

1. Po kultivaci testovaného kmene *Streptomyces lincolnensis* bylo medium rozděleno do falkonek po 15 ml a buňky byly centrifugovány (4 000 g, 20 minut, 4 °C). Pelet byl buď okamžitě použit, nebo uchováván při - 80 °C.
2. Buňky byly promyty Rostokem I (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) a pelet byl zvážen. Na 1g buněčného peletu bylo přidáno 5 ml Rostoku II (50 mM Tris-HCl, 1x inhibitor proteas).
3. Buňky byly rozbity pomocí sonikátoru UP200S (Hielscher Ultrasonics GmbH). Sonikace probíhala čtyřikrát po 15 sec, mezi jednotlivými pulzy byla buněčná suspenze uložena na ledu po dobu minimálně 30 sec.
4. Pro oddělení buněčného lyzátu od zbytků či nerozbitých buněk byla směs centrifugována (5 000 g, 10 min, 4 °C). Pelet byl resuspendován v Rostoku II a lyzát rozdělen, a to následovně: část byla uschována v - 80 °C jako celková buněčná frakce a zbytek byl použit k získání membránové a cytosolické frakce.
5. Pro oddělení cytosolických a membránových proteinů byl lyzát opět centrifugován (20 000 g, 45 min, 4 °C). Pelet (membránová frakce) byl poté resuspendován v Rostoku II a to ve dvou koncentracích (5x a 1x koncentrovaný vzorek).
6. Připravené frakce byly uchovávány při - 80 °C. Pro nanesení na SDS – PAGE byly vzorky smíchány s ekvivalentním objemem 2x SDS-PAGE vzorkovým pufrem a vystaveny 98 °C po dobu 10 minut. Po zchlazení byly nanесeny do jamek polyakrylamidového gelu.

### 3.2.6.2. SDS – PAGE proteinová elektroforéza

Při SDS – PAGE proteinové elektroforéze v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) dochází za působení elektrického proudu k rozdělení proteinů primárně v závislosti na jejich velikosti. Pomocí SDS získají proteiny záporný náboj úměrný své velikosti, díky kterému v elektrickém poli migrují směrem ke kladně nabitým elektrodám a během průchodu skrz gel dochází k jejich rozdělení v závislosti na jejich rozdílné pohyblivosti.

V experimentech jsem používala 8% polyakrylamidový gel. Složení gelů je uvedeno v tabulce 20. Čistá a odmaštěná skla byla složena do aparatury pro nalévání gelů. Nejprve byl připraven separační gel, který byl převrstven cca 1 ml destilované vody a nechal se cca 30 minut polymerovat. Po odstranění destilované vody byl nad separační gel nanesen gel zaostřovací, do kterého byl vložen hřeben. Směs se opět nechala cca 30 minut tuhnout. Při přípravě gelů byly jako poslední složky přidány TEMED a 30% APS, neboť po jejich přidání začne směs polymerizovat.

Tabulka 20: Složení SDS-PAGE gelu

Složení gelu	Separací gel 8%	Zaostřovací gel 4%
30% akrylamid	1,35 ml	83,25 $\mu$ l
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	156,25 $\mu$ l
5% SDS	0,1 ml	12,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilovaná	2,3 ml	373 $\mu$ l
TEMED	25 $\mu$ l	3,13 $\mu$ l
30% APS	2,5 $\mu$ l	0,31 $\mu$ l

Po ztuhnutí gelu byla dle manuálu sestavena elektroforetická aparatura, která byla naplněna 1x SDS – PAGE pufrům. Po nanesení proteinového standardu BlueElf Prestained Protein Marker o objemu 5  $\mu$ l a vzorků o objemu 10 - 25  $\mu$ l do příslušných jamek byla aparatura spuštěna. Elektroforéza probíhala nejprve při napětí 80 V. Jakmile vzorky a marker vstoupily do separačního gelu, napětí bylo zvýšeno na 180 V. Po skončení separace byl gel vyjmut ze skel a dále použit buď pro obarvení, nebo pro metodu Western blotu.

### 3.2.6.3. Barvení SDS – PAGE gelu

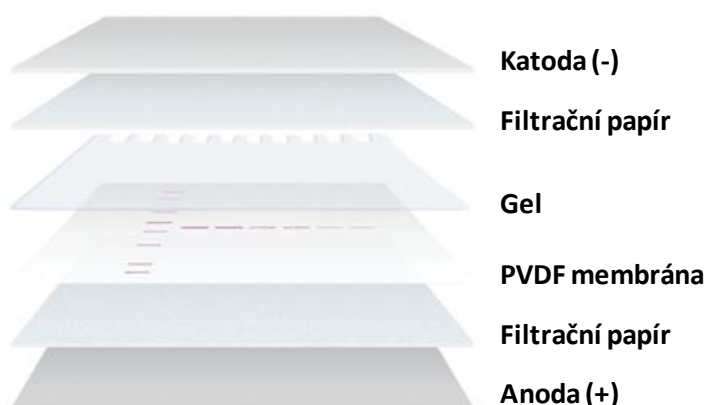
1. Gely byly po ukončení SDS – PAGE elektroforézy přeneseny na 10 minut do nádoby obsahující barvicí roztok – Coomassie.
2. Následně byl gel propláchnut malým množstvím odbarvovacího roztoku – Destain.
3. Gel byl dvakrát promyt po dobu 10 minut, a to vždy v novém odbarvovacím roztoku při RT. V průběhu promývání byla nádoba s gelem uložena na kývačce.
4. Pro úplné odbarvení byl gel ponechán v novém odbarvovacím roztoku přes noc na kývačce za RT.

5. Obarvený gel byl vložen do průhledné folie a vyfocen.

### 3.2.6.4. Western blot a detekce proteinů imunodetekcí

Tato metoda byla použita k detekci proteinu Lmr(C) značeného pomocí histidinové kotvy v buněčném lyzátu *Streptomyces lincolnensis*. Použitím elektrického pole dojde k přenosu rozdělených proteinů po SDS – PAGE elektroforéze na PVDF (polyvinylidendifluorid) membránu a posléze pomocí protilátek k detekci značeného proteinu. Pro polosuchý přenos proteinů na membránu byl použit přístroj Trans-Blot® SD Semi-Dry Cell (Bio-Rad).

Prvním krokem byla aktivace PVDF membrány. K aktivaci došlo namočením membrány na 15 sekund do metanolu, poté byla pomocí pinzety přenesena na 10 minut do přenosového pufru. Po aktivaci nesmí membrána vyschnout. Do přenosového pufru byly vloženy také dva filtrační papíry a po ukončení SDS – PAGE elektroforézy i polyakrylamidový gel. Následně byl na desce blotovacího přístroje složen tzv. sandwich (Obr. 21). Při skládání každé vrstvy byl kladen důraz na odstranění vzduchových bublin, které zamezují přenosu proteinů z gelu na membránu, a na kontrolu, zda nedošlo k vyschnutí vrstev. Po složení aparatury došlo za stálého napětí 15V po dobu 45 minut k přenosu.

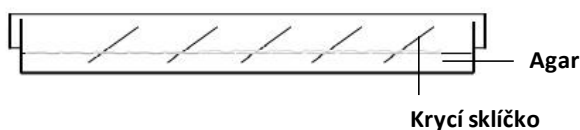


**Obrázek 21: Struktura pro složení blotovací aparatury – tzv. sandwich**  
(Převzato z <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/protein-blotting-methods>)

Po ukončení blotování byl pro kontrolu přenosu proteinů gel dodatečně obarven. Membrána byla okamžitě, aby nedošlo k jejímu vyschnutí, přenesena do 5% mléka rozpuštěného v PBS a inkubována při 4 °C přes noc. Dále byla inkubována v 1% mléce rozpuštěném v PBS s primární protilátkou proti histidinové kotvě (1:10 000) po dobu 1 hodiny při RT. Pro odmytí nespecificky navázané protilátky byla membrána čtyřikrát po 10 minutách promyta v PBS s přísadkou slabého detergentu Tween 20 (0,5%). Následně byla membrána inkubována se sekundární protilátkou (1:5 000) opět 1 hodinu při RT. Odmytí nespecificky navázané sekundární protilátky bylo provedeno stejně jako před tím. Pro zviditelnění byly k membráně přidány 2 ml směsi Immobilon™ Western chemiluminescent HRP Substrate (Merck) a signál byl vizualizován pomocí ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

### 3.2.7. Mikroskopické pozorování morfologie mycelia rodu *Streptomyces*

Pro pozorování sporulace *Streptomyces coelicolor* byla použita světelná mikroskopie. Do zaočkovaného MS agaru byla zabodnuta krycí sklička pod úhlem nižším než 45°, aby se Petriho miska dala zavřít (Obr. 22). Krycí sklička byla předtím vysterilizována pomocí denaturovaného etanolu. Následně se kultura nechala kultivovat při teplotě 30 °C. Při růstu bakterií rodu *Streptomyces* se vzdušné mycelium dostane až na krycí sklička, která byla použita k přípravě mikroskopického preparátu. Příprava spočívala v přiklopení krycího sklička na podložní s kapkou dH<sub>2</sub>O. Samotné mikroskopování bylo prováděno RNDr. Janem Svobodou, Ph.D. na mikroskopu Olympus FV1000 TIRF v MBÚ AV ČR, v. v. i.



Obrázek 22: Schematické znázornění kultivace

### 3.2.8. Test biologické aktivity sekundárních metabolitů

Tento test spočívá ve vytvoření inhibiční zóny kolem disku - agarového bločku o průměru cca 6 mm, který obsahuje naprodukované antibiotikum zkoumaným kmenem *Streptomyces lincolnensis*. Jako citlivý, podkladový, indikátorový kmen byla použita *Kocuria rhizophila* CCM552. Agarové bločky byly vytvořeny Mgr. Markétou Koběorskou Ph.D. v mikrotitrační destičce nanesením 200 µl GYM agaru. Po jeho ztuhnutí a zaočkování 10 µl zásobní suspenze spor zkoumaného kmene byla mikrotitrační destička kultivována při 30 °C po dobu 7 dnů, aby došlo k produkci sekundárních metabolitů a k jejich difuzi do agarového bločku. Ze zásobní buněčné suspenze *Kocuria rhizophilla* CCM552 bylo v 1 ml fyziologického roztoku připraveno inokulum o zákalu 0,5 – 1,0 McFarlandovy stupnice a touto suspenzí byla zaočkována Petriho miska s B1 agarem. Miska se nechala v laminárním boxu vysušit a následně byl na povrch vložen připravený agarový bloček se *Streptomyces lincolnensis* a miska byla kultivována při 37 °C přes noc. Poté byly odečteny vytvořené inhibiční zóny. Nevýhodou této metody je její nespecifičnost. *Streptomyces lincolnensis* je krom linkomycinu A a B schopna produkovat také jiné antimikrobiální látky, jako příklad můžeme uvést pamamycin (nepublikovaná data naší laboratoře), které ale nelze odlišit.

### 3.2.9. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

V této diplomové práci byla pro stanovení minimální inhibiční koncentrace využita agarová diluční metoda. Testování probíhalo na miskách s MH agarem obsahující postupně rostoucí koncentrace testovaných antibiotik. Jako minimální inhibiční koncentrace byla stanovena nejnižší koncentrace, při které již nedocházelo k viditelnému růstu nanesené bakteriální suspenze. Testovanými antibiotiky byly linkomycin (LIN) v rozpětí koncentrací 8 – 16384 µg/ml (32768 µg/ml), klindamycin (CLI) v rozmezí 0,5 – 1024 µg/ml a erytromycin (ERY) v rozsahu 2 – 128 µg/ml.



1. Testované antibiotikum bylo naváženo a rozředěno pro přípravu zásobního roztoku o koncentraci 500 mg/ml pro LIN, 10 mg/ml pro CLI a ERY.
2. V laminárním boxu byly do 15 ml sterilních zkumavek připraveny pracovní roztoky antibiotik podle tabulky 21 o celkovém objemu 2 ml.
3. V 50ml centrifugační zkumavce byly 2 ml promíchaného pracovního roztoku antibiotika doplněny MH agarem vytemperovaným na 55 °C do objemu 20 ml. Po důkladném promíchání byl agar nalit do Petriho misky o průměru 8 cm. Příprava půd probíhala postupně se stoupající koncentrací testovaného antibiotika. Jako kontroly byly použity misky s MH agarem, a to v počtu dvou misek bez přidaného antibiotika a po jedné misce s hygromycinem (40 µg/ml), apramycinem (50 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml).
4. Po ztuhnutí agarů byly misky ponechány ve flowboxu pro vysušení povrchu, aby při nanášení buněčné suspenze došlo k jejímu rychlému uschnutí.
5. Ze zásobních alikvot spor testovaných kmenů byly připraveny inokula o zákalu 0,5 – 1 McFarlandovy stupnice. Suspenze spor byly drženy co nejdéle na ledu, aby nedošlo k jejich klíčení.
6. Připravená inokula jednotlivých kmenů byla nanášena do mikrotitrační destičky v určitém pořadí a v počtu setů podle počtu testovaných antibiotik.
7. Pomocí multikanálové pipety bylo postupně nanášeno 5 µl každého vzorku na předpřipravené misky v daném pořadí. Před nanášením byla suspenze pomocí pipety promíchána a nanášení probíhalo od misky bez antibiotika. Následovaly misky s testovaným antibiotikem se stoupající koncentrací, následované kontrolními miskami s hygromycinem, apramycinem a kanamycinem. Jako poslední miska byla naočkována opět miska bez antibiotik.
8. Misky byly po zaočkování ponechány v laminárním boxu pro uschnutí kapek inokula, aby nedošlo k jejich slítí.
9. Určení MIC bylo provedeno po 5 dnech kultivace v 30 °C.

**Tabulka 21: Ředění antibiotik pro přípravu agarových ploten**

<b>Zásobní koncentrace</b>	<b>Antibiotikum [μl]</b>	<b>dH<sub>2</sub>O [μl]</b>	<b>MH agar [ml]</b>	<b>Finální koncentrace [μg/ml]</b>	<b>Log<sub>2</sub></b>
500 mg/ml	1310	690	18	32768	15
	655	1345	18	16384	14
	328	1672	18	8192	13
	164	1836	18	4096	12
	82	1918	18	2048	11
10 mg/ml	2048	0	18	1024	10
	1024	976	18	512	9
	512	1488	18	256	8
	256	1744	18	128	7
	128	1872	18	64	6
1 mg/ml	640	1360	18	32	5
	320	1680	18	16	4
	160	1840	18	8	3
	80	1920	18	4	2
	40	1960	18	2	1
0,01 mg/ml	2000	0	18	1	0
	1000	1000	18	0,5	-1

## 4. Výsledky

### 4.1. Příprava delečních mutant *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466

Gen *lmr(C)* se nalézá v biosyntetickém genovém klastru pro syntézu linkomycinu spolu s dalšími dvěma rezistenčními geny, *lmr(A)* a *lmr(B)*. Studium funkce genu *lmr(C)* ve *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 je komplikováno tím, že případná rezistence udílená *lmr(C)* je maskována rezistencí udílenou geny *lmr(A)* a *lmr(B)*. Výhodou však je, že v *Streptomyces lincolnensis* lze studovat vliv *lmr(C)* na produkci linkomycinu a také umožňuje odhalit případné funkční interakce mezi *Lmr(C)* a proteiny kódovanými zbylými rezistenčními geny, pokud existují.

Cílem bylo připravit deleční mutanty ve všech třech rezistenčních genech, jejich vzájemné dvojité kombinace a také mutantu trojitou. Deleční mutanty byly připraveny metodou PCR targeting system (kap. 3.2.5.). Příprava delečních mutant byla z větší části provedena Mgr. Markétou Koběrkou, Ph.D. Osobně jsem se podílela na přípravě jen některých z nich, a to okrajově v podobě ověření mutovaných kosmidů restriční analýzou, potvrzení mutant pomocí koloniového PCR, či vnesení mutovaných kosmidů mezidruhovou konjugací do recipientního kmene *Streptomyces lincolnensis* a následnou selekci mutant s dvojitým crossing-overem. Ze získaných mutant byly připraveny suspenze spor určené k uchování a dalšímu použití (kap. 3.2.1.5).

Zatím byly připraveny deleční mutanty uvedené, včetně jejich grafického znázornění, v tabulce 22. Mutantě  $\Delta A^*$ , jejíž příprava byla trochu komplikovanější, je věnována samostatná kapitola. V přípravě delečních mutant se pokračuje i nadále, neboť se nám prozatím nepodařilo připravit dvojitou mutantu  $\Delta AB$  (delece v genech *lmr(A)* a *lmr(B)*) a trojitou mutantu  $\Delta ABC$ .

**Tabulka 22: Grafické znázornění připravených delečních mutant *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466.** Grafické znázornění ukazuje uspořádání biosyntetického klastru s modře vyznačenými rezistenčními geny. Ostatní geny jsou bílé.

Označení	Delece	Grafické znázornění mutace
WT	-	
$\Delta B$	<i>lmr(B)</i>	
$\Delta C$	<i>lmr(C)</i>	
$\Delta AC$	<i>lmr(A); lmr(C)</i>	
$\Delta BC$	<i>lmr(B); lmr(C)</i>	

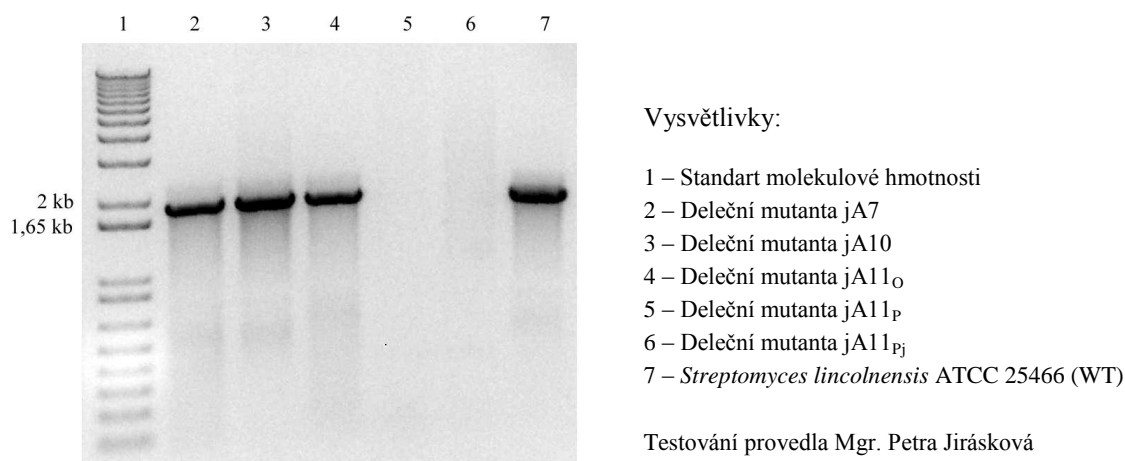
Pozn. Pro delecí genů jsou navrženy různé inzerty nesoucí selekční marker, tzv. kazety. Po jejich odstranění zůstanou na jejich původním místě jen okrajové oblasti, tento stav se nazývá jizva.

### 4.1.1. Příprava deleční mutanty *lmr(A)*

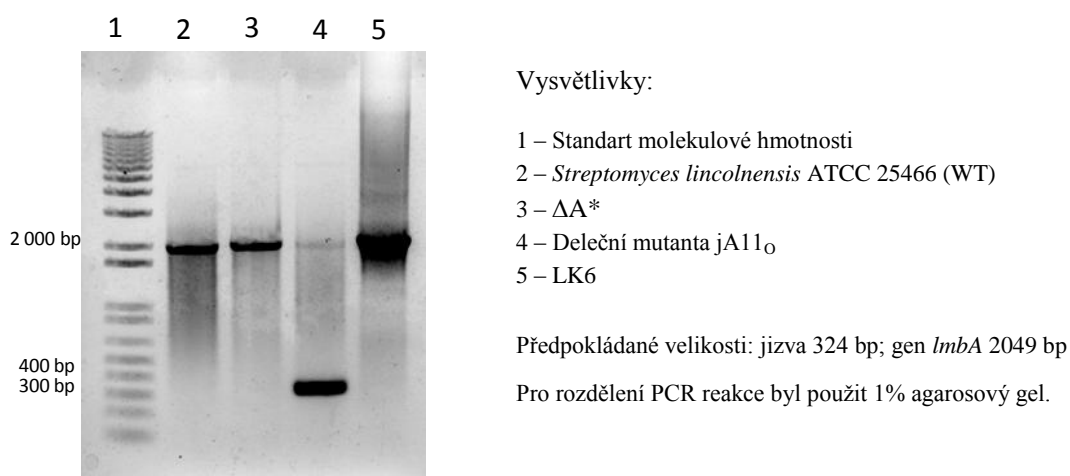
Pro delecí genu *lmr(A)* byla nejprve použita kazeta 773 amplifikovaná z vyštěpeného fragmentu plazmidu pIJ773 pomocí primerů *lmrA* for a *lmrA* rev (Tab. 7). Primery obsahují na svém 5' konci sekvenci totožnou s okolím deletovaného genu včetně start, či stop kodonu. Zbytek oligonukleotidů je totožný s koncovou částí inaktivační kazety. Získaná kazeta byla vložena do kosmidu LK6 místo genu *lmr(A)* pomocí rekombinace zprostředkované  $\lambda$  RED rekombinací (Gust, B. et al., 2002). Po ověření správnosti mutovaného kosmidu restrikcími enzymy PstI a XhoI byl kosmid, označený jako pMK006, konjugován do *Streptomyces lincolnensis* ATTC 25466. Druhý den byly misky přelity selekčními antibiotiky apramycinem (50  $\mu$ g/ml, selekce přítomnosti 773 kazety) a kanamycinem (50  $\mu$ g/ml selekce přítomnosti kosmidu pMK006 integrovaného do chromozomu jednoduchým crossing-overem). V této chvíli chromozom obsahoval původní gen *lmr(A)* a zároveň v kopii také okolí genu s integrovanou kazetou. Vyrostlé kolonie byly dále selektovány na ztrátu kanamycinové rezistence, při níž dojde z důvodu dvojitého crossing-overu k vyštěpení kosmidu spolu s původním genem *lmr(A)*. Výsledná mutanta by tedy měla být apramycin rezistentní a kanamycin senzitivní. Bohužel se nám ani po několika kolech selekce nepodařilo deleční mutantu *lmr(A)* připravit. U ostatních mutant docházelo k potřebnému dvojitému crossing-overu s vysokou frekvencí většinou již po prvním kole selekce apramycin rezistentních, kanamycin senzitivních kolonií. Proto jsme se domnívali, že by mutace v genu *lmr(A)* mohla být letální. LmrA je hlavním transportérem syntetizovaného linkomycinu, jeho delecce by tedy mohla způsobovat akumulaci letální koncentrace antibiotika v buňce. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro přípravu LmrA mutanty v kmeni defektním v produkci linkomycinu. V naší laboratoři bylo připraveno několik klonů mutant obsahujících delecí biosyntetického genu *lmbA*, u kterých, z povahy mutace, prakticky nemá docházet k syntéze linkomycinu. Cílem tedy bylo připravit dvojistou *lmbA*, *lmr(A)* mutantu. Pro přípravu jsme zvolili kmen jA11<sub>O</sub>, který měl na místě genu *lmbA* jizvu, tedy na původním místě deleční kazety zůstaly jen její okrajové části, čímž kmen jA11<sub>O</sub> ztratil apramycinovou rezistenci nesenou deleční kazetou. Příprava byla stejná, jako ve výše popsaném případě s využitím kosmidu pMK006. V této mutantě se nám podařilo delecí genu *lmr(A)* připravit a získaný kmen byl označen jako  $\Delta A^*$ .

Při testování produkce linkomycinu (kap. 3.2.1.4.) bylo však zjištěno, že mutanta  $\Delta A^*$  produkuje linkomycin. Toto pozorování vedlo ke kontrolnímu přetestování všech klonů deleční mutanty *lmbA* (jA7, jA10, jA11<sub>O</sub>, jA11<sub>P</sub> a jA11<sub>Pj</sub>) pomocí PCR. Jako templát byla použita genomová DNA jednotlivých klonů. Pro testování byly využity primery fA10257N a rA10257N (Tab. 7), které nasedají na začátek a konec genu *lmbA*. Přetestování provedla Mgr. Petra Jirásková. Výsledkem bylo, že pouze dva z pěti klonů (jA11<sub>P</sub>, jA11<sub>Pj</sub>) uschovaných v laboratorní sbírce mají deletovaný gen *lmbA*, neboť v jejich případě nedošlo k amplifikaci genu *lmbA* (Obr. 23). Kmen jA11<sub>O</sub>, ze kterého jsme vycházeli pro přípravu dvojité *lmbA*, *lmr(A)* mutanty, mezi ně nepatří. Toto zjištění vedlo k ověření, zda naše deleční mutanta  $\Delta A^*$  obsahuje v místě genu *lmbA* jizvu, či gen. Testování bylo provedeno pomocí PCR (kap. 3.2.4.5.) s použitím primerů chAf a chAr (Tab. 7), které nasedají v blízkém okolí genu *lmbA*. Jako templát byla využita genomová DNA (kap. 3.2.4.4.). Výsledkem amplifikace byl v případě  $\Delta A^*$  pouze jediný produkt o velikosti 2kb odpovídající genu *lmbA*. Produkt o velikosti 324bp vzniklý amplifikací jizvy nebyl na rozdíl od amplifikace u kmene JA11o detekován. (Obr. 24).

Pro další testování v této diplomové práci tedy považujeme připravenou deleční mutantu ( $\Delta A^*$ ) za rovnocennou běžné deleční mutantě připravené na pozadí divokého kmene.



**Obrázek 23:** Agarová gelová elektroforéza PCR produktů pro ověření *lmbA* delečních mutant

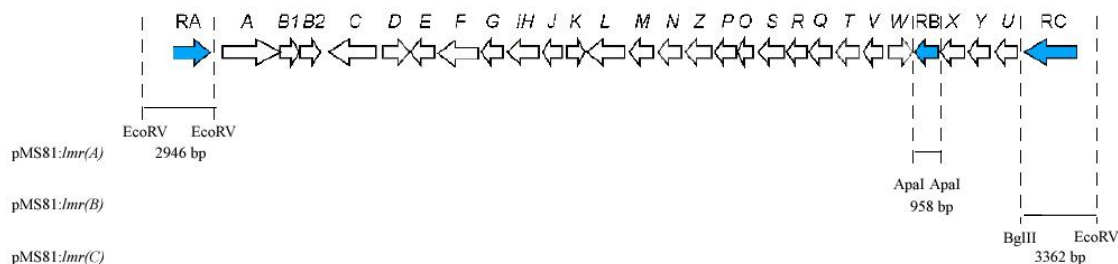


**Obrázek 24:** Agarová gelová elektroforéza PCR produktů k ověření přítomnosti genu *lmbA* u deleční mutanty  $\Delta A^*$

Z výše uvedeného je velmi pravděpodobné, že delece *lmr(A)* není letální. Tomu nasvědčuje i to, že jsme byli schopni připravit dvojitou mutantu  $\Delta AC$ , která byla připravena z mutanty  $\Delta C$  nahrazením genu *lmr(A)* kazetou 775. V současnosti připravujeme deleci *lmr(A)* ve *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (WT), ale tentokrát s použitím deleční kazety 775.

## 4.2. Příprava konstruktů a komplementace delečních mutant *in trans*

Pro ověření fenotypů delečních mutant komplementací *in trans* byly připraveny konstrukty nesoucí příslušné geny ve vektoru pMS81. Geny byly klonovány včetně sekvence jim předcházející, aby byla zachována regulátorová oblast genů. Komplementační vektor nesoucí gen *lmr(A)* se podařilo připravit dříve, než zbylé dva.



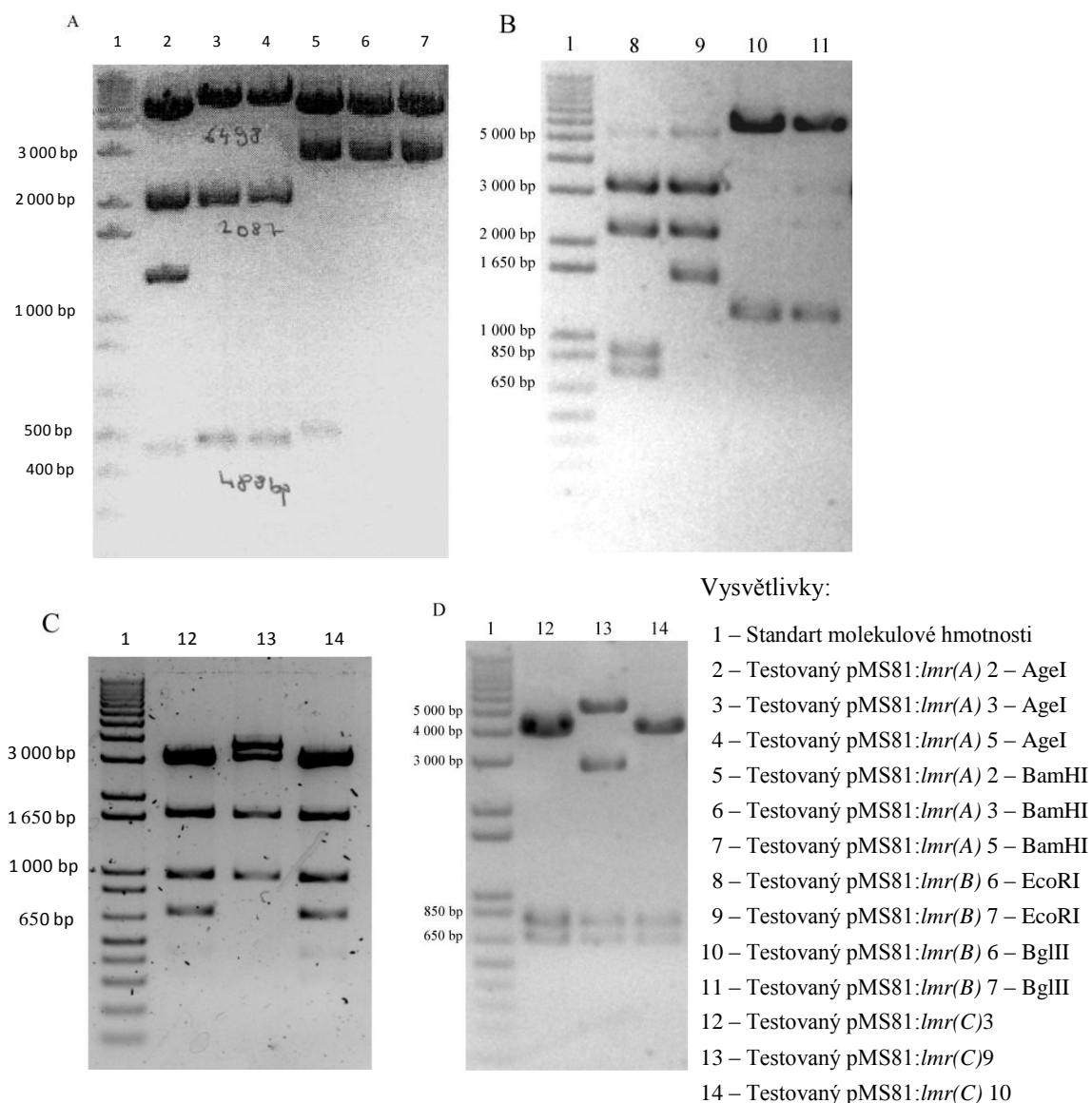
**Obrázek 25: Grafické znázornění restrikčních fragmentů kosmidu LK6 nesoucí jednotlivé rezistentní geny –** Příslušné fragmenty byly použity jako inzerty pro přípravu komplementačních konstruktů. Rezistentní geny jsou zvýrazněny modrou barvou.

Fragmenty nesoucí rezistenční geny *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)* byly získány vyštěpením z kosmidu LK6 pomocí restrikčních endonukleas (Obr. 25). Restrikční enzymy byly navrženy tak, aby úsek DNA, kromě celého rezistenčního genu, obsahoval také celou nekódující sekvenci, která předchází genu, u které se předpokládá, že obsahuje promotor a regulační oblast. Doba restrikce se lišila v závislosti na použitém enzymu (Tab. 17). Fragment *lmr(A)* (2946 bp) byl získán restrikční endonukleasou EcoRV – HF, jež byla následně tepelně inaktivována. Pokud se k takto naštěpenému LK6 přidal enzym BglIII, došlo k rozštěpení fragmentu o velikosti 31517 bp na menší části a tím k získání fragmentu o velikosti 3362 bp obsahující gen *lmr(C)*. Při štěpení kosmidu LK6 enzymem ApaI s jeho následnou inaktivací byl získán fragment o velikosti 958 bp obsahující gen *lmr(B)*. Naštěpené fragmenty byly rozděleny na 1% agarosovém gelu a fragmenty o požadované velikosti byly vyříznuty a přečištěny (kap. 3.2.4.2). Pro vložení fragmentů do EcoRV linearizovaného vektoru pMS81 s tupými konci byly 5' a 3' přesahující konce inzertů upraveny na tupé použitím polymerasové a exonukleasové aktivity Klenowova fragmentu (kap. 3.2.4.8.). Aby při ligaci nedocházelo k opětovnému spojení, byl linearizovaný plazmid defosforylován alkalickou fosfatou CIP (NEB) (kap. 3.2.4.7.). Ligace inzertů do plazmidu (kap. 3.2.4.9.) probíhala pomocí T4 DNA ligasy (NEB) při 16 °C po dobu 16 hodin. Jako negativní kontrola byla použita ligační reakce obsahující pouze linearizovaný plazmid pMS81 bez inzertu. Ligační směs byla následně natransformována tepelným šokem do *Escherichia coli* JM109 (kap. 3.2.2.2.). Pro selekci buněk nesoucí cirkulární plazmid pMS81 s vloženým genem byla suspenze vyseta na LB agar obsahující hygromycin (100 µg/ml). Další den byly vybrané kolonie přečárkovány na nový LB agar a zároveň zaočkovány do 5 ml LB media s přidaným hygromycinem (80 µg/ml). Z kultury byla následující den vyizolována plazmidová DNA (kap. 3.2.4.3.). Pro ověření, zda získané vektory obsahují příslušný inzert, byla provedena restrikční analýza. Očekávané délky DNA fragmentů po kontrolním štěpení jednotlivých komplementačních plazmidů jsou uvedeny v tabulce 23. Z důvodu ligace tupých konců molekul mohlo dojít k vložení inzertu ve dvou orientacích. Díky této skutečnosti jsou v tabulce 23 uvedeny obě možné varianty, pokud existují. Výsledky restrikce jsou viditelné na snímcích z DNA elektroforézy (Obr. 26). Je patrné, že v případě ligace genu *lmr(A)* do vektoru pMS81 správný inzert obsahují pouze dva ze tří testovaných plazmidů (pMS81:*lmr(A)* 3, pMS81:*lmr(A)* 5). Všechny zbývající testované konstrukty obsahovaly příslušný inzert o správné velikosti. Z restrikční analýzy také vyplývá, že se nám povedlo získat vektory nesoucí gen *lmr(B)* a *lmr(C)* v obou možných orientacích.

**Tabulka 23: Očekávané výsledky restrikční analýzy komplementačních plazmidů**

Konstrukty	Restrikční endonukleasa	Očekávané velikosti fragmentů <sup>1</sup> [bp]	
pMS81 <i>lmr(A)</i>	AgeI	1277; 2087; 5709	488; 2087; 6498
pMS81: <i>lmr(A)</i>	BamHI	3145; 5924	
pMS81: <i>lmr(B)</i>	EcoRI	769; 901; 2235; 3176	69; 1601; 2235; 3176
pMS81: <i>lmr(B)</i>	BglII	1253; 5820	
pMS81: <i>lmr(C)</i>	PstI	670; 806; 3974; 4043	670; 806; 2848; 5169
pMS81: <i>lmr(C)</i>	BamHI	690; 976; 1707; 2979; 3145	37; 976; 1707; 3145; 3624
pMS81	PstI	806; 5317	
pMS81	AgeI	6119	
pMS81	EcoRI	716; 2235; 3176	
pMS81	BglII	1253 4870	
pMS81	BamHI	261; 806; 1550; 1663; 1851	

Pozn. <sup>1</sup> Případně dvě varianty velikosti fragmentů v závislosti na směru vložení genu



**Obrázek 26: DNA elektroforéza restrikční analýzy komplementačních plazmidů. A - Restrikční analýza plazmidů pMS81:*lmr(A)*; B - Restrikční analýza plazmidů pMS81:*lmr(B)*; C - Restrikční analýza plazmidů pMS81:*lmr(C)* štěpena BamHI; D - Restrikční analýza plazmidů pMS81:*lmr(C)* štěpena PstI. Pro rozdělení směsi byl použit 1% agarosový gel.**

Pro každý gen byl vybrán jeden z ověřených plazmidů (pMS81:*lmr(A)* 5, pMS81:*lmr(B)* 6, pMS81:*lmr(C)* 10). Co se týče orientace, vybrané konstrukty obsahují geny vložené ve vektoru ve stejné orientaci. Konstrukty byly opětovně vneseny pomocí transformace tepelným šokem do *Escherichia coli* XL1-Blue a nakultivovány v 100 ml LB media s hygromycinem (80 µg/ml) pro následnou izolaci plazmidů pomocí komerčně dostupného kitu NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel). Důvodem bylo získání většího množství DNA pro uschování a další použití.

Komplementační vektory pMS81:*lmr(A)* 5, pMS81:*lmr(B)* 6, pMS81:*lmr(C)* 10 byly následně vneseny do příslušných delečních mutant *Streptomyces lincolnensis* pomocí mezidruhově konjugace (kap. 3.2.3.). Pro ověření, zda samotné včlenění prázdného vektoru pMS81 nezpůsobuje změnu fenotypu, byl do příslušných mutant konjugován také samotný prázdný vektor. Takto byla získána sada komplementovaných delečních mutant (Tab. 24). V případě dvojitých mutant byly mutanty komplementovány vždy jedním genem a výsledný fenotyp by měl být srovnatelný s příslušnou jednoduchou mutantou.

**Tabulka 24: Seznam připravených komplementovaných kmenů**

<b>Kmen</b>	<b>Konjugovaný plazmid</b>	<b>Recipientní kmen</b>
Δ A* + A	pMS81: <i>lmr(A)</i> 5	Δ A*
jA11 <sub>o</sub> + pMS81	pMS81	jA11 <sub>o</sub>
Δ B + B	pMS81: <i>lmr(B)</i> 6	Δ B
Δ B + pMS81	pMS81	Δ B
Δ C + C	pMS81: <i>lmr(C)</i> 10	Δ C
Δ C + pMS81	pMS81	Δ C
Δ AC + A	pMS81: <i>lmr(A)</i> 5	Δ AC
Δ AC + C	pMS81: <i>lmr(C)</i> 10	Δ AC
Δ AC + pMS81	pMS81	Δ AC
Δ BC + B	pMS81: <i>lmr(B)</i> 6	Δ BC
Δ BC + C	pMS81: <i>lmr(C)</i> 10	Δ BC
Δ BC + pMS81	pMS81	Δ BC
WT + pMS81	pMS81	WT
WT + C	pMS81: <i>lmr(C)</i> 10	WT

### **4.3. Testování získaných delečních mutant *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 a jejich komplementovaných variant**

U získaných delečních mutant a jejich komplementací byl zkoumán vliv mutací na produkci linkomycinu a změnu rezistence k linkomycinu, klindamycinu a erytromycinu.

#### **4.3.1. Testování produkce linkomycinu**

Orientační testování produkce linkomycinu u delečních mutant a jejich komplementací bylo provedeno kultivačně dle protokolu uvedeného v kapitole 3.2.8. použitím citlivého indikátorového kmene



*Kocuria rhizophila* CCM 552. Připravené agarové bločky měly průměr 6 mm. Z naměřených průměrů inhibičních zón, které jsou uvedeny v tabulce 25, lze usoudit, že delece genu *lmr(B)* negativně ovlivňuje produkci antimikrobiálních látek. V ostatních případech sice došlo k zmenšení zóny, ale u kmenů stále docházelo k produkci bioaktivních látek. Nevýhodou tohoto testu je, že nelze odlišit linkomycin od jiných produkovaných antimikrobiálních látek. Je známo, že *Streptomyces lincolnensis* může za určitých podmínek produkovat kromě linkomycinu i další antimikrobiální látky, jako např. pamamycin (nepublikovaná data naší laboratoře). Proto jsme pro upřesnění výsledků testovali přítomnost linkomycinu v mediu chromatograficky pomocí UHPLC.

**Tabulka 25: Inhibiční zóny**

Kmen	Inhibiční zóna – průměr [mm]	
	Komplementace	
WT	26	X
$\Delta A^*$	16	nd
$\Delta B$	8	12
$\Delta C$	11	20
$\Delta BC$	7	6 <sup>1</sup>

Pozn. nd – nenaměřená hodnota; <sup>1</sup> Pro komplementace  $\Delta BC + B$  i  $\Delta BC + C$  byla naměřena stejná zóna

Kultura pro produkci linkomycinu byla zaočkována po vysporulování testovaných kmenů WT,  $\Delta A^*$ ,  $\Delta B$ ,  $\Delta C$ ,  $\Delta BC$  a jejich komplementací na MS agaru, a dále kultivována dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1.4. V získaném mediu Mgr. Zdeněk Kameník, Ph.D. stanovil pomocí UHPLC produkci linkomycinu A a linkomycinu B. V tabulce 26 jsou uvedeny získané semikvantitativní výsledky vztažené k *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (WT). V případě kmene  $\Delta A^*$  bylo testování produkce provedeno třikrát z důvodu potvrzení neočekávané produkce linkomycinu A i B. Z uvedených výsledků vyplývá, že delece rezistenčních genů *lmr(A)* a *lmr(C)* výrazně neovlivňuje produkci linkomycinu A. Výjimkou jsou mutanty genu *lmr(B)*, u kterých byla produkce výrazně snížena a zůstávala nízká i po komplementaci *lmr(B)* mutace. Získané výsledky jsou v souladu s naměřenými inhibičními zónami. Drobný rozdíl v případě delecí *lmr(A)* a *lmr(C)* lze přisuzovat změně kultivačních podmínek. V tomto případě v porovnání tekutého a pevného media. Zbylé deleční mutanty a jejich komplementace nebyly prozatím testovány.

**Tabulka 26: Testování produkce linkomycinu**

Kmeny	LIN A	LIN B	Komplementace	
			LIN A	LIN B
WT	+++	+++	X	X
$\Delta A^*$	+++	++	+++	++
$\Delta B$	+	-	+	-
$\Delta C$	+++	+++	+++	+++
$\Delta BC$	++	-	++	-

Pozn. +++ srovnatelná hodnota produkce; ++ nižší hodnota produkce; + silně redukovaná produkce; – nedetekováno.

### 4.3.2. Stanovení citlivosti k linkosamidovým antibiotikům

Z testování citlivostí připravených jednoduchých a dvojitých mutant a jejich komplementací lze získat informaci o příspěvku každého z genů k celkové hladině rezistence. Testovanými antibiotiky byl linkomycin (LIN), jeho semisyntetický derivát klindamycin (CLI) a makrolid erytromycin (ERY).

Příprava testovacích misek i inokula probíhala dle kapitoly 3.2.9. Testování bylo pro většinu kmenů provedeno celkem šestkrát. Protože opakovaně docházelo u některých kmenů ke kolísání hodnot (Tab. 27) byly pro souhrnnou analýzu (Tab. 28) použity hodnoty MIC získané pouze během posledního testování, kdy byly najednou otestovány všechny připravené mutanty a jejich komplementované kmeny. To umožnilo vzájemné porovnání všech kmenů za stejných podmínek. Hodnoty MIC pro ERY se u většiny testovaných kmenů výrazně nelišily ( $MIC_{ERY} = 32 - 64 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tabulka 27: Interval naměřených hodnot MIC pro jednotlivé kmeny**

Kmen	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
	LIN	CLI	ERY
WT + pIJ <sup>1</sup>	16384 – 32768	64 – 256	64
jA11 <sub>O</sub> + pMS81	8192	64	64
$\Delta A^*$	16	16 – 128	32 – 64
$\Delta A^* + A$	2048 – 8192	16 – 128	32 – 64
$\Delta B + pMS81$	8192	8 – 16	32
$\Delta B + B$	4096 – 8192	8 – 16	32
$\Delta C + pIJ^1$	8192	256	64
$\Delta C + C$	8192 – 16384	256 – 1024	64
$\Delta BC + pMS81$	4096	4	64
$\Delta BC + B$	2048 – 4096	2 – 4	32 – 64
$\Delta BC + C$	2048 – 4096	4 – 16	32
$\Delta AC + pMS81$	16384 – >32768	512	64
$\Delta AC + A$	>16384 – >32768	512	64
$\Delta AC + C$	16384 – 32768	512	64

Pozn. <sup>1</sup> Příprava těchto kmenů je popsána v kapitole 4.4.2.

**Tabulka 28: Porovnání stanovených MIC hodnot**

Kmen	Plazmid	Přítomné geny	MIC [µg/ml]		
			LIN	CLI	ERY
WT + pIJ <sup>1</sup>	pIJ10257	<i>lmr(A); lmr(B); lmr(C)</i>	16384	64	64
jA11 <sub>0</sub> + pMS81	pMS81	<i>lmr(A); lmr(B); lmr(C)</i>	8192	64	64
ΔA*	-	<i>lmr(B); lmr(C)</i>	16	16	32
ΔA* + A	pMS81: <i>lmr(A)</i> 5	<i>lmr(B); lmr(C); plmr(A)</i> <sup>2</sup>	2048	16	64
ΔB + pMS81	pMS81	<i>lmr(A); lmr(C)</i>	8192	16	32
ΔB + B	pMS81: <i>lmr(B)</i> 6	<i>lmr(A); lmr(C); plmr(B)</i>	4096	16	32
ΔC + pIJ <sup>1</sup>	pIJ10257	<i>lmr(A); lmr(B)</i>	8192	256	64
ΔC + C	pMS81: <i>lmr(C)</i> 10	<i>lmr(A); lmr(B); plmr(C)</i>	16384	256	64
ΔBC + pMS81	pMS81	<i>lmr(A)</i>	4096	4	64
ΔBC + B	pMS81: <i>lmr(B)</i> 6	<i>lmr(A); plmr(B)</i>	2048	4	64
ΔBC + C	pMS81: <i>lmr(C)</i> 10	<i>lmr(A); plmr(C)</i>	2048	16	32
ΔAC + pMS81	pMS81	<i>lmr(B)</i>	16384	512	64
ΔAC + A	pMS81: <i>lmr(A)</i> 5	<i>lmr(B); plmr(A)</i>	>16384	512	64
ΔAC + C	pMS81: <i>lmr(C)</i> 10	<i>lmr(B); plmr(C)</i>	16384	512	64

Pozn. <sup>1</sup> Příprava těchto kmenů je popsána v kapitole 4.4.2., <sup>2</sup> gen nesený uvedeným plazmidem

Při porovnání mutanty ΔA\* (delece *lmr(A)*) a příslušné komplementace (kmeny jA11<sub>0</sub> + pMS81 a ΔA\* + A v tabulce 28) lze vypočítat určité trendy. Delece *lmr(A)* měla za následek výrazné snížení rezistence k linkomycinu, a to jak v porovnání s WT + pIJ (z 16384 µg/ml na 16 µg/ml), tak i se svým mateřským kmenem jA11<sub>0</sub> + pMS81 (z 8192 µg/ml na 16 µg/ml). Nižší hodnoty MIC pro linkomycin byly naměřeny konzistentně u všech šesti měření. Komplementace *lmr(A)* mutace plazmidem pMS81:*lmr(A)* 5 zvýšila rezistenci k linkomycinu avšak hodnoty nedosahovaly hodnot mateřského kmene (2048 µg/ml). Rezistence ke klindamycinu se sice u mutanty ΔA\* také snížila (z 64 na 16 µg/ml), ale komplementací nedošlo k jejímu zvýšení.

Dále jsme porovnávali mutantu ΔC+pIJ (delece *lmr(C)*) a její komplementaci (ΔC+C v tabulce 28). Delece genu *lmr(C)* měla za následek jen minimální snížení rezistence k linkomycinu v porovnání s WT + pIJ (ze 16384 na 8192 µg/ml). Komplementace vrátila úroveň rezistence k linkomycinu na úroveň kmene WT + pIJ s prázdným plazmidem. Překvapením však bylo, že delece genu *lmr(C)* měla za následek zvýšení rezistence ke klindamycinu (z 64 na 256 µg/ml). Vložení plazmidu pMS81:*lmr(C)* 10 však nedošlo k opětovnému snížení rezistence na úroveň WT+pIJ.

U mutanty s deletovaným genem *lmr(B)* (kmen ΔB + pMS81) došlo stejně jako v případě delece *lmr(C)* k mírnému snížení rezistence k linkomycinu (snížení MIC z 16384 µg/ml na 8192 µg/ml) a ke snížení rezistence ke klindamycinu (snížení MIC z 64 µg/ml na 16 µg/ml). Avšak plazmid pMS81:*lmr(B)* 6 ani jeden z pozorovaných fenotypů nekomplementoval (kmen ΔB + B v tabulce 28). Dokonce v případě linkomycinu došlo naopak ještě k dalšímu snížení rezistence (snížení MIC z 8192 µg/ml na 4096 µg/ml).

U mutanty s dvojitou delecí genů *lmr(B)* a *lmr(C)* a komplementovaných kmenů jsme porovnávali získané hodnoty MIC s příslušnými jednoduchými mutanty (kmeny ΔBC + pMS81, ΔB + pMS81, ΔC+pIJ, ΔBC + B a ΔBC + C v tabulce 29). U kmene ΔBC s dvojitou delecí genů *lmr(B)* a *lmr(C)* lze pozorovat značné zvýšení citlivosti k oběma linkosamidům (snížení MIC z 16384 µg/ml na 4096 µg/ml

pro LIN a z 64 µg/ml na 4 µg/ml pro CLI). Plazmid pMS81:*lmr(C)* 10 komplementoval pouze rezistenci ke klindamycinu (zvýšení MIC ze 4 na 16 µg/ml), citlivost k LIN se, podobně jako u komplementace mutanty ΔB, ještě o jedno ředění zvýšila. Komplementace ΔBC plazmidem pMS81:*lmr(B)* 6 byla podobná jako v případě komplementace jednoduché mutanty ΔB. Došlo tedy k dalšímu snížení citlivosti k linkomycinu a k žádné změně citlivosti ke klindamycinu.

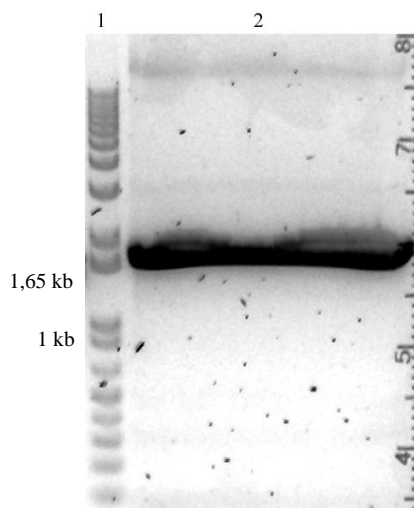
U dvojité mutanty ΔAC + pMS81 (delece genů *lmr(A)* a *lmr(C)*) se nezměnila citlivost k linkomycinu, avšak překvapivě došlo ke zvýšení MIC ke klindamycinu z 64 µg/ml na 512 µg/ml. Komplementace této dvojité mutanty ani jedním plazmidem (ΔAC + A a ΔAC + C) neovlivnila výsledný rezistenční fenotyp – hodnoty MIC pro LIN i CLI byly pro všechny kmeny totožné s výjimkou kmene ΔAC + A, u kterého MIC pro linkomycin byla vyšší, než nejvyšší testovaná koncentrace (>16384 µg/ml).

#### **4.4. Vliv konstitutivní exprese genu *lmr(C)* na úroveň rezistence u *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 a *Streptomyces coelicolor***

Příprava konstruktů pro konstitutivní expresi genu *lmr(C)* měla několik opodstatnění. Lze předpokládat, že z důvodu regulace exprese genů uvnitř biosyntetických genových klastrů bude také gen *lmr(C)* s vlastním promotorem exprimován ve spojitosti s biosyntézou linkomycinu, nebo přinejmenším v přítomnosti induktoru. I když tuto domněnku nemáme experimentálně ověřenou, platí to např. pro *ole(B)* ze *Streptomyces antibioticus* (Olano, C. et al., 1995). Nás zajímalo, jak se rezistenční fenotyp změní, bude-li gen *lmr(C)* exprimován nezávisle na expresi ostatních genů z klastru. Komplementace delečních mutant konstruktů konstitutivně exprimující příslušné geny *lmr(C)*, *lmr(A)* a *lmr(B)* by částečně mohla vyřešit problémy s neúspěšnou komplementací některých mutant plazmidů exprimujícími geny z vlastních promotorů, u kterých nelze s jistotou říct, do jaké míry jsou funkční mimo genetický kontext biosyntetického klastru. Navíc lze stejné konstruktů využít pro pozorování vlivu konstitutivní exprese genů na změnu rezistence k linkomycinu, klindamycinu a erytromycinu u heterologního hostitele *Streptomyces coelicolor* M1154. Pro přípravu konstruktů byl zvolen vektor pIJ10257 obsahující silný konstitutivní promotor *ermE*\*. Do dnešní doby se podařilo připravit pouze vektor s vloženým genem *lmr(C)*. Na zbylých dvou konstruktech se pracuje.

##### **4.4.1. Příprava konstruktů pro konstitutivní expresi genu *lmr(C)***

Gen *lmr(C)* byl amplifikován pomocí PCR (kap. 3.2.4.5.) s využitím primerů LmrCRevPIJ10257 a LmrCForPIJ10257, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 7. Díky těmto oligonukleotidům došlo k amplifikaci genu spolu s restričními místy pro inzerci genu do plazmidu pIJ10257 za *ermE*\* promotor. Restriční místa byla umístěna 4 nukleotidy od konců oligonukleotidů pro lepší účinnost štěpení. Složení reakční směsi i podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.2.4.5. Jako templát byl využit kosmid LK6 (740 ng/µl). Pro oddělení PCR produktu od templátu byla využita DNA elektroforéza (Obr. 27), následována přečištěním vyříznutého fragmentu o velikosti 1670 bp (kap. 3.2.4.2.). Koncentrace přečištěného PCR produktu byla stanovena pomocí DS-11 spektrofotometru (DeNovix).



Vysvětlivky:

1 – Standart molekulové hmotnosti

2 – PCR amplifikace genu *lmr(C)*

Pro rozdělení reakční směsi byl použit 1% agarosový gel.

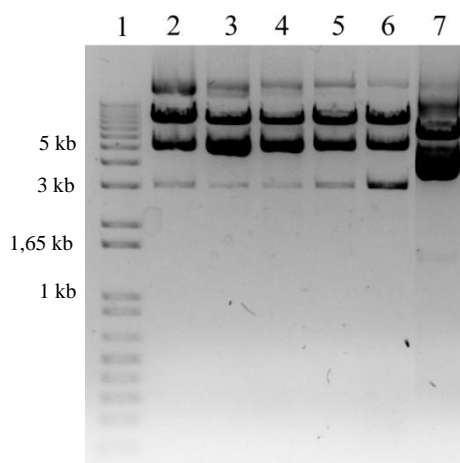
**Obrázek 27: DNA elektroforéza PCR amplifikace genu *lmr(C)* před jeho vyříznutím**

Pro linearizaci plazmidu pIJ10257 i opracování konců PCR produktu byly zvoleny stejné restrikční endonukleasy. Nejdříve byl použit enzym *NdeI*, který byl následně tepelně inaktivován (kap. 3.2.4.6). Linearizovaný plazmid byl vyříznut z agarosového gelu, pro oddělení linearizované formy od cirkulární, a přečištěn (kap. 3.2.4.2.). Následovalo štěpení pomocí *HindIII* - HF a inaktivace enzymu (kap. 3.2.4.6). Inzert i plazmid byly opět po vyříznutí z gelu přečištěny. V získaných vzorcích byla spektrofotometrem DS-11 (DeNovix) změřena koncentrace DNA. Ligační směs pro vložení genu *lmr(C)* do vektoru pIJ10257 byla připravena dle kapitoly 3.2.4.9. s využitím T4 DNA ligasy (NEB). Jako negativní kontrola byla použita reakce, ve které bylo místo inzertu přidáno adekvátní množství sterilní destilované vody. Samotná reakce probíhala 16 hodin při teplotě 16 °C. Následně byla ligační směs natransformována tepelným šokem (kap. 3.2.2.2.) do kompetentních buněk *Escherichia coli* XL-1 Blue. Selektce transformantů probíhala přes noc při 37 °C na LB agaru s hygromycinem (100 µg/ml). Ze získaných kolonií bylo vybráno pět, ze kterých byla vyizolována plazmidová DNA a pomocí restrikční analýzy ověřeno, zda získané plazmidy obsahují vložený gen *lmr(C)*. Předpokládané velikosti fragmentů jsou uvedeny v tabulce 29 a samotný výsledek restrikční analýzy na obrázku 28. I když testované plazmidy nejsou, jak je patrné na obrázku, zcela rozštěpeny, lze předpokládat, že všechny testované vektory nesou vložený gen *lmr(C)*. Z těchto ověřených plazmidů byly vybrány dva (pIJ10257:*lmr(C)* 1, pIJ10257:*lmr(C)* 5), které byly odeslány na sekvenaci pro ověření, že při amplifikaci genu *lmr(C)* pomocí PCR nedošlo k mutacím, které by mohly ovlivňovat jeho funkci. Sekvence použitých sekvenačních primerů jsou uvedeny v tabulce 7. Správnost sekvence byla analyzována v počítačovém programu CLC Main Workbench 6.8.1.

Ověřené plazmidy pIJ10257:*lmr(C)* 1, pIJ10257:*lmr(C)* 5 byly pro další použití namnoženy využitím komerčně dostupného kitu NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel). Takto jsme získali zásobní roztoky sekvenačně a restrikčně ověřených plazmidů, nesoucí nemutovaný gen *lmr(C)* o vyšší koncentraci DNA. Dále byl využíván plazmid pIJ10257:*lmr(C)* 5.

Tabulka 29: Očekávané velikosti restrikčních fragmentů konstruktů pIJ10275:*lmr(C)*

Konstrukty	Restrikční endonukleasa	Očekávané velikosti fragmentů [bp]
pIJ10257: <i>lmr(C)</i>	XbaI	2968; 5319
pIJ10257	XbaI	1361; 5319



Vysvětlivky:

- 1 – Standart molekulové hmotnosti
- 2 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* 1
- 3 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* 2
- 4 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* 3
- 5 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* 4
- 6 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* 5
- 7 – Negativní kontrola pIJ10257

Pro rozdělení reakční směsi byl použit 1% agarosový gel.

Obrázek 28: Restrikční analýza - enzym XbaI

#### 4.4.2. Stanovení citlivosti k linkosamidovým antibiotikům u mutant *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 při konstitutivní expresi *lmr(C)*

Připravený konstrukt pro konstitutivní expresi genu *lmr(C)* (pIJ10257:*lmr(C)* 5) a prázdný vektor pIJ10257 byly pomocí mezidruhové konjugace (kapitola 3.2.3.) vneseny do připravených delečních mutant a divokého kmene (*Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (WT)). Seznam kmenů je uveden v tabulce 30.

Tabulka 30: Seznam připravených kmenů

Označení	Komplementační plazmid	Mateřský kmen
$\Delta C$ + CpIJ	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	$\Delta C$
$\Delta C$ + pIJ	pIJ10257	$\Delta C$
$\Delta AC$ + CpIJ	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	$\Delta AC$
$\Delta AC$ + pIJ	pIJ10257	$\Delta AC$
$\Delta BC$ + CpIJ	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	$\Delta BC$
WT + CpIJ	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	WT
WT + pIJ	pIJ10257	WT

Testování citlivosti probíhalo opět dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.9. Uvedené hodnoty MIC (Tab. 31) jsou ze stejného měření, jako výsledky uvedené v předchozí kapitole. Pro kmeny  $\Delta C + pIJ$ ,  $\Delta C + CpIJ$  a  $\Delta BC + pIJ$  se jedná o jedno stanovení hodnot MIC. V případě kmenů  $\Delta AC + CpIJ$ ,  $\Delta AC + pIJ$  byla provedena dvě nezávislá měření.

Konstitutivní exprese genu *lmr(C)* měla téměř ve všech případech za následek zvýšení rezistence ke CLI. Výjimkou je konstitutivní exprese *lmr(C)* v divokém kmeni (WT + CpIJ), kdy naopak došlo ke snížení rezistence jak k linkomycinu (z 16384  $\mu\text{g/ml}$  na 8192  $\mu\text{g/ml}$ ), tak i ke klindamycinu a erytromycinu (z 64  $\mu\text{g/ml}$  na 32  $\mu\text{g/ml}$ ). Druhou výjimkou je dvojitá mutanta  $\Delta AC$ , u které konstitutivní exprese *lmr(C)* neměla žádný vliv na úroveň rezistence. Naopak nejvýrazněji ovlivnila konstitutivní exprese *lmr(C)* rezistenci ve dvojitě mutantě  $\Delta BC$  ( $\Delta BC + CpIJ$ ). V tomto případě došlo k zvýšení rezistence pro oba linkosamidy, přičemž výsledný kmen má velmi podobné citlivosti, jako jednoduchá deleční mutanta s prázdným plazmidem  $\Delta B + pMS81$  (tabulky 28 a 31). V tomto případě tedy došlo k úspěšné komplementaci pro oba linkosamidy na rozdíl od komplementace plazmidem *pMS81:lmr(C)* 10.

**Tabulka 31: Stanovené MIC pro konstitutivní produkci genu *lmr(C)***

Kmen	Plazmid	Přítomné geny	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
			LIN	CLI	ERY
WT+pIJ	pIJ10257	<i>lmr(A); lmr(B); lmr(C)</i>	16384	64	64
WT + CpIJ	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	<i>lmr(A); lmr(B); lmr(C); plmr(C)</i> <sup>1</sup>	8192	32	32
$\Delta C + pIJ$	pIJ10257	<i>lmr(A); lmr(B)</i>	16384	256	64
$\Delta C + CpIJ$	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	<i>lmr(A); lmr(B); plmr(C)</i>	16384	512	64
$\Delta AC + pIJ$	pIJ10257	<i>lmr(B)</i>	16384	512	64
$\Delta AC + CpIJ$	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	<i>lmr(B); plmr(C)</i>	16384	512	64
$\Delta BC + pMS81$	pMS81	<i>lmr(A)</i>	4096	4	64
$\Delta BC + CpIJ$	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	<i>lmr(A); plmr(C)</i>	8192	32	64

Pozn. <sup>1</sup> gen nesený uvedeným plazminem

#### 4.4.3. Exprese genu *lmr(C)* v *Streptomyces coelicolor* M1154

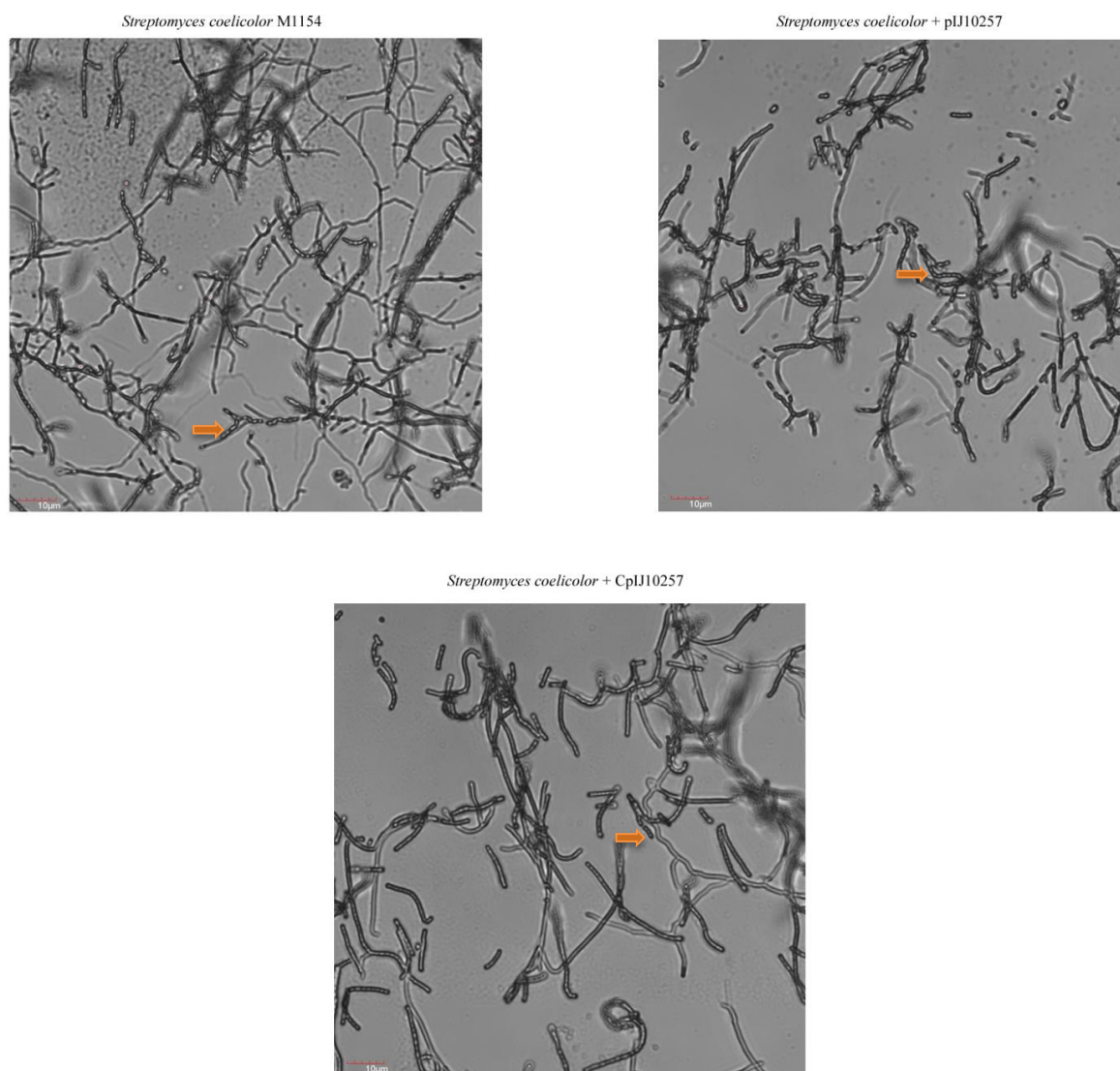
Pro zjištění vlivu genu *lmr(C)* na úroveň rezistence v heterologním hostiteli byl konstrukt pIJ10257:*lmr(C)* 5 vnesen pomocí mezidruhovému konjugace (kap. 3.2.3.) do *Streptomyces coelicolor* M1154. Takto získaný kmen byl označen jako *Streptomyces coelicolor* + CpIJ10257. Výhodou kmene *Streptomyces coelicolor* M1154 oproti mateřskému kmeni *Streptomyces coelicolor* M145 je jeho nízká rezistence vůči antibiotikům (Tab. 33). Exprese genu *lmr(C)* v heterologním hostiteli umožňuje sledování rezistenčního fenotypu udíleného samotným *lmr(C)* bez vlivu ostatních genů biosyntetického klastru. Kmen *Streptomyces coelicolor* + CpIJ10257 by nám mohl, alespoň částečně suplovat prozatím nezískanou deleční mutantu  $\Delta AB$ , ve které je přítomen pouze gen *lmr(C)*. Další výhodou je, že *Streptomyces coelicolor* M1154 neprodukuje linkomycin, který pravděpodobně interferuje s měřením.

Abychom ověřili, že případný pozorovaný fenotyp nezpůsobuje konstrukt jen svým vložením do chromozomu recipientního kmene, byl do *Streptomyces coelicolor* M1154 konjugován také prázdný vektor pIJ10257. Získaný kmen byl označen jako *Streptomyces coelicolor* + pIJ10257.

Pro potvrzení transkonjugant byly vybrané kolonie přeočkovány na čerstvý MS agar s hygromycinem (40 µg/ml). Po následné inkubaci při 30 °C po dobu 5 dnů byly z narostlých kolonií zaočkovány nové misky pro přípravu zásobních spor. MS agar opět obsahoval selekční antibiotikum. Sporulace u *Streptomyces coelicolor* M1154 je sice oproti divokému kmeni *Streptomyces coelicolor* M145 opožděná, ale i tak bylo možné opticky, díky produkci šedého sporového pigmentu určit, kdy ke sporulaci došlo. Ze zaočkovaných misek s transkonjuganty se ovšem zásobní spory připravit nepodařilo, neboť ani po 10 dnech nedošlo k produkci sporulačního pigmentu, díky kterému by bylo možné rozpoznat sporulaci. Suspenze spor nebyla získána ani opakovaním kultivace. Problém se získáním spor těchto kmenů byl přechodně vyřešen tím, že namísto spor bylo pomocí vysterilizované kličky sklizeno vzdušné mycelium, které bylo uchováváno v 2x YT mediu obsahující 20% glycerol.

Fakt, že se nepodařilo získat spory *Streptomyces coelicolor* M1154 nesoucí plazmid pIJ10257 a to buď prázdný, nebo obsahující gen *lmr(C)*, znemožňovalo stanovení MIC stejným způsobem jako u *Streptomyces lincolnensis*, tedy očkováním sporové suspenze. Pro ověření, že testované kmeny opravdu nesporulují, bylo využito mikroskopické inspekce růstu mycelia na agaru. Příprava vzorků probíhala dle kapitoly 3.2.7. Snímky mycelia (Obr. 29) byly pořízeny RNDr. Janem Svobodou, Ph.D. na mikroskopu Olympus FV1000 TIRF v MBÚ AV ČR, v. v. i. Snímky byly pořízeny pátý den růstu a je na nich patrné, že ke sporulaci dochází u všech testovaných kmenů. Dokonce spory na MS agaru již po pěti dnech vykazovaly i opticky slabě šedivou barvu indikující sporulaci. Pravděpodobným důvodem, který zapříčinil problém se sporulací, byla přítomnost selekčního antibiotika hygromycinu v miskách použitých pro přípravu zásobních spor, neboť při přípravě vzorků pro mikroskopování nebyl do agaru přidán.





**Obrázek 29: Mikroskopické snímky kmenů *Streptomyces coelicolor*** – Oranžové šipky ukazují na řetízky spor. Snímky byly pořízeny při zvětšení 200x. V levém dolním rohu je uvedeno pomocné měřítko.

Kvůli počátečním problémům se sporulací jsme z časových důvodů provedli stanovení citlivosti testovaných kmenů zaočkováním spor smytých přímo z čerstvě vysporulované misky. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 32. Postup stanovení MIC byl stejný jako u *Streptomyces lincolnensis* a probíhal podle kapitoly 3.2.9.

Konstitutivní exprese genu *lmr(C)* v *Streptomyces coelicolor* M1154 měla za následek zvýšení rezistence k oběma linkosamidům (Tab. 32). Pro porovnání byl také otestován divoký kmen *Streptomyces coelicolor* M145, ze kterého byl připraven kmen M1154. Jak je patrné z tabulky 32, M1154 vykazuje výrazné snížení rezistence oproti M145.

**Tabulka 32: Stanovení MIC u *Streptomyces coelicolor***

Kmen	Plazmid	MIC [µg/ml]		
		LIN	CLI	ERY
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	-	16	32	32
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154	-	< 8	<2	16
<i>Streptomyces coelicolor</i> + pIJ10257	pIJ10257	< 8	<2	16
<i>Streptomyces coelicolor</i> + CpIJ10257	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	32	32	16

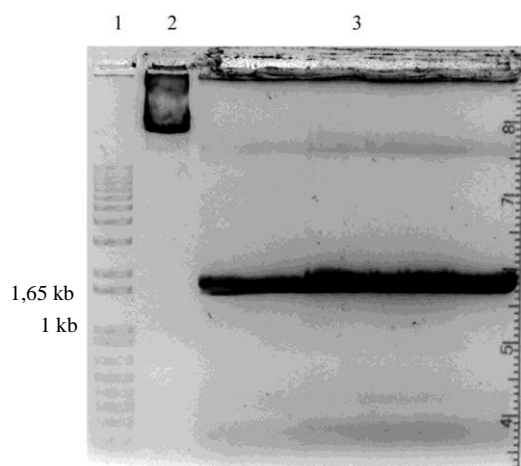
## 4.5. Určení lokalizace proteinu Lmr(C) pomocí imunodetekce

Mechanismus, kterým proteiny patřící do podrodiny ARE proteinů udílejí rezistenci k antibiotikům, je prozatím neznámý. Jedním z faktorů, který naznačuje, že by se proteiny mohly účastnit transportu, je fakt, že proteiny Ole(B) (Olano, C. et al., 1995), Vga(A) (Chesneau, O. et al., 2005) a Msr(A) (Vimberg V., nepublikovaná data) jsou asociované s membránou. Proto nás zajímalo, jaká je buněčná lokalizace proteinu Lmr(C).

Připravili jsme konstrukt exprimující fúzní protein Lmr(C) s histidinovou kotvou na jeho C konci (Lmr(C) - 6His), která je tvořena šesti za sebou jdoucími histidiny. Histidinová kotva umožňuje detekci proteinu použitím komerčně dostupných anti-6His protilátek specifických pro histidinovou kotvu. Pro vnesení genu do *Streptomyces lincolnensis* jsme zvolili plazmid pIJ10257, kvůli jeho konstitutivnímu promotoru *ermE*\*. Pro potvrzení, že přidaná kotva neovlivňuje funkci proteinu, jsme porovnali citlivost *Streptomyces lincolnensis* nesoucí plazmid pIJ10257:*lmr(C)* 5 s jeho variantou obsahující histidinovou kotvu.

### 4.5.1. Příprava konstruktů pro konstitutivní expresi proteinu Lmr(C) značeného histidinovou kotvou

Příprava plazmidu pIJ10257 s vloženým genem *lmr(C)*, ke kterému byla přidána histidinová kotva, je identická s výše popsaným postupem k získání jeho nehistagované varianty (kapitola 4.4.1). Gen *lmr(C)* byl v tomto případě amplifikován pomocí PCR s využitím primeru LmrCRevPIJ10257 a primeru LmrCForPIJ10257HisTag, pomocí kterého došlo k umístění histidinové kotvy před stop kodón. Sekvence použitých oligonukleotidů jsou uvedeny v tabulce 7. Vzniklý PCR produkt byl dlouhý 1688 bp (Obr. 30)



Vysvětlivky:

1 – Standart molekulové hmotnosti

2 – LK6

3 – PCR amplifikace genu *lmr(C)* s přídáním histidinovou kotvou

Pro rozdělení reakční směsi byl použit 1% agarosový gel.

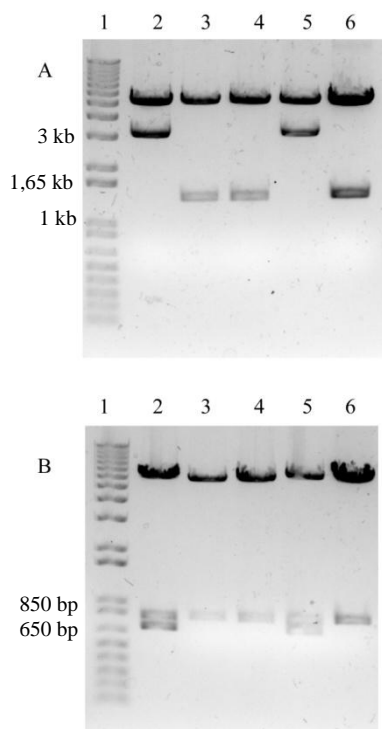
**Obrázek 30: DNA elektroforéza před vyříznutím genu *lmr(C)* 6His**

Pomocí restrikční analýzy bylo ověřeno, zda vyizolované plazmidy obsahují vložený gen *lmr(C)*. Předpokládané velikosti fragmentů jsou uvedeny v tabulce 33 a samotný výsledek restrikční analýzy na obrázku 31. Ze čtyř testovaných plazmidů byly potvrzeny jen dva, pIJ10257:*lmr(C)* His 1 a 5. Ty byly dále poslány na sekvenaci pro ověření, že při amplifikaci genu *lmr(C)* nedošlo k žádné mutaci a že gen opravdu obsahuje histidinovou kotvu. Sekvence použitých oligonukleotidů jsou uvedeny v tabulce 8. Správnost sekvence byla analyzována pomocí počítačového programu CLC Main Workbench 6.8.1.

Takto byly celkem získány dva restrikčně a sekvenačně ověřené plazmidy nesoucí gen *lmr(C)* obsahující histidinovou kotvu (pIJ10257:*lmr(C)* His 1 a 5). K dalším experimentům byl využíván plazmid pIJ10257:*lmr(C)* His 1.

**Tabulka 33: Očekávané výsledky restrikční analýzy**

Konstrukty	Restrikční endonukleasa	Očekávané velikosti fragmentů [bp]
pIJ10257: <i>lmr(C)</i> His	XbaI	2986; 5319
pIJ10257	XbaI	1361; 5319
pIJ10257: <i>lmr(C)</i> His	PstI	670; 686; 806; 5874
pIJ10257	PstI	806; 5874



Vysvětlivky:

- 1 – Standart molekulové hmotnosti
- 2 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* His 1
- 3 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* His 3
- 4 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* His 4
- 5 – Testovaný pIJ10257:*lmr(C)* His 5
- 6 – Negativní kontrola pIJ10257

Pro rozdělení reakční směsi byl použit 1% agarosový gel.

**Obrázek 31: Restrikční analýza pro ověření ligace genu *lmr(C)*.** A - Restrikce testovaných konstruktů enzymem XbaI; B - Restrikce testovaných konstruktů enzymem PstI.

## 4.5.2. Western blot a imunodetekce proteinu Lmr(C) – 6His

### 4.5.2.1. Příprava a ověření testovaných kmenů

Připravený plazmid pIJ10257:*lmr(C)* His 1 byl nejprve pomocí elektroporace vnesen do buněk *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002. Transformanty byly selektovány na LB agar s hygromycinem (100 µg/ml) při 37 °C přes noc. Následně byl gen vnesen pomocí mezidruhové konjugace (kap. 3.2.3.) do divokého kmene *Streptomyces lincolnensis* a deleční mutanty ΔC. Selektce probíhala na MS agaru obsahující hygromycin (40 µg/ml) a nalidixovou kyselinu (25 µg/ml) při teplotě 30 °C po dobu 5 dnů. Po ověření rezistence k hygromycinu pomocí přečárkování několika kolonií byly vybrány dvě, ze kterých byly připraveny zásobní suspenze spor, které byly využívány v další práci. Seznam připravených kmenů je uveden v tabulce 34.

**Tabulka 34: Seznam připravených kmenů**

Označení	Komplementační plazmid	Mateřský kmen
ΔC + CpIJ His	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 1 His	ΔC
WT + CpIJ His	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 1 His	WT

Pro ověření, že histidinová kotva závažněji neovlivňuje funkci proteinu Lmr(C), byly porovnány hodnoty minimálních inhibičních koncentrací antibiotik u kmene ΔC + CpIJ His s fúzním proteinem a u

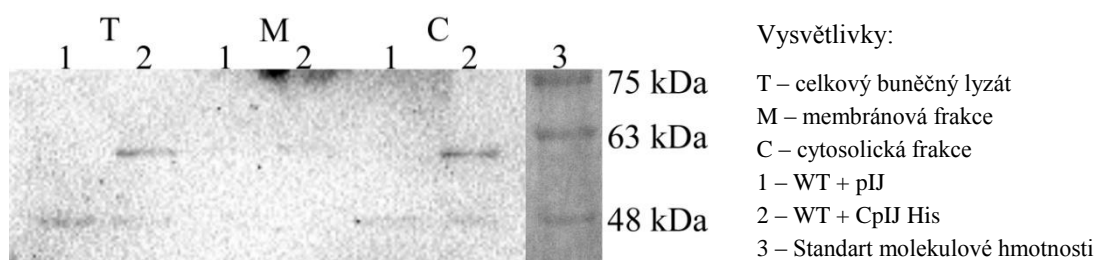
$\Delta C$  + CpIJ (Tab. 35). Značený protein Lmr(C) – 6His udílí nižší hladinu rezistence ke všem třem testovaným antibiotikům, ale jedná se o pokles jen o jedno ředění, což může být způsobeno pouze nepřesností měření. Pro otestování funkčnosti proteinu Lmr(C) – 6His v porovnání s Lmr(C) jsme nevybrali vhodného hostitele, neboť  $\Delta C$  + CpIJ nemá výrazný fenotyp v porovnání k  $\Delta C$  + pIJ. Z tohoto důvodu je těžké posoudit, zda má histidinová kotva vliv na funkci proteinu Lmr(C). I přes to jsme se rozhodli určit jeho buněčnou lokalizaci s tím, že testování provedeme dodatečně, a to ve *Streptomyces coelicolor* M1154.

**Tabulka 35: Stanovené minimální inhibiční koncentrace pro značený protein Lmr(C)**

Označení	Plazmid	Vložený gen	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
			LIN	CLI	ERY
$\Delta C$ + pIJ	pIJ10257	-	16384	256	64
$\Delta C$ + CpIJ	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> 5	<i>lmr(C)</i>	16384	512	64
$\Delta C$ + CpIJ His	pIJ10257: <i>lmr(C)</i> His 1	<i>lmr(C)</i> His	8192	256	32

#### 4.5.2.2. Určení lokalizace proteinu Lmr(C)

Zda je značený protein Lmr(C) - 6His asociovaný s membránou, bylo testováno prokázáním jeho přítomnosti v buněčných frakcích separovaných centrifugací. Fúzní protein Lmr(C) - 6His byl detekován pomocí dvoukrokové imunodetekce s použitím Anti-His protilátky (kap 3.2.6.4.). Pro testování byly využity zásobní spory (WT + pIJ a WT + CpIJ His), které byly vystaveny 50 °C po dobu 10 minut kvůli indukci klíčení a přeneseny do 50 ml YEME produkčního, kde rostly při 30 °C, 220 RPM. Po 24 hodinách byla narostlá buněčná suspenze rozdělena po 15 ml pro přípravu vzorků určených k analýze (kap. 3.2.6.1.). Kmen WT + pIJ byl využit jako kontrola. Velikost proteinu Lmr(C) s histidinovou kotvou byla stanovena pomocí programu CLC Main Workbench 6.8.1. na 60,38 kDa. Na PVDF membráně byl protein následně detekován o předpokládané velikosti (Obr. 32). Přes nižší kvalitu obrázku 32 je vidět, že protein se v největším množství nachází v cytosolické frakci. Slabší signál se nalézá také ve frakci membránové. V negativní kontrole byl detekován signál, ale o jiné velikosti (cca 48 kDa) než protein Lmr(C), který se navíc nalézá také v testovaném vzorku. V tomto případě se pravděpodobně jedná o nespecificky navázanou protilátku.



**Obrázek 32: Lokalizace proteinu Lmr(C) ve *Streptomyces lincolnensis* - imunoblot**

## 5. Diskuze

V lékařské praxi působí velké problémy bakteriální kmeny nesoucí ve své genetické výbavě rezistenční geny, které způsobují, že antibiotická léčba selže. ARE proteiny se mimo producentů antibiotik vyskytují také u problematických lidských patogenů jakým je např. *Staphylococcus aureus*. Proto je důležité objasnit mechanismus, kterým udílejí rezistenci, a co nejlépe je charakterizovat. Nejlépe popsánymi zástupci této rodiny jsou proteiny Vga(A) a Msr(A) udílející rezistenci u zástupců rodu *Staphylococcus*. Protein Lmr(C) není zatím sice příliš dobře charakterizován, ale jeho studium by mohlo přispět k objasnění funkce celé rodiny ARE proteinů.

Rezistence udílená genem *lmr(C)* byla zkoumána u heterologních hostitelů *Streptomyces lividans* TK23 (Peschke, U. et al., 1995) a *Lactococcus lactis* (Dorrian, J. M. et al., 2011). Ani jeden z výše uvedených mikroorganismů není ideálním hostitelem umožňujícím pozorovat rezistenční fenotyp v geneticky příbuzném a zároveň citlivém hostiteli. V této diplomové práci jsme za heterologního hostitele vybrali kmen *Streptomyces coelicolor* M1154, jenž byl připraven z divokého kmene *Streptomyces coelicolor* M145 delecí čtyř biosyntetických genových klastrů a inaktivací genů *rpoB* a *rpsL*. Účelem těchto modifikací bylo připravit tzv. super hostitele pro heterologní produkci sekundárních metabolitů (Gomez-Escribano J. P. et al., 2011). V této diplomové práci jsme zjistili, že citlivost k antibiotikům u *Streptomyces coelicolor* M1154 je výrazně snížena v porovnání s divokým kmenem *Streptomyces coelicolor* M145, což jej činí ideálním kmenem nejen pro vkládání biosyntetických klastrů, ale i pro studium fenotypu rezistenčních genů. Vnesení genu *lmr(C)* do *Streptomyces coelicolor* M1154 vedlo ke zvýšení rezistence k linkomycinu z původních < 8 µg/ml na 32 µg/ml (nejméně 8 krát). To je v souladu se zvýšením rezistence k linkomycinu u *Streptomyces lividans* TK23 (z 63 µg/ml na 500 µg/ml) (Peschke, U. et al., 1995). V případě klindamycinu došlo k zvýšení rezistence z < 2 µg/ml na 32 µg/ml (nejméně 32 krát). U *Lactococcus lactis* nebyla citlivost k linkosamidům testována. Testována byla pouze citlivost k makrolidovému antibiotiku tylosinu, která se vlivem exprese *lmr(C)* snížila trojnásobně (Dorrian, J. M. et al., 2011). My jsme však žádné zvýšení rezistence k makrolidům (erytromycinu) u kmene *Streptomyces coelicolor* + CpIJ10257 nezaznamenali. Výhodou exprese *lmr(C)* v citlivých heterologních hostitelích je, že nabízí možnost sledovat rezistenční fenotyp nezávisle na přítomnosti ostatních rezistenčních genů. Tímto přístupem však nelze postihnout složitost vzájemných vztahů regulace a vzájemného sladění exprese rezistenčních genů s biosyntetickými v rámci celého biosyntetického genového klastru.

Studium funkce *lmr(C)* v *Streptomyces lincolnensis* zahrnuje především porovnávání fenotypů delečních mutant v rezistenčních genech *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)*. Jak již bylo uvedeno, doposud nebyly připraveny všechny plánované deleční mutanty tak, aby bylo možno porovnat fenotyp všech vzájemných kombinací dvojíých mutant a také mutantu trojitou. To trochu komplikuje interpretaci námi získaných výsledků. Zejména dvojíá mutanta  $\Delta AB$  by umožnila pozorovat rezistenční fenotyp udílený *lmr(C)* ve svém přirozeném hostiteli. I přes to lze vypořadovat některé trendy.

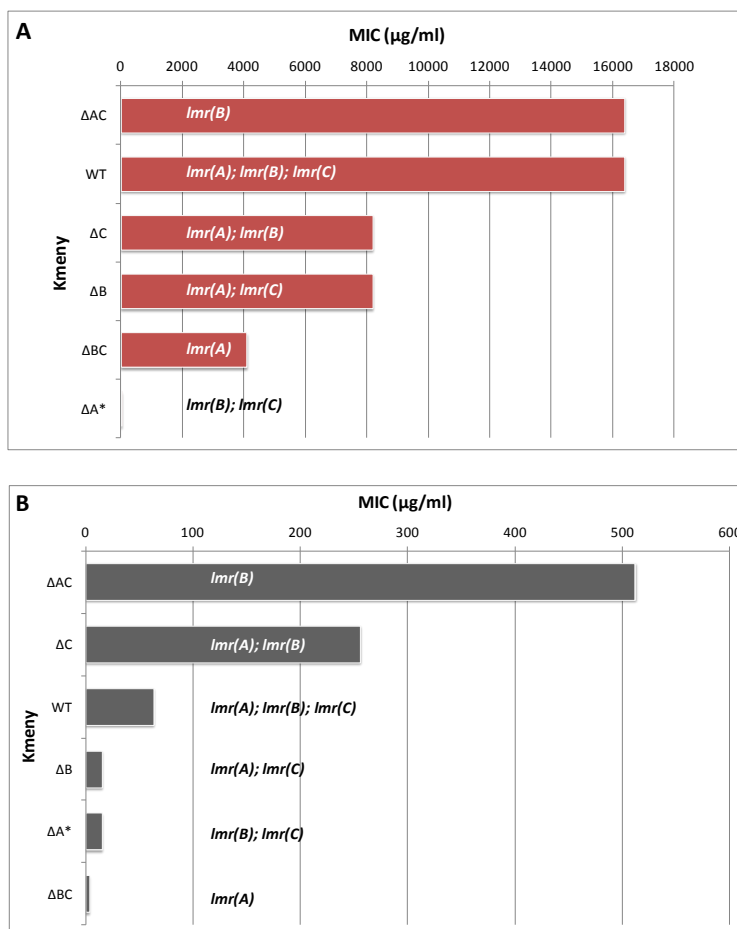
Delece genu *lmr(A)* vedla k výraznému snížení rezistence jak k linkomycinu (z 16384 µg/ml na pouhých 16 µg/ml), tak ke klindamycinu (z 64 µg/ml na 16 µg/ml). Komplementace však vedla ke zvýšení rezistence jen k linkomycinu. Jaký je celkový příspěvek genu *lmr(A)* u *Streptomyces lincolnensis* je nejlépe pozorovatelné u dvojíé mutanty  $\Delta BC$ , kde zůstává aktivní pouze gen *lmr(A)*.

Tento kmen je stále ještě výrazně rezistentní k linkomycinu, ale citlivý ke klindamycinu. Zhang Hui-Zhan a jeho kolegové (1992) ve své publikaci udávají, že gen *lmr(A)* udílí u *Streptomyces lividans* TK23 rezistenci pouze k linkomycinu, nikoli však ke klindamycinu nebo celesticetinu, což je v souladu s našimi výsledky. *Lmr(A)* patří mezi MFS transportery a jeho hlavní úlohou je pravděpodobně transport nasyntetizovaného linkomycinu ven z buňky. Z našeho pozorování i z literatury je tedy patrné, že *Lmr(A)* je vysoce specifický pouze pro linkomycin.

V případě genu *lmr(B)* vede jeho delece k snížení rezistence ke klindamycinu čtyřikrát a k linkomycinu pouze dvakrát, což pravděpodobně odráží fakt, že v této mutantě jsou stále přítomny geny *lmr(A)* udílející rezistenci k linkomycinu a *lmr(C)* s pravděpodobnou specificitou i ke klindamycinu. Opět díky dvojité mutantě  $\Delta AC$  bylo možné zjistit jaký je podíl *lmr(B)* na celkové rezistenci divokého kmene. Velkým překvapením pro nás bylo, když jsme zjistili, že rezistence ke klindamycinu se u této mutanty zvýšila osmkrát v porovnání s divokým kmenem. Toto pozorování je v rozporu s publikovanými daty. Exprese genu *lmr(B)* ve *Streptomyces lividans* TK23 zvyšovala stejně jako v případě *lmr(A)* rezistenci pouze k linkomycinu (Zhang, H.-Z. et al., 1992). *Streptomyces lividans* TK23 však nebyl plně citlivý k testovaným antibiotikům ( $MIC_{CLI} = 64 \mu\text{g/ml}$ ), a tak je možné, že případné zvýšení rezistence vložením genu *lmr(B)* bylo maskováno přítomností jiných rezistenčních mechanismů. Je však potřeba také zmínit, že ani jeden z vložených komplementačních plasmidů nesnižoval rezistenci ke klindamycinu na úroveň příslušné mutanty, takže pozorovaný fenotyp nemůže být plně potvrzen. *Lmr(B)* je 23S rRNA monometyltransferasa, u které se předpokládá, že metylací snižuje afinitu antibiotik k ribozomu. Na rozdíl od dimetyltransferas, monometyltransferasy udělají vysokou hladinu rezistence k linkosamidům a pouze nízkou nebo střední rezistenci k makrolidům a streptograminům B což odpovídá našemu pozorování (Madsen, Ch. T. et al., 2005).

Proto, abychom mohli určit jaký je podíl *lmr(C)* na celkové rezistenci divokého kmene *Streptomyces lincolnensis*, je nutné připravit dvojitou mutantu  $\Delta AB$  a také mutantu trojitou ( $\Delta ABC$ ). Díky expresi *lmr(C)* v citlivém kmeni *Streptomyces coelicolor* M1154 víme, že *lmr(C)* nejméně osmkrát zvyšuje rezistenci k linkomycinu a nejméně třicetdvakrát rezistenci ke klindamycinu. Hodnoty MIC jsou však výrazně nižší v porovnání s hodnotami MIC naměřenými u *Streptomyces lincolnensis* (Tab. 28), takže nelze s jistotou odvodit, jaká bude citlivost  $\Delta AB$ . V publikaci (Xu, J.-J. et al., 2014) bylo popsáno, že delece genu *lmr(C)* má za následek dvojnásobné snížení rezistence k linkomycinu u vysokoprodukčního kmene *Streptomyces lincolnensis* LC-G. Delece *lmr(C)* v *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 měla minimální vliv na rezistenci k linkomycinu, avšak v případě klindamycinu došlo ke zvýšení rezistence stejně, jak v případě dvojité  $\Delta AC$  mutanty (Obr. 33). Z důvodu nefunkční komplementace nelze pozorovaný rezistentní fenotyp, stejně jako v případě  $\Delta AC$ , s určitostí potvrdit. Vysvětlením pro tato zvláštní pozorování zvýšené rezistence ke klindamycinu u *lmr(C)* delečních mutant  $\Delta C$  a  $\Delta AC$  může být to, že protein *Lmr(C)* má negativní vliv na úroveň rezistence udílené *Lmr(B)*. To může být ze dvou důvodů. Jednak mechanismus rezistence udílené *Lmr(C)* může interferovat s rezistencí způsobenou metylací 23S rRNA. To by nasvědčovalo tomu, že *Lmr(C)* spíše funguje na ribozomu, než jako transportér. Druhou možností je, že *Lmr(C)* by mohl sloužit jako translační regulátor syntézy *Lmr(B)*. Čemuž nasvědčuje podobnost ARE proteinů s translačním regulátorem EttA.

Při porovnání rezistence u dvojité mutanty  $\Delta BC$ , kde zůstává aktivní pouze gen *lmr(A)*, s mutantou  $\Delta B$  (aktivní jsou geny *lmr(A)* a *lmr(C)*) lze pozorovat opačný efekt delece *lmr(C)*, než v případě dvojité  $\Delta AC$  mutanty (Obr. 33). Tedy dochází ke zvýšení rezistence ke klindamycinu. Pro jiný ARE protein, Msr(D), bylo demonstrováno, že pozitivně ovlivňuje funkci makrolidového rezistenčního proteinu Mef(E) tím, že zvyšuje úroveň rezistence a rozšiřuje jeho substrátovou specificitu pro makrolidy (Nunez-Samudio, V. et al., 2013). Mef(E) patří, stejně jako protein Lmr(A), mezi MFS transportéry. Je tedy otázkou, zda přítomnost Lmr(C) rozšiřuje substrátovou specifitu Lmr(A). Pro posouzení této hypotézy je nutné buď připravit dvojitou  $\Delta AB$  mutantu, nebo *lmr(A)* exprimovat v citlivém heterologním hostiteli spolu s *lmr(C)*.



**Obrázek 33: Porovnání hodnot MIC připravených delečních mutant *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. A – MIC pro linkomycin; B – MIC pro klindamycin; u každé deleční mutanty jsou uvedeny přítomné rezistenční geny.**

Zdá se tedy, že mezi všemi třemi geny jsou jak pozitivní ( $\Delta BC$  vs.  $\Delta B$ ), tak negativní ( $\Delta AC$  vs.  $\Delta A^*$ ) vlivy a kombinace všech tří pravděpodobně drží rezistenci na výhodné úrovni. V závislosti na tomto pozorování jsme objevili několik odkazů, na možnou souvislost genu *lmr(C)* s úrovní genové exprese. Ve spojitosti s heterologní expresí genu *lmr(C)* u *Lactococcus lactis* dochází k aktivaci stresové odpovědi, která se projevuje zvýšenou expresí chaperonů (DnaK, GroES, ClpP a ClpB). Toto pozorování bylo interpretováno jako příčina rezistence k tylosinu (Dorrian, J. M. et al., 2011). V jiné publikaci (Xu, J.-J. et al., 2014) byl testován vliv delece genu *lmr(C)* na úroveň exprese biosyntetických genů *lmbA* a *lmbR* a regulačního genu *lmbU* u vysokoprodukčního kmene *Streptomyces lincolnensis* LG-C. U genů *lmbA* a



*lmbR* bylo pozorováno snížení transkripce. V případě genu *lmbU* k žádné změně nedošlo. Obě tato pozorování mohou být důsledkem toho, že *Lmr(C)* potenciálně působící na ribozom, má funkci spíše regulační.

Velkým nedostatkem této studie je fakt, že v mnoha případech nedocházelo ke komplementaci rezistenčního fenotypu, což znemožňuje pozorované jevy s jistotou potvrdit. Důvodem může být komplexní regulace exprese genů biosyntetických klastrů. Se stejným problémem se potýká i vědecká skupina Flavie Marinelli zabývající se studiem produkce glykopeptidových antibiotik u rodu *Nonomurea*. Dle jejich interpretace by neúspěšná komplementace mohla být zapříčiněna tím, že komplementace *in trans* znemožňuje funkci některých regulačních elementů, které vyžadují, aby gen byl přítomen ve svém původním genetickém kontextu (např. některé regulační rRNA) (Marinelli, F. 2014). Pro komplementace jsme použili konstrukty odvozené od plazmidu pMS81, který se integruje do chromozomu v  $\Phi$ BT1 *attB* místech (Gregory, M. A. et al., 2003), které nemusí být dostatečně blízko, aby docházelo k expresi vloženého genu. Kromě toho nelze vyloučit ani polární efekt mutací na expresi okolních genů nebo nežádoucí rekombinace v rámci klastru při přípravě delečních mutant. Proto plánujeme ověřit všechny deleční mutanty pomocí Southern blot hybridizace. Komplementace mutací konstrukty s konstitutivní expresí genů by také mohla částečně tyto problémy obejít. Na druhou stranu při konstitutivní expresi *lmr(C)* v některých delečních mutantech došlo k zlepšení komplementací pouze u kmene  $\Delta$ BC.

Konstitutivní exprese genu *lmr(C)* vede ve většině případů k zvýšení rezistence ke klindamycinu. Výjimkou je kmen  $\Delta$ AC, u kterého nedochází ke zvýšení již tak vysoké rezistence, a kmen WT + CpIJ, u kterého došlo dokonce ke snížení nejen rezistence ke CLI, ale také k LIN. V tomto bodě se rozcházíme s publikovanou změnou rezistence pro overexpresi genu *lmr(C)* u *Streptomyces lincolnensis* LC-G, při které došlo k zvýšení rezistence k LIN na 1000  $\mu$ g/ml z původních 200  $\mu$ g/ml u kmene nesoucího prázdný vektor (Xu, J.-J. et al., 2014).

Delece rezistenčních genů měla jenom nepatrný vliv na produkci linkomycinu. Výjimkou je výrazné snížení produkce u delečních mutant  $\Delta$ B a  $\Delta$ BC. Protože však komplementací mutace nedošlo k obnově produkce lze předpokládat, že delece genu *lmr(B)* ovlivnila expresi okolních biosyntetických genů (Tab. 22) a tím i k narušení biosyntézy linkomycinu. Xu Jing-Jing a jeho kolegové (2014) pozorovali snížení produkce LIN při delecí genu *lmr(C)* u *Streptomyces lincolnensis* LC-G. V tomto případě došlo ke snížení z původních 2,78 g/l na 1,24 g/l. Podle našich výsledků z UHPLC ovšem delece genu *lmr(C)* nemá na produkci linkomycinu příliš velký vliv. Důvodem může být, že v případě *Streptomyces lincolnensis* LC-G se jedná o vysokoprodukční kmen. V našich výsledcích můžeme jisté snížení produkce u kmene  $\Delta$ C (delece genu *lmr(C)*) pozorovat při testování produkce pomocí bioassaye. Zde ovšem nemůžeme s určitostí potvrdit o kolik se snížila přímo produkce linkomycinu v porovnání s jinými antimikrobiálními látkami (parmamycin).

V roce 1995 byl publikován článek, jehož součástí bylo určení buněčné lokalizace ARE proteinu OleB u producenta OM. Z výsledků je patrné, že protein je rovnoměrně rozdělen mezi frakci cytosolickou a membránovou (Olano, C. et al., 1995). Námi připravený fúzní protein *Lmr(C)* - 6His byl detekován převážně v cytosolické frakci. Slabý signál je ovšem patrný také ve frakci membránové. Tento slabší signál může být způsoben přípravou vzorků, neboť po rozdělení frakcí pomocí centrifugace nedošlo k promytí pelety obsahující membránové proteiny, takže může být částečně kontaminován proteiny z

cytosolu.. Pro zjištění, zda je pozorovaný signál v membránové frakci artefaktem, či nikoliv, budeme experiment opakovat s tím, že do protokolu přidáme promývací krok. Důvodem tohoto opatření je fakt, že pokud by byl signál po promytí detekován pouze v cytosolické frakci, mohlo by se jednat o jeden z důkazů podporujících teorii o účinku ARE proteinů na ribozomu. Buněčná lokalizace byla zkoumána také pro další ARE proteiny. Vga(A) byl detekován ve stejné buněčné frakci, v které byla detekována také  $\beta$  – podjednotka  $F_1 - F_0$  ATPasy, což odpovídá frakci membránové. V cytosolické a ribozomální frakci protein zjištěn nebyl (Chesneau, O. et al., 2005). V naší laboratoři jsme prokázali pomocí Western blotu a následné imunodetekce, že také Msr(A) je asociovaný s membránou (Vimberg, V. nepublikovaná data). V tomto případě se výsledky buněčné lokalizace proteinů Lmr(C), Vga(A) a Msr(A) částečně rozcházejí. To může být dáno tím, že Lmr(C) může mít v producentovi antibiotik primárně jinou funkci (regulační), než proteiny Vga(A) a Msr(A) u rodu *Staphylococcus* (primárně rezistenční). Nicméně abychom tyto výsledky potvrdili, musíme s jistotou ověřit, zda přidaná histidinová kotva neovlivňuje funkci proteinu Lmr(C). Testování aktivity fúzního proteinu Lmr(C) – 6His v deleční mutantě  $\Delta C$  nelze považovat za průkazné ověření funkce, neboť rezistenční fenotyp není pozorovatelný (citlivosti kmenů s a bez *lmr(C)* se výrazně neliší). Proto bude nutné pro ověření aktivity Lmr(C) - 6His použít *Streptomyces coelicolor* M1154, u kterého je rezistence udílená *lmr(C)* pozorovatelná, neboť není maskována přítomností jiných rezistenčních genů.

V závěru lze shrnout, že námi získané výsledky ukazují, že gen *lmr(C)* udílí rezistenci k linkosamidovým antibiotikům v *Streptomyces coelicolor*. Naopak jeho delece ve *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 nemá vliv ani na produkci linkomycinu a ani výrazně neovlivňuje rezistenci k tomuto antibiotiku. Z rezistenčních fenotypů připravených delečních mutant lze usuzovat na složitější vztahy mezi rezistenčními geny v biosyntetickém klastru, které vyžadují důkladnější analýzu. Při testování genu *lmr(C)* a snaze zjistit jeho funkci nelze tedy opomíjet ani zbylé dva rezistenční geny. Protein Lmr(C) – 6His byl ve větším množství lokalizován v cytosolické buněčné frakci, než v membránové. Během doktorského studia se budu snažit identifikovat struktury interagující s proteinem Lmr(C) (ať by se jednalo o ribozom, nebo interagující membránový protein). Pro tyto účely využijeme publikovaného postupu využívajícího bodové mutace v katalytickém centru u konzervovaného Walker B motivu u proteinu EttA, který také patří do II. třídy ABC proteinů. Díky bodovým mutacím došlo v případě EttA k zamezení hydrolýzy ATP a tím k fixaci vazby proteinu na ribozom. Celý komplex byl následně purifikován a identifikován (Boël, G. et al., 2014). Identifikace interagujících struktur by byla důležitým důkazem pro určení funkce ARE proteinů.

## 6. Souhrn

- Připravili jsme sadu delečních mutant v genech *lmr(A)*, *lmr(B)* a *lmr(C)*. Z celkového počtu všech sedmi možných kombinací jednoduchých, dvojitých a trojitě mutanty nebyly připraveny pouze dvě – dvojitá mutanta  $\Delta AB$  a trojitá  $\Delta ABC$ .
- Pro ověření fenotypů delečních mutant byly připraveny komplementační plazmidy pMS81:*lmr(A)* 5, pMS81:*lmr(B)* 6, pMS81:*lmr(C)* 10, které byly konjugovány do příslušných mutant.
- U všech připravených mutant a jejich komplementací byla testována produkce linkomycinu. Delece rezistenčních genů neměly výrazný vliv na produkci. Výjimkou je snížení produkce v případě delece *lmr(B)*, kde tato mutace má pravděpodobně polární efekt na okolní biosyntetické geny.
- Vliv jednotlivých mutací na rezistenci byl zjištěn testováním citlivostí všech připravených mutant a jejich komplementací na linkomycin, klindamycin a erytromycin. Delece genu *lmr(C)* zásadně neovlivňuje rezistenci k linkomycinu, avšak paradoxně zvyšuje rezistenci ke klindamycinu pravděpodobně proto, že Lmr(C) negativně ovlivňuje funkci Lmr(B).
- Úspěšně jsme připravili plazmid pIJ10257:*lmr(C)* 5, který jsme pomocí mezidruhovému konjugace vnesli do heterologního hostitele *Streptomyces coelicolor* M1154. Expresse genu *lmr(C)* zvýšila úroveň rezistence k linkomycinu i klindamycinu.
- Konstitutivní exprese genu *lmr(C)* vede k zvýšení rezistence ke klindamycinu. Výjimkou je deleční mutant  $\Delta AC$  (delece v genech *lmr(A)* a *lmr(C)*) a exprese v divokém kmeni *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466.
- Pro účely buněčné lokalizace jsme připravili konstrukt pIJ10257:*lmr(C)* His 1 exprimující fúzní protein Lmr(C) - 6His. Pomocí dvoukrokové imunodetekce jsme zjistili, že Lmr(C) se vyskytuje převážně v cytoplazmě.

## 7. Seznam použité literatury

1. Abraham, E. P. – Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940. Vol. 146, p. 837.
2. Abramson, Jeff – Smirnova, Irina – Kasho, Vladimir, Verner, Gilian – Kaback, H.Roland – Iwata, So. Structure and mechanism of the Lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*. 2003. Vol. 301, p. 610-615.
3. Alam, Mohammad Tauqeer – Medema, Marnix H. – Takano, Eriko – Breitling, Rainer. Comparative genome-scale metabolic modeling of actinomycetes: The topology of Essential core metabolism. *FEBS Letters*. 2011. Vol. 585, p. 2389-2394.
4. Alam, Mohammad Tauqeer – Merlo, Maria Elena – Takano, Eriko – Breitling, Rainer. Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. Vol. 54, p. 763-772.
5. Andersen, Christian, B.F. – Becker, Thomas – Blau, Michael – Anand, Monika – Halic, Mario – Balar, Bharvi – Mielke, Thorsten – Boesen, Thomas – Pedersen, Jan Skov – Spahn, Christian M. – Kinzy, Terri Goss – Andersen, Gregers, R. – Beckmann, Roland. Structure of eEF3 and mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature*. 2006. Vol. 443, No. 12, p. 663-668.
6. Anderson, Annaliesia S. – Wellington, Elizabeth M.H. The taxonomy of streptomyces and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. Vol. 51, p. 797-814.
7. Argoudelis, A.D. – Fox, J.A. – Eble, T.E. U-21,669: A new lincomycin-related antibiotic. *Biochemistry*. 1965. Vol. 4, No. 4, p. 698-703.
8. Bao, Kai – Cohen, Stanley N. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes&Development*. 2003. Vol. 17, p. 774 – 785.
9. Bentley, S.D. – Brown, S. – Murphy, L.D. – Harris, D.E. – Quail, M.A. - Parkhill, J. – Barrell, B.G. – McCormick, J.R. – Santamaria, R.I. – Losick, R. et al. SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces corlicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*. 2004. Vol. 51, No. 6, p. 1615-1628.
10. 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. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A 3(2). *Nature*. 2002. Vol. 417, p. 141-147.
11. Benveniste, Raoul – Davies, Julian. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1973. Vol. 70, No. 8, p. 2276-2280.
12. Bibb, Mervyn J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.*. 2005. Vol. 8, p. 208-215.
13. Blattner, Frederick R.- Plunkett, Guy – Bloch, Craig A – Perna, Nicole T. – Burland, Valerie – Riley, Monica – Collado-Vides, Julio – Glasner, Jeremy D. – Rode, Christopher K. – Mayhew, George F. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997. Vol. 277, No. 5331, p. 1453-1462.
14. Boël, Grégory – Smith, Paul C. – Ning, Wei – Englander, Michael T. – Chen, Bo – Hashem, Yaser – Testa, Anthony J. – Fischer, Jeffrey J. – Wieden, Hans-Joachim – Frank, Joachim et al. The ABC-F

- protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2014. Vol. 21, No. 2, p.143-151.
15. Bosling, Jacob – 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*. 2003. Vol. 47, No. 9, p. 2892-2896.
  16. Brahme, Nanda, M. – Gonzalez, Jose E. – Mizsak, Steve – Rolls, Jim P. – Hessler Ed J. – Hurley, Laurence H. Biosynthesis of the Lincomycins. 2. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of Methylthiolincosaminide moiety of linkomycin A. *J. Am. Chem. Soc.* 1984a, Vol. 106, No. 25, p. 7878 - 7883.
  17. Brahme, Nanda, M. – Gonzalez, Jose E. – Rolls, Jim P. – Hessler Ed J. – Mizsak, Steve – Hurley, Laurence H. Biosynthesis of the Lincomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties if linkomycins A and B. *J. Am. Chem. Soc.* 1984b, Vol. 106, No. 25, p. 7873 - 7878.
  18. 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.
  19. Bussiere, Dirksen E.- Muchmore, Steven W.- Dealwis, Christopher G. – Schluckebier, Gerd – Nienaber, Vicki L. – Edalji, Rohinton P.- Walter, Karl A. – Lador, Uir S. – Holzman, Thomas F. – Abad-Zapatero, Cele: Crystal structure of ErmC, an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry*. 1998. Vol. 37, No. 20, p. 7103-7112.
  20. Butaye, Patrick – Cloeckert, Axel – Schwarz, Stefan. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003. Vol. 22, p. 205-210.
  21. Cadman, Hilary – Martinez, Lindsay (eds.). *Antimicrobial resistance. Global report on surveillance..WHO Library Cataloguing – in – Publication Data*. 2014.
  22. Contreras, Antonio – Vázquez, David. Synergistic interaction of the streptogramins with the ribosome. *Eur. J. Biochem.* 1977. Vol. 74, p. 549 – 551.
  23. Dassa, Elie – Bouige, Philippe. The ABC of ABCs: phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res.Microbiol.* 2001. Vol. 152, p. 211-229.
  24. Davidovich, Chen – Bashan, Anat – Auerbach-Nebo, Tamar – Yaggie, Rachel D. – Gontarek, Richard R. – Yonath, Ada. Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity. *PNAS*. 2007. Vol. 104, No. 11, p. 4291-4296.
  25. Davidson, Amy L. – Dassa, Elie – Orelle, Cedric – Chen, Jue. Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2008. Vol. 72, No. 21, p. 317-364.
  26. Denis, Alexis – Agouridas, Constantin – Auger, Jean-Michel – Benedetti, Yannick – Bonnefoy, Alain – Bretin, Francois – Chantot, Jean-Francois – Dussarat, Arlette – Fromentin, Claude – D’Ambrieres, Solange Gouin et.al. Synthesis and antibacterial activity of HMR 3647 a new ketolide highly potent against erythromycin-resistant and susceptible pathogens. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 1999. Vol. 9, p. 3075-3080.
  27. Dorrian, James M. – Briggs, Deborah A. – Ridley, Michael L. – Layfield, Robert – Kerr, Ian D. Induction of a stress response in *Lactococcus lactis* is associated with a resistance to ribosomally active antibiotics. *FEBS Journal*. 2011. Vol. 278, p. 4015-4024.

28. Dunkle, Jack A.-Xiong, Liqun – Mankin, Alexander S. – Cate, Jamie H.D. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *PNAS*. 2010. Vol. 107, No. 40, p. 17152-17157,
29. Fischbach, Michael A.-Walsh, Christopher T. – Clardy, Jon. The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *PNAS*. 2008. Vol. 105, No. 12, p. 4601-4608.
30. Flårdh, Klas – Buttner, Mark J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature*. 2009. Vol. 7, p. 36-49.
31. Fleming, A. 1945, 26. června. *The New York Times*
32. Flett, Fiona – Mersinias, Vassilios – Smith, Colin P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*. 1997. Vol. 155, No. 2, p. 223 – 229.
33. Forsberg, Kevin J. – Reyes, Alejandro – Wang, Bin – Selleck, Elizabeth M. – Sommer, Morten O.A. – Dantas, Gautam. The Shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. 2012. Vol. 337, p. 1107-1111.
34. Girard, Geneviève – Traag, Bjorn A. – Sangal, Vartul – Mascini, Nadine – Hoskisson, Paul A. – Goodfellow, Michael – van Wezel, Gilles P. A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Royal Society Publishing*. 2013,p. 1-13.
35. Gomez-Escribano, Juan Pablo – Bibb, Mervyn J. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*. 2011. Vol. 4, No. 2, p. 207 – 215.
36. Gregory, Matthew A. – Till, Rob – Smith, Margaret C. M. Integration site for *Streptomyces* phage  $\Phi$ BT1 and development of site-specific integrating vectors. *J. Bacteriol.*. 2003. Vol. 185, No. 17, p. 5320 – 5323.
37. Gust, Bertold – Kieser, Tobias – Chater, Keith F. REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). 2002, The John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR47UH, United Kingdom.
38. Hansen, Jeffrey I.- Ippolito, Joseph A. – Ban, Nenad – Nissen, Poul –Moore, Peter B. – Steitz, Thomas A. The structures of four macrolide antibiotic bound to the large ribosomal subunit. *Molecular Cell*. 2002. Vol. 10, p. 117-128.
39. Hassan, Karl A. – Skurray, Ronald A. – Brown, Melissa H. Active export proteins mediating drug resistance in *Staphylococci*. *J.Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007.Vol. 12, p. 180-196.
40. Haug, Iris – Weissenborn, Anke – Brolle, Dirk – Bentley, Stephen – Kieser, Tobias – Altenbuchner, Josef. *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2\*: deductions from the complete sequence. *Microbiology*. 2003. Vol. 149, p. 505-513.
41. Hong, Hee-Jeon – Hutchings, Matthew I. – Hill, Lionel M. – Buttner, Mark J. The role of the novel fem protein VanK in vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*. *JBC*. 2005. Vol. 280, No. 13, p. 13055 – 13061.
42. Hopwood, D.A. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc.R.Soc.Lond.* 1988. B 235, p. 121-138.
43. Hot, Chloé – Berthet, Nicolas – Chesneau, Olivier. Characterization of sal(A), a novel gene responsible for lincosamide and streptogramin A resistance in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. Vol. 58, No. 6, p. 3335-3341.

44. Chen, Bo – Boël, Grégory – Hashem, Yaser – Ning, Wei – Fei, Jingyi – Wang, Chi – Gonzalez, Ruben L. – Hunt, John F. – Frank, Joachim. EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome – tRNA dynamics. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2014. Vol. 21, No. 2, p. 152-161.
45. Chesneau, Olivier – Ligeret, Heidi – Hosan-Aghaie, Negin – Morvan, Anne – Dassa Elie. Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by Vga proteins of Staphylococci. *Antimicrob. agents chemother.* 2005. Vol 49, No. 3, p. 973 – 980.
46. Choi, Sung-Sook – Kim, Sook-Kyund – Oh, Tae-Gwon – Choi, Eung-Chil. Role of mRNA termination in Regulation of ermK. *J. Bacteriol.* 1997. Vol. 179, No. 6, p. 2065-2067.
47. Ikeda, Haruo – Ishikawa, Jun – Hanamoto, Akiharu – Shinose, Mayumi – Kikuchi, Hisashi – Shiba, Tadayoshi – Sakaki, Yoshiyuki – Hattori, Masahira – Omura, Satoshi. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology*. 2003. Vol. 21, p. 526-531.
48. Jacobsen Henning. The n-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur.J.Biochem.* 1974. Vol. 45, p. 623-627.
49. Jiraskova, Petra – Gazak, Radek – Kamenik, Zdenek – Steiningerova, Lucie – Najmanova Lucie – Kadlcik, Stanislav – Novotna, Jitka – Kuzma, Marek – Janata, Jiri. Biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin, hormaomycin and pyrrolbenzodiazepines: Can a  $\gamma$ -glutamyl-transferase cleave the C-C bond? v přípravě.
50. Johnston, Nicole J. – Mukhtar, Tariq A. – Wright, Geraard D. Streptogramin Antibiotics: Mode of action and resistance. *Current Drug Targets*. 2002. Vol. 3, p. 335-344.
51. Kadlčík, Stanislav – Kučera, Tomáš – Chalupská, Dominika – Gažák, Radek – Koběrská, Markéta – Ulanová, Dana – Kopecký, Jan – Kutejová, Eva – Najmanová, Lucie – Janata, Jiří. Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis. *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, No. 12, e. 84902.
52. Kamenik, Zdenek – Kadlcik, Stanislav – Radojevic, Bojana – Gazak, Radek – Najmanova, Lucie – Kopecky, Jan – Janata, Jiri. Lincosamide biosynthesis: Deacetylation of mycothiol-dependent detoxification ‚waste product‘ switches the machinery towards completion of antibiotic. v přípravě.
53. Kannan, Krishna – Kanabar, Pinal – Schryer, David – Florin, Tanja – Oh, Eugene – Bahroos, Neil – Tenson, Tanel – Weissman, Jonathan S.- Mankin, Alexander S. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *PANS*. 2014. Vol. 111, No. 45, p. 15958-15963.
54. Katz, Leonard – Ashley, Gary W. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chem. Rev.* 2005. Vol. 105, No. 2, p. 499 – 527.
55. Kavanagh, Frederick – Hervey, Annette – Robbins, William J. Antibiotic substances from basidiomycetes . VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* pilat, *PNAS*. 1951. Vol. 37, p. 570 – 574.
56. Kerr, I. D. – Reynolds, E.D. – Cove, J. H. ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochemical Society Transactions*. 2005. Vol. 33, No. 5, p. 1000 – 1002.
57. Koběrská, M. – Kopecký, J. – Olšovská, J. – Jelínková, M. – Ulanová, D. – Man, P. – Flieger, M. – Janata, J. Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol.* 2008. Vol. 53, No. 5, p. 395 – 401.

58. Kos, Veronica – Ford, Robert Curtis. The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cell.Mol. Life Sci.* 2009. Vol. 66, p. 3111-3126.
59. Kouvela, Ekaterini C.- Petropoulos, Alexandros D.- Kalpaxis, Dimitrios L.Unraveling new features of clindamycin interaction with functional ribosomes and dependence of the drug potency on polyamines. *J. Biol.Chem.* 2006.Vol.281, No. 32, p. 23103-23110.
60. Langer, Cheena – Mahajan, Vivek – Gupta, Vipin. Retapamulin: New topical antibacterial. *JKS Science.* 2011. Vol. 13, No.4, p. 212-213.
61. Law, Christopher J. – Maloney, Peter C. – Wang, Da-Neng. Ins and outs major facilitator superfamily antiporters. . *Ann. Rev. Microbiol.* 2008, Vol. 62, p. 289-305.
62. Leclercq, Roland. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Antimicrobial Resistance.* 2001. Vol.2002, No. 34, p.482-492.
63. Lee, Nelson – Yuen, Kwok-Yung – Kumana, Cyrus R. Clinical role of  $\beta$ -lactam/  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *Drug.* 2003. Vol. 63, No. 14, p. 1511-1524.
64. Lechevalier, Mary P. – Lechevalier, Hubert. Chemical composition as a criterion in the classification of a aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1970. Vol. 20, No. 4, p. 435-443.
65. Lenart, Jakub – Vimberg, Vladimir – Vesela, Ludmila – Janata, Jiri – Balikova Novotna Gabriela. Detailed mutational analysis of Vga(A) interdomain linker:Implication for antibiotic resistance specificity and mechanism. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2015. Vol. 59, No. 8. v tisku
66. Licht, Anke – Schneider, Erwin. ATP bunding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Cent.Eur.J.Biol.* 2011. Vol. 6, No. 5, p. 785-801.
67. Lin, Chia-I – Sasaki, Eita – Zhong, Aoshu – Liu, Hung-wen. In vitro characterization of LmbK and LmbO: Identification of GDP-D-erythro- $\alpha$ -D-glucosyl-erythromycin as a key intermediate in lincomycin A biosynthesis. *JACS.* 2014. Vol. 136, No. 3, p. 906 – 909.
68. Lomovskaya, Natalia – Hong, Soon-Kwang – Kim, Sung-Uk – Fonstein, Leonid – Furuya, Kaoru – Hutchinson, Richard. The *Streptomyces peucetius* *drnC* gene encodes a UvrA-Like protein involved in daunorubicin resistance and production. *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, No. 11, p. 3238-3245.
69. Long, Katherine S. – Poehlsgaard, Jacob – Kehrenberg, Corinna – Schwarz, Stefan – Vester, Birte. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols,lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol 50, No. 7, p. 2500-2505.
70. Madsen, Christian Toft – Jakobsen, Lene – Douthwaite, Stephen. *Micobacterium smegmatis* Erm(38) is a reluctant dimethyltransferase. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, No. 9, p. 3803-3809.
71. Malbruny, Brigitte – Werno, Anja M. – Murdoch, David R. – Leclercq, Roland – Cattoir, Vincent. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins due to the *lsa(C)* gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. Vol. 55, No. 4, p. 1470-1474.
72. Marinelli, Flavia. Rational engineering for producing old a novel glycopeptide antibiotics. In *Book of Abstracts. XVII. „International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA´17). Applications and Biotechnology of Actinomycetes“*, Pine Bay Holiday Resort, Kusadasi, Turecko, 8.-12.10.2014.



73. Mast, Yvonne – Wohlleben, Wolfgang. Streptogramins – two are better than one! *International Journal of Medical Microbiology*. 2014. Vol. 304, p. 44-50.
74. 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.
75. Morar, Mariya – Bhullar, Kirandeep – Hughes, Donald W. – Junop, Murray – Wright, Gerard D. Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. *Structure*. 2009. Vol. 17, No. 12, p. 1649 – 1659.
76. Nishimura, A. – Morita, M. – Nishimura Y. – Sugino, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18, No. 20, p. 6169.
77. Normark, B. Henriques – Normark, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 2002. Vol. 252, p. 91-106.
78. Novotna, Gabriela – Hill, Chris – Vincent, Karen – Liu, Chang – Hong, Hee-Jeon. A Novel membrane protein, VanJ, conferring resistance to teicoplanin. *Antimicrob. agents Chemother.* 2012. Vol. 56, No. 4, p. 1784 – 1796.
79. Novotná, G. – Janata, J. A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, Vga(A)<sub>LC</sub>, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50, No. 12, p. 4070 – 4076.
80. Novotná, Jitka – Olsovská, Jana – Novak, Petr – Mojzes, Peter – Chaloupkova, Radka – Kamenik, Zdenek – Spizek, Jaroslav – Kutejova, Eva – Mareckova, Marketa – Tichy, Pavel – Damborsky, Jiri – Janata, Jiri. Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, No. 12, e. 79974.
81. Novotná, Jitka – Honzátko, Aleš – Bedna, Petr – Kopecký, Jan – Janata, Jiří – Spížek, Jaroslav. L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradial cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 2004. Vol. 271, p. 3678-3683.
82. Nunez-Samudio, Virginia – Chesneau, Olivier. Functional interplay between the ATP binding cassette Msr(D) protein and the membrane facilitator superfamily Mef(E) transporter for macrolide resistance in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 2013. Vol. 164, p. 226-235.
83. Odou, M.-F. – Muller, C. – Calvet, L. – Dubreuil, L. In vitro activity against anaerobes of retapamulin, a new topical antibiotic for treatment of skin infections. *JAC* 2007. Vol. 59, p. 646-651.
84. Ojo, Kayode K. – Striplin, Megan J. – Ulep, Catherine C. – Close, Natasha S. – Zittle, Jennifer – Luis, Henrique – Bernardo, Mario – Leitao, Jorge – Roberts, Marilyn C. *Staphylococcus* efflux msr(A) gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium* and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50, No. 3, p. 1089-1091.
85. Ohnishi, Yasuo – Ishikawa, Jun – Hara, Hirofumi – Suzuki, Hirokazu – Ikenoya, Miwa – Ikeda, Haruo – Yamashita, Atsushi – Hattori, Masahira – Horinouchi, Sueharu. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 2008. Vol. 190, No. 11, p. 4050-4060.
86. 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.
87. Pao, Stephanie S. – Paulsen, Ian T. – Saier, Milton H. jr. Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998. Vol. 62, No. 1, p. 1-34.

88. Pavlović, D. – Mutak, W.S. – Andreotti, D. – Biondi, S. – Cardullo, F. – Paio, A. – Piga, E. – Donati, D. – Lociuoro, S. Synthesis and structure – activity relationships of  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -lactone ketolides: a novel class of macrolide antibiotics. *Med.Chem.Lett.* 2014. Vol. 5, p. 1133-1137.
89. Peschke, Ursula – Schmidt, Heike – Zhang, Hui-Zhang – Piepersberg, Wolfgang. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* 1995. Vol. 16, No. 6, p. 1137 – 1156.
90. Porse, Bo T. – Garrett, Roger A. Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase Loop of 23 S r RNA and Synergism of their inhibitory mechanisms. *JMB.* 1999. Vol. 286, p. 375-387.
91. Projan, Steven J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology.* 2003. Vol. 6, p. 427 – 430.
92. Quintana, Erika T. – Wieczbicka, Katarzyna – Mazkiewicz, Pawel – Osman, Abdalla – Fakal, Ahmed H.- Hamid, Mohamed E. – Zakrzewska-Czermanska, Jolanate – Maldonato, Luis A. – Goodfellow, Michael. *Streptomyces sudanensis* sp.nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008. Vol. 93, p. 305-313.
93. Rees, Douglas C. – Johnson, Eric – Lewinson, Oded. ABC transporters: the power to change. *Nature.* 2009. Vol. 10, p. 218-227.
94. Retsema, J.- Fu, Wenchi. Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2001. Vol. 18, p. S3 – S10.
95. 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.
96. 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.
97. Roberts, Marilyn C. – Sutcliffe, Joyce – Courvalin, Patrice – Jensen, Lars Bogo – Rood, Julian – Seppala, Helena. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. agents Chemother.* 1999. Vol. 43, No. 12, p. 2823-2830.
98. Ross, Jeremy I. – Eady, E. 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.
99. Ross, Jeremy I. – Eady, E. Anne – Cove, Jonathan H. - Baumberg, Simon. Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Gene.* 1996. Vol. 183, p. 143-148.
100. 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. *Molecular Microbiology.* 1990. Vol. 4, No. 7, p. 1207 – 1214.
101. Řezanka, Tomáš – Spížek, Jaroslav – Sigler, Karel. Medicinal use of lincosamides and microbial resistance to them. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry.* 2007. Vol. 6, No. 2, p. 133 – 144.
102. Sasaki, Eita – Lin, Chia-I – Lin, Ke-Yi – Liu, Hung-wen. Construction of the octose 8-phosphate intermediate in lincomycin biosynthesis: Characterization of the reactions catalyzed by *LmbR* and *LmbN*. *JACS.* 2012. Vol. 134, p. 17432 – 17435.

- 103.Saurin, William – Hofnung, Maurice – Dassa Elie. Getting in o rout: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. J.Mol.Evol. 1999. Vol. 48, p. 22-41.
- 104.Schluckebier, Gerd – Zhong, Ping – Stewart, Kent D. – Kavanaugh, Tom J.- Abad-Zapatero, Cele. The 2.2 A° structure of the rRNA methyltransferase ermC and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. JMB. 1999. Vol. 289, p. 277-291.
- 105.Schlünzen, Frank – Zarivach, Raz – Harms, Jörg – Bashan, Anat – Tocilj, Ante – Albrecht, Renate – Yonath, Ada – Franceschi, Francois. Structural basis for the interaction of antibiotic with the peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature. 2001. Vol. 413, p. 814-821.
- 106.Schmitz, Franz-Josef – Petridou, Jasmina – Astfalk, Nadine – Scheuring, Sibylle – Köhrer, Karl – Verhoef, Jan, Fluit, Ad C. – Schwarz, Stefan. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed erm(A) genes in Staphylococcus aureas. Antimicrob. Agenst Chemother. 2001. Vol. 45, No. 5, p. 1603-1604.
- 107.Schroeder, W. – Bannister, B. – Hoeksema, H. Lincomycin III<sup>la-c</sup> The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. Journal of the American Chemical Society. 1967. Vol. 89, No. 10, p. 2448-2453.
108. Schwendener, Sibille – Perreten, Vincent. New transposon Tn6133 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 contains vga(E), a novel streptogramin A, pleuromutilin, and lincosamide resistance gene. Antimicrob. Agents Chemother. 2011. Vol. 55, No. 10, p. 4900 – 4904.
109. Singh, Harcharan – Atray, Meena – Modi, Pankaj Kumar. Antibiotic susceptibility pattern of methicillin resistance Staphylococcus aureus in tertiary care center of southern Rajasthan. IJPSR. 2014. Vol. 5, No. 2, p. 607-611.
- 110.Spížek, J. - Řezanka, T. Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. Appl Microbiol. Biotechnol. 2004a. Vol. 63, p. 510-519.
- 111.Spížek, J. - Tichý, P. Some aspects of overproduction of secondary metabolites. Folia Microbiol. 1995. Vol. 40, No. 1, p. 43-50.
- 112.Spížek, Jaroslav – Novotná, Jitka – Řezanka Tomáš. Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance and applications. Advances in Applied Microbiology. 2004b. Vol. 56, p. 121-152.
- 113.Steingerová, Lucie, 2015. Funkce proteinu LmbW v biosyntéze antibiotik. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova, Praha.
- 114.Sun, Linfeng – Zeng, Xin – Yan, Chuangye – Sun, Xiuyaun – Gong, Xinqi – Rao, Yu – Yan, Neing. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. Nature. 2012. Vol. 490, p. 361-366.
- 115.Tait-Kamradt, A.-Davies, T.- Cronan, M. – Jacobs, M.R. – Appelbaum, P.C. – Sutcliffe, J. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. Antimicrob. Agents Chemother. 2000. Vol. 44, p. 2118-2125.
- 116.Takeuchi, Toru – Sawada, Hiroyuki – Tanaka, Fumio – Matsuda, Izumi. Phylogenetic analysis of Streptomyces spp. Causing potato scab based on 16S rRNA sequences.International Journal of Systematic Bacteriology. 1996. Vol. 46, No. 2, p. 476-479.
- 117.Tenson, Tanel – Lovmar, Martin – Ehrenberg, Mans. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. JMB. 2003. Vol. 330, p. 1005-1014.

118. Tu, Daqi – Blaha, Gregor – Moore, Peter B. – Steitz, Thomas A. Structures of MLS BK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell*. 2005. Vol. 121, p. 257 – 270.
119. Uchida, Kinya – Seino, Akio. Intra- and intergeneric relationships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997. Vol. 47, No. 1, p. 182-190.
120. Vannuffel, Pascal – Cocito, Carlo. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*. 1996. Vol. 5, Suppl. 1, p. 20-30.
121. Vayalumkal, Joseph V. – Jadavji, Tajdin. Children hospitalized with skin and soft tissue infections. A guide to antibacterial selection and treatment. *Pediatr. Drugs*. 2006. Vol. 8, No. 2, p. 99 – 111.
122. Ventura, Marco – Canchaya, Carlos – Tauch, Andreas – Chandra, Govind – Fitzgerald, Gerald F. – Chater, Keith F. – van Sinderen, Douwe. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007. Vol. 71, No. 3, p. 495 – 548.
123. Vester, Birte – Douthwaite, Stephen. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45, No. 1, p. 1-12.
124. Waksman, Selman A. – Henrici, Arthur T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.* 1943. Vol. 46, p. 337-341.
125. Wang, Xiang-Jing – Yan, Yi-Jun – Zhang, Bo – An, Jing – Wang, Ji-Jia – Tian, Jun – Jiang, Ling – Chen, Yi-Hua – Huang, Sheng-Xiong – Yin, Min – Zhang, Ji et al. Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchengensis*. *J. Bacteriol.* 2010. Vol. 192, No. 17, p. 4526-4527.
126. Weisblum, Bernard. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1995. Vol. 39, No. 3, p. 577-585.
127. Werckenthin, Christiane – Schwarz, Stefan – Westh, Henrik. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *ermC* genes. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1999. Vol. 43, No. 7, p. 1681-1685.
128. Wilson, Daniel N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature*. 2014. Vol. 12, p. 35-48.
129. Witz, D.F. – Hessler, E.J. – Miller, T.L. Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lyncomycin. *Biochemistry*. 1971. Vol. 10, No. 7., p. 1128-1133.
130. Wright, Gerard D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Drug Delivery Reviews*. 2005. Vol. 57, p. 1451-1470.
131. XU, Jing-jing – WU, Hang – MENG, Si-tong – LIU, Rui-hua – Huang, Xun-duan – Zhang, Bu-chang – Bai, Lin-quan. Functional analysis of lincomycin transporter gene *lmr(C)* in *Streptomyces lincolnensis* LC-G. *Journal of Shanghai Jiao Tong University*. 2014. Vol. 48, No. 2, p. 159 – 163.
132. Yan, Kang – Madden, Lenore – Choudhry, Anthony, E. – Voigt, Christine S. – Copeland, Robert A. – Gontarek, Richard R. Biochemical characterization of the interactions of the novel pleuromutilin derivative retapamulin with bacterial ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50, No. 11, p. 3875-3881.
133. Yan, Nieng. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013. Vol. 38, No. 3, p. 151-159.
134. Yin, Yong – He, Xiao – Szewczyk, Paul – Nguyen, That – Chang, Geoffrey. Structure of the multidrug transporter *EmrD* from *Escherichia coli*. *Science*. 2006. Vol. 312, No. 5774, p. 741-744.

135. Zalacian, Magdalena – Cundliffe, Eric. Cloning of *tlrD*, a fourth resistance gene from the tyiosin producer *Streptomyces tradiae*. *Gene*. 1991. Vol. 97, No. 1, p. 137-142.
136. Zalacain, Magdalena – Cundliffe, Eric. Methylation of 23S ribosomal RNA dues to *carB*, an antibiotic-resistance determinant from the carbomycin producer, *Streptomyces thermotolerans*. *Eur.J.Biochem*. 1990, Vol. 189, p. 67-72.
137. Zhang, Hui-Zhang – Schmidt, Heike – Piepersberg, Wolfgang. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology*. 1992. Vol. 6, No. 15, p. 2147 – 2157.
138. Zhao, Qunfei – Wang, Min – XU, Dongiao, Zhang, Qinglin – Liu, Wen. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature*. 2015. Vol. 000, p. xx
139. Zhu, Hua – Sandiford, Stephanie K. – van Wezel, Gilles P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *J. Ind.Microbiol.Biotechnol*. 2014. Vol. 41, p. 371-386.