

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Bianka Mičke**

**Funkce ABCF proteinů u bakterií**  
**The function of ABCF proteins in bacteria**

Bakalářská práce

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

Praha, 2020



**Prohlášení:**

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

V Praze, 8. 6. 2020

Bianka Mičke

## Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné, Ph.D. za možnost vyzkoušet si práci v mikrobiologické laboratoři v Biocevu ve Vestci u Prahy a možnost vypracovávat zde svou bakalářskou práci.

Chtěla bych také poděkovat celému týmu kolegů z laboratoře za cenné rady a ochotu zodpovědět každý můj dotaz k náplni laboratorní práce nebo k tématu ABCF proteinů.

Velké poděkování patří kamarádovi Mgr. Janovi Blumensteinovi, který mi předal bohaté zkušenosti a doporučení k vypracování bakalářské práce. Prakticky okamžitě odpovídal na moje technické dotazy týkající se formátování, pravopisu a práce s citačním softwarem.

Mé poděkování patří i doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D., která byla vždy ochotná ihned se se mnou sejít a prodiskutovat aktuální situaci, popř. navrhnout její řešení. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům PřF UK, kteří mi laskavě pomáhali v posledních dnech nebo mě provázeli bakalářským studiem.

V neposlední řadě děkuji mým přátelům a rodičům, kteří mě podporují ve studiu. S přáteli jsem během volných víkendů prožila skvělé zážitky při výletech, trénincích, srazech a mohla jsem si odpočinout od psaní.

Největší dík patří mému příteli Janovi Beránkovi, který za mě převzal všechny pracovní a velkou většinu domácích povinností, a já jsem tak měla prostor naplno se věnovat studiu. Dokonce šel včera před půlnocí do práce, jen aby mi mohl moji práci vytisknout.

Věnováno všem, kteří se nevzdávají.

## Abstrakt

Translace je jedním z nejzákladnějších procesů odehrávajících se v živých buňkách. Jedná se přepis nukleotidové sekvence mRNA do proteinu, který probíhá na ribozomech. Během evoluce si organismy vyvinuly nepřehledné množství mechanismů, kterými dokáží flexibilně reagovat na své potřeby. Jedním z těchto mechanismů jsou i ABCF proteiny, které náleží do superrodiny ABC transportérů, ale na rozdíl od nich jim chybí transmembránová doména a neúčastní se transportních procesů. V buňkách se ABCF proteiny nacházejí volně v cytosolu nebo interagují s ribozomy. Dnes rozlišujeme dvě skupiny ABCF proteinů: antibioticko-rezistenční a proteiny, které regulují translaci. Ovšem tato funkce byla s jistotou potvrzena pouze u proteinu Etta. Antibioticko-rezistenční ABCF proteiny (ARE) se vážou na ribozom a ochraňují ho před působením antibiotik navazujících se na 50S ribozomální podjednotku. Regulační ABCF proteiny reagují na vnitřní a vnější buněčné podmínky. V případě neobvyklých podmínek se navazují na ribozomy a jsou stěžejní pro jejich správnou funkci. Dnes je známo 45 podrodin ABCF proteinů, ale struktura a přesný mechanismus působení těchto proteinů je stále zahalen tajemstvím. Ve své práci shrnuji dostupné informace o bakteriálních ABCF proteinech.

**Klíčová slova:** ABCF proteiny, antibiotická rezistence, ARE, regulace translace, ribozom, translace, translační faktory

## Abstract

Translation belongs to the most basic processes which happens in the living cells. It is the last step of proteosynthesis when genetic information encoded by the mRNA is transformed into the protein on a ribosome. Organisms have developed a wide range of mechanisms that can regulate it's needs. I focused on one of them – ABCF proteins. This protein group is a member of the ABC transporters superfamily but they haven't a transmembrane domain and their purpose is protect the ribosomes from antibiotics that bind 50S ribosomal subunit or interact with the ribosomes and influence ribosomal functions. Today, we can divide ABCF proteins into the two functional groups: antibiotic resistance proteins (ARE) and proteins with the regulatory functions. The translational regulatory function has been confirmed There is 45 ABCF protein subfamilies spread through the bacteria and eukaryotes but many essential informations like the structure and exact function of them are still missing. My bachelor thesis is analysis and summary of facts that are known about the bacterial ABCF proteins.

**Key words:** ABCF proteins, antibiotic resistance, ARE, translational regulation, ribosome, translation, translational factors

# Seznam zkratek

φφφφDE	sequence of 4 basic amino acids, aspartic acid, glutamic acid	sekvence 4 bazických aminokyselin, kyseliny asparagové, kyseliny glutamové
Å	ångström	ångström
aa-tRNA	aminoacyl-tRNA	aminoacyl-tRNA
ABC	ATP-binding cassette protein	ATP-vazebný protein
ABC(A-H)	ATP-binding cassette (type A-H) protein family	rodina ATP-vazebných proteinů (typu A-H)
ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
ARE	antibiotic resistance protein	antibioticko-rezistenční protein
ArfA	alternative ribosome-rescue factor A	alternativní ribozomální záchranný faktor A
ArfB	alternative ribosome-rescue factor B	alternativní ribozomální záchranný faktor B
aSD	anti-Shine-Dalgarno sequence	anti-Shine-Dalgarno sekvence
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BipA	BPI-inducible protein A	BPI-obsahující protein A
BIPP	Bayesian inference posterior probability	
BlastP	Basic Local Alignment Search Tool P	
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
eEF1A	eukaryotic elongation factor 1A	eukaryotický elongační faktor 1A
eEF3	eukaryotic elongation factor 3	eukaryotický elongační faktor 3
EF4	elongation factor 4	elongační faktor 4
EF-G	elongation factor G	elongační faktor G
EF-TU	elongation factor thermo unstable	netermostabilní elongační faktor
EttA	energy-dependent translational throttle A	energeticky závislý translaci zastavující protein A
EttA-EQ2	ATPase-deficient mutant of EttA	mutant EttA bez schopnosti hydrolyzy ATP
fMET-tRNA	tRNA carrying N-formylmethionine	tRNA nesoucí N-formylmethionin
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
GXXGXGK(S/T)	sequence of glycine, 2 diverse amino acids, glycine, one diverse amino acid, glycine, lysine, serine/threonine	sekvence glycinu, 2 různých aminokyselin, glycinu, 1 různé aminokyseliny, glycinu, lyzinu, serinu/threoninu
HEAT	Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR domain	Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR doména
HMM	Hidden Markov model	
Hsp15	heat shock protein 15	protein tepelného šoku 15
IF2	iniciation factor 2	iniciační faktor 2
IF3	iniciation factor 3	iniciační faktor 3
K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub>	potassium tellurite	telluričitan draselný
LSGGE	sequence of leucine, serine, 2 glycines, glutamic acid	sekvence leucinu, serinu, 2 glycinů, glutamové kyseliny
LSGGQ	sequence of leucine, serine, 2 glycines, glutamine	sekvence leucinu, serinu, 2 glycinů, glutaminu
MazEF TA	endoribonuclease toxin MazF and antitoxin MazE	endoribonukleázový toxin MazF a antitoxin MazE
Mg <sup>2+</sup>	magnesium ion	hořečnatý kationt
MLB	maximum likelihood bootstrap	
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NBD	nucleotide binding domain	nukleotid vazebná doména
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum pro biotechnologické informace
NPET	nascent polypeptide exit tunnel	odchozí tunel pro vznikající polypeptid
ppGpp	guanosine tetraphosphate	guanosintetrafosfát
pppGpp	guanosine pentaphosphate	guanosinpentafosfát

PTC	peptidyl transferase center	peptidyl transferázové centrum
PtIM	P-site tRNA-interaction motif	motiv interakce tRNA v P místě
RAxML	Randomized Axelerated Maximum Likelihood	
RecA	recombination protein A like subdomain	recombination protein A podobná subdoména
RelA	bifunctional (p)ppGpp synthase	bifunkční (p)ppGpp syntetáza
RF1	release factor 1	uvolňovací faktor 1
RF2	release factor 2	uvolňovací faktor 2
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomal ribonucleic acid	ribozomální ribonukleová kyselina
RPPs	ribosomal protection proteins	ribozomální ochranné proteiny
S	Svedberg unit	Svedbergova jednotka
SD	Shine-Dalgarno sequence	Shine-Dalgarno sekvence
SpoT	bifunctional (p)ppGpp synthetase/hydrolase	bifunkční (p)ppGpp syntetáza/hydroláza
SRA	stationary-phase-induced ribosome-associated protein	ribozom-vazebný protein při stacionární fázi
TMD	transmembrane domain	transmembránová doména
tmRNA/ssrA	transfer-messenger RNA/small stable RNA	transfer-messenger RNA/small stable RNA
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
UFB	ultrafast bootstrap	
Uup-EQ2	ATPase-deficient mutant of Uup	mutant Uup bez schopnosti hydrolýzy ATP
wt	wild type	
YbiT-EQ2	ATPase-deficient mutant of YbiT	mutant YbiT bez schopnosti hydrolýzy ATP
YheS-EQ2	ATPase-deficient mutant of YheS	mutant YheS bez schopnosti hydrolýzy ATP

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Translace .....	2
2.1. Ribozomy a fáze translace u bakterií.....	2
2.2. Iniclace .....	3
2.3. Elongace .....	3
2.4. Terminace .....	4
2.5. Translační faktory .....	5
2.5.1. Změna abiotických faktorů prostředí.....	5
2.5.2. Působení antibiotik .....	6
2.5.3. Poškození mRNA .....	7
2.5.4. Přejchod do stacionární fáze růstu a vyčerpání živin.....	7
3. ABCF proteiny .....	9
3.1. Fylogeneze a taxonomie .....	9
3.2. Distribuce.....	11
3.3. Struktura .....	13
4. Rozdělení ABCF proteinů u bakterií dle jejich biologické funkce .....	15
4.1. ARE proteiny .....	15
4.1.1. Antibiotika .....	15
4.1.2. Rezistence .....	16
4.1.2.1. Mechanismus rezistence ARE proteinů .....	18
4.1.2.2. ABCF proteiny udílející rezistenci k streptograminům A, linkosamidům a pleuromutilinům.....	19
4.1.2.3. ABCF proteiny udílející rezistenci k streptograminům B makrolidům a jejich derivátům .....	20
4.1.2.4. ABCF proteiny udílející rezistenci k oxazolidinonům a fenikolům .....	21
4.2. Regulační proteiny .....	21
4.2.1. Protein EttA.....	21
4.2.1.1. Struktura.....	21
4.2.1.2. Regulace proteosyntézy .....	23
4.2.2. Uup, YbiT a YheS .....	24
5. Závěr .....	25
Seznam použité literatury .....	26



# 1. Úvod

Planeta Země se ve vesmíru utvořila zhruba před 4,5 miliardami let. Odhaduje se, že první živé organismy planetu obývaly již přibližně miliardu let poté. Primitivní organismy byly tvořeny nukleovými kyselinami a jednoduchými proteiny. Nejbližší potomci těchto jednoduchých organismů jsou s námi stále. Jsou to všudypřítomné bakterie a viry.

Ještě v období renesance člověk přímo o jejich existenci nevěděl. Nicméně dříve lidé, zejména při rozvoji pandemií uvažovali, že se nemoci šíří prostřednictvím malých částecek, které se vznášejí ve vzduchu, kontaminují zdroje vody a potraviny nebo se přenášejí zvířaty. Velmi známé jsou historické kresby morových doktorů, kteří se snažili během pandemie chránit před nákazou pevným kabátem, neprodyšnými botami, rukavicemi a maskou s dlouhým zobákem, do kterého si vkládali léčivé byliny.

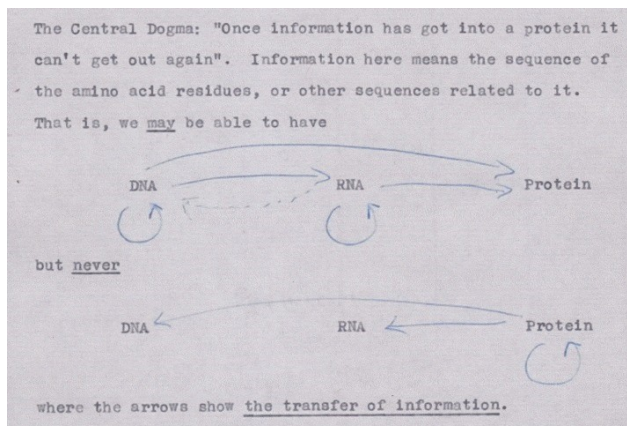
První, kdo pozoroval bakterie, byl nizozemský obchodník Antoni van Leeuwenhoek, který sestrojil v 17. století první mikroskop. Kresby jeho pozorování se dochovaly dodnes. Bakterie, které byly také předmětem jeho pozorování, pojmenoval *animacules*. Leeuwenhoekovu práci můžeme považovat za začátek nové vědní disciplíny – mikrobiologie, která se právě mikroorganismy zabývá.

V dalších stoletích došlo k mohutnému rozvoji mikrobiologie a dalších molekulárně-biologických věd. Dnes máme možnost studovat chování a buněčné procesy na molekulární úrovni. Jedním z těchto, relativně dobře probádaných, procesů je i bakteriální proteosyntéza, buněčné kompartmenty a proteiny, které ji zajišťují a regulují. Ale známe je skutečně tak detailně?

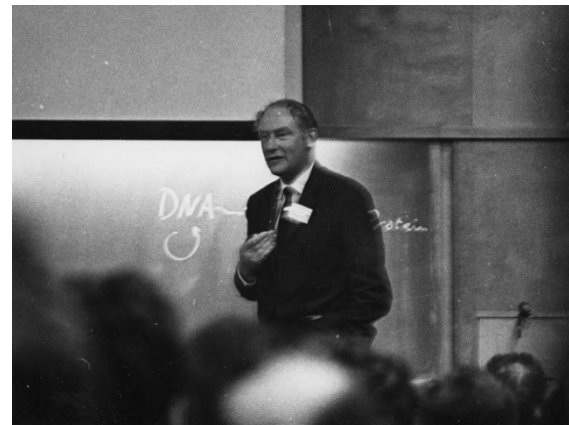
Cílem mojí práce bylo zabývat se bakteriálními ABCF proteiny (ATP-binding cassette type F protein family) a shrnout o nich doposud známé informace. Proteiny z této rodiny se vážou na ribozom, a tak dokáží ochránit ribozom před působením antibiotik, která se na něj navazují. Dále se předpokládá, že ABCF proteiny působí jako regulátory translace. Mnoho ABCF proteinů však nebylo doposud prozkoumáno a jejich funkce je neznámá.

## 2. Translace

Replikace, transkripce a translace jsou jedny z nejdůležitějších procesů odehrávajících se v živých organismech. Ještě v polovině minulého století jsme nevěděli, jak proteosyntéza funguje. Jednu z prvních myšlenek vyslovili v roce 1961 F. Jacob a J. Monod: „*Synthesis of individual protein may be provoked or suppressed under the influence of specific external agents.*“ Předpověděli existenci malé nestabilní molekuly, která zprostředkovává přenos genetické informace DNA do struktury proteinu. Problémem se také zabýval F. Crick, který v roce 1953, spolu s J. Watsonem popsal strukturu DNA (deoxyribonukleové kyseliny). Roku 1970 publikoval F. Crick článek Central dogma of molecular biology. Crick tvrdil, že tok genetické informace je jednosměrný. Sekvence DNA je ve stejném pořadí přepsána do RNA a podle té se syntetizuje protein (viz. obrázek 1 a 2). Později bylo dokázáno, že je v přírodě možné podle RNA (ribonukleové kyseliny) vytvořit komplementární DNA sekvenci pomocí enzymů zvaných reverzní transkriptázy. Tato strategie byla objevena u retrovirů (Temin & Mizutani, 1970).



Obrázek 1 – Crickův první náčrt centrálního dogma molekulární biologie, který měl ve svých poznámkách v roce 1956 – dávno před tím, než teorii publikoval (Cobb, 2017).



Obrázek 2 – Crick přednášející na sympoziu v Cold Spring Harbor roku 1963. V pozadí je vidět náčrt centrálního dogma (Cobb, 2017).

Translace je proces odehrávající se ve všech živých buňkách. Jedná se o přepis nukleotidové sekvence RNA do aminokyselinové sekvence proteinu, který se odehrává na ribozomu.

### 2.1. Ribozomy a fáze translace u bakterií

Ribozomy jsou ribonukleoproteinové komplexy nacházející se v každé živé buňce. Jsou nezbytné pro tvorbu proteinů v organismu. Poměr rRNA (ribosomální RNA) a proteinů v ribozomech je zhruba 2:1 – rRNA tvoří katalyticky aktivní místo ribozomu, proteiny udržují jeho terciární strukturu a jsou převážně na jeho povrchu. Ribozomy se skládají ze dvou nestejně velkých podjednotek. U bakterií a archea označujeme malou podjednotku 30S (Svedbergova jednotka). Skládá se z 1500 nukleotidů 16S RNA a 20 – 21 proteinů, které slouží ke kontrole

správnosti translace nebo jako translační faktory. Velká 50S podjednotka je tvořena 3000 nukleotidy 23S, 5S RNA a 31 – 35 proteiny. Velká podjednotka zodpovídá za katalytickou aktivitu a utváření proteinů (Davidovich *et al.*, 2010). V porovnání s ostatními buněčnými kompartmenty je ribozom poměrně velký. Buňky jich mohou obsahovat několik tisíc. Čím rychleji rostou, tím více ribozomů obsahují.

V ribozomu jsou 4 vazebná místa pro tRNA (transferovou tRNA): A (acceptor) site: navázání tRNA; P (peptidyl) site: tvorba peptidové vazby, translokace tRNA; E (exit) site: odchod vybité tRNA a vazebné místo pro mRNA (mediátorovou RNA).

## 2.2. Iniclace

U bakterií jedna molekula mRNA kóduje více proteinů, takovou mRNA označujeme jako polycystronní. Na mRNA najdeme Shine-Dalgarno (SD) sekvenci, která se váže k 16S RNA na malé ribozomální podjednotce. Poté se k 30S podjednotce připojí 50S podjednotka. Díky SD sekvenci je start kodon AUG nasměrován do P místa ribozomu. Na ribozomu je připravená iniciační tRNA, která do proteinu zařazuje první aminokyselinu – formylmethionin, ten však bývá často později odštěpen. Molekula mRNA je čtena ve směru 5' - 3'.

Dále se na iniciaci u bakterií podílejí tzv. iniciační faktory (IF): IF3 blokuje navázání tRNA do A místa, IF2 je spolu s fMET-tRNA (tRNA s navázaným formylmethioninem) v P místě a má GTPázovou aktivitu. Po hydrolyze GTP (guanosintrifosfátu) se iniciační faktory uvolní a nasedá na komplex velká 50S ribozomální podjednotka, IF3 kontroluje nasednutí velké 50S podjednotky tak, aby nasedla až po připojení mRNA a fMET-tRNA do P místa.

## 2.3. Elongace

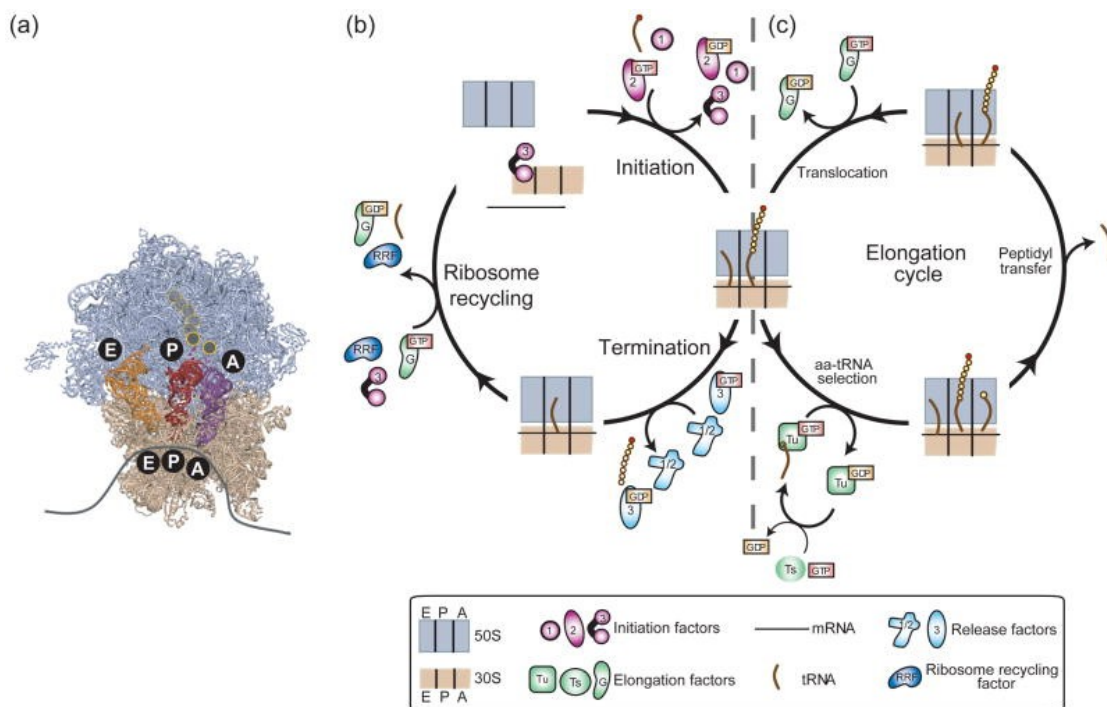
Na A místo v ribozomu vstoupí další nabitá aa-tRNA v komplexu s elongačním faktorem EF-TU (elongation factor thermo unstable). Pokud jsou triplety mRNA a aa-tRNA komplementární, dochází k hydrolyze GTP. Kdyby se triplety nespárovaly, tak by se jednoduše nemohl navázat elongační faktor EF-TU a neproběhla by GTPázová reakce, jejíž energie se využívá právě na kontrolu přesnosti připojení.

Když je správná aa-tRNA (aminoacyl-tRNA) v místě A, dochází k tvorbě peptidické vazby katalyzované velkou 50S podjednotkou. Rostoucí polypeptid se přesouvá z tRNA navázané na místě P na tRNA v místě A. Poté je za účasti elongačního faktoru EF-G (elongation factor G), který způsobuje konformační změnu ribozomu a energie z hydrolyzy další molekuly GTP, tRNA s rostoucím polypeptidem je přesunuta z A místa do P místa. Nenabitá tRNA se z místa P translokuje do místa E, opouští ribozom a může být opětovně použita. Místo A je prázdné a připravené na připojení další příslušné aa-tRNA.

## 2.4. Terminace

Ribozom se pohybuje po mRNA, připojuje aminokyseliny do polypeptidu a dojde ke stop kodonu. Na stop kodon se neváže tRNA, ale uvolňovací faktory (RF): RF1 rozeznává stop kodony UAA a UAG, RF2 rozeznává UAA a UGA (Scolnick *et al.*, 1968). Uvolňovací faktory změni funkci peptidyltransferázy a místo aminokyseliny přidají na konec polypeptidového řetězce vodu. Polypeptid je tak odštěpen, může být dále modifikován a ribozomální podjednotky se od sebe oddělí. Podjednotky se mohou zase znovu spojit a zahájit tak další translaci.

Připojení jedné aminokyseliny do proteinu je velmi energeticky náročné: k připojení aminokyseliny na 3'OH konec tRNA je potřeba 1 ATP (adenosintrifosfát), při elongaci se spotřebují 2 GTP, dále se spotřebuje 1 GTP při iniciaci GTPázovou aktivitou IF2 a 1 GTP při terminaci. Rostoucí bakteriální buňka spotřebuje 80% energie na syntézu proteinů a rRNA (Stouthamer & Bettenhausen, 1973). Celý proces translace je zjednodušeně znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3 – schéma bakteriálního translačního aparátu: a) Ribozom: béžová malá podjednotka a modrá velká podjednotka, v místě A je navázána tRNA nesoucí novou aminokyselinu, v místě P je tRNA s vznikajícím polypeptidem a v místě E je odcházející vybitá tRNA, ribozomem prochází molekula mRNA. (b,c) Iniciace translace: navázání fMET-tRNA na mRNA, skládání ribozomu, hydrolýza GTP za účasti iniciačních faktorů. Dále se polypeptidový řetězec prodlužuje: nasazení další aa-tRNA, peptidyltransferázová reakce, translokace a posunutí ribozomu k dalšímu kodonu. Při terminaci ribozom dorazí ke stop kodonu a za účasti RFs syntéza polypeptidu končí. Ribozom se rozpadá a je využit k dalším syntézám polypeptidů (Fei *et al.*, 2010).

## 2.5. Translační faktory

U experimentů prováděných v laboratoři, jsou bakterie kultivovány za ideálních podmínek k růstu. Ovšem bakterie, které žijí přirozeně, jsou vystaveny nepříznivým vlivům prostředí. Velmi časté jsou změny teplot, vyčerpání hlavní živiny v okolí, kompetice s ostatními druhy, použití antibiotik nebo zánik hostitelského prostředí.

Mikroorganismy musí na tyto změny v prostředí flexibilně reagovat – regulovat syntézu proteinů, a měnit tak složení svého proteomu. Jednou z možností regulace je ovlivnění translace. Zde se uplatňují stresové translační faktory. Jsou to proteiny, které působí na ribozomy a díky tomu ovlivňují produkci proteinů během buněčného stresu.

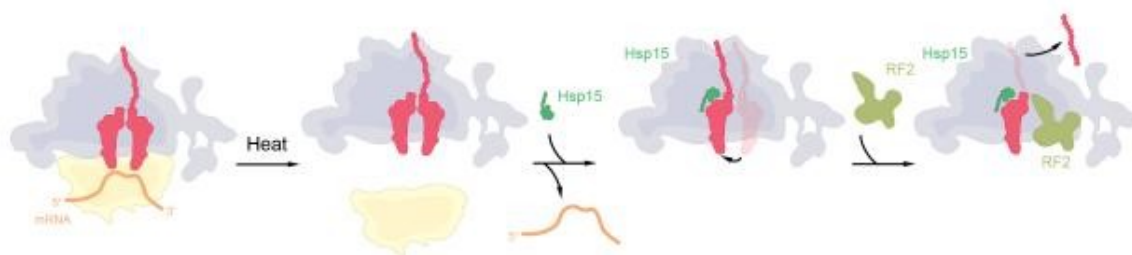
Kromě translačních faktorů popsaných v předchozích kapitolách bylo v posledních letech u bakterií popsáno mnoho dalších – stresových translačních faktorů, které můžeme rozdělovat do skupin podle toho, v jaké situaci se uplatňují. O funkci některých translačních faktorů, uplatňujících se při buněčném stresu, bývá mnohdy k dispozici málo informací.

### 2.5.1. Změna abiotických faktorů prostředí

Mezi abiotické faktory patří například: teplota nebo pH. Při jejich snížení a také při oxidativním stresu, vlivem detergentů a antimikrobiálních peptidů se uplatňuje paralog elongačního faktoru EF-G, BipA (BPI-inducible protein A). Faktor BipA je rozšířen mezi bakteriemi a chloroplasty, ale nevyskytuje se v organismech, které mají redukované genomy (Leipe *et al.*, 2002; Margus *et al.*, 2007). Mutantní kmeny s deletovaným genem *bipA* vyrostly při optimální teplotě 37 °C nepoškozené, stejně jako wt (wild type) kmeny. Avšak při snížení teploty na 20 °C byly buněčné struktury a ribozomy u *bipA* mutanty značně poškozeny. Faktor BipA je pravděpodobně zodpovědný za správné skládání ribozomu (Choi & Hwang, 2018).

Při vystavení bakterií vysoké koncentraci Mg<sup>2+</sup> (hořečnatých kationtů), K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> (telluricitanu draselnému) nebo penicilinu G dokáže další paralog elongačního faktoru EF-G, elongační faktor EF4 *in vitro* zpětně translokovat tRNA z E místa do P místa a z P místa do A místa a pravděpodobně se tak děje i v živých organismech. Elongační faktor EF4 je rozšířen mezi bakteriemi, mitochondriemi a chloroplasty (Qin *et al.*, 2006; Balakrishnan *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016).

Zajímavý je také protein Hsp15 (heat shock protein 15), o němž by se dalo říct, že funguje jako „záchranný faktor.“ Když se teplota v okolí buněk *Escherichia coli* rychle zvýší nad ideální hodnotu pro jejich růst, ribozom se při proteosyntéze rozpadne. Na 50S podjednotku je stále připevněna tRNA s polypeptidovým řetězcem. Protein Hsp15 dokáže tRNA od 50S podjednotky a polypeptidu oddělit. Ribozom může být použit k další translaci (Korber *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2009). Mechanismus působení Hsp15 je popsán na obrázku 4.



Obrázek 4 – mechanismus působení proteinu Hsp 15: při zvýšení teploty se ribozom rozpadá, naváže se na něj Hsp 15, stabilizuje peptidyl-tRNA v P místě a uvolňuje se mRNA. Společně s faktorem RF2, který hydrolyzuje esterovou vazbu mezi tRNA a peptidovým řetězcem, je uvolněna 50S podjednotka (Starosta *et al.*, 2014).

### 2.5.2. Působení antibiotik

Antibiotika jsou baktericidní nebo bakteriostatické látky, které se začaly hojně využívat k léčbě, nejen bakteriálních infekcí, ve 40. letech minulého století.

Jedním velmi často používaným širokospektrálním antibiotikem je tetracyklin, který se začal masově používat v medicíně v 50. letech minulého století. Byl účinný na běžné bakteriální infekce, ale kromě toho potlačoval také chlamydiové infekce, mykoplazmata, rickettsie, protozoa a zpočátku se na něj neobjevovala rezistence jako na penicilin (Chopra & Roberts, 2001). Působí tak, že se váže do A místa 30S podjednotky a inhibuje proteosyntézu – znemožní připojení aa-tRNA (Brodersen *et al.*, 2000; Pioletti *et al.*, 2001). Proteiny TetM a TetO (tetracycline resistance protein M and O) patří mezi tzv. ribosomal protection proteins (RPP) neboli ribozomální ochranné proteiny. Jsou to homology elongačního faktoru EF-G a způsobují rezistenci k tetracyklinu (Connell *et al.*, 2003). Oba ochranné proteiny se vážou na ribozom a vyvazují tetracyklin z A místa. Prolin na špičce smyčky III proteinu TetM zasahuje přímo do vazebného místa tetracyklinu a rozrušuje jeho vazbu k tomuto místu (Arenz *et al.*, 2015).

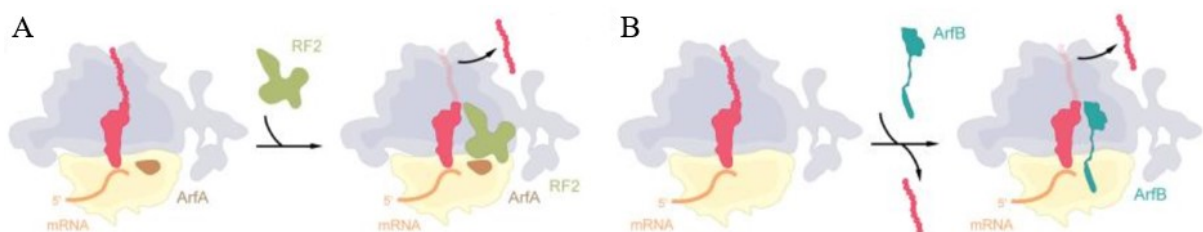
K dalším translačním faktorům způsobujícím rezistenci, v tomto případě ke kyselině fusidové, poprvé izolované začátkem 60. let z vřecovýtrusé houby *Fusidium coccineum* (Godtfredsen *et al.*, 1962), patří faktory Fus(A-E) (fusidic acid resistance protein (A-E)), které se vyskytují u stafylokoků. Kyselina fusidová blokuje ribozom s navázaným faktorem EF-G. Předpokládá se, že zabráňuje konformačním změnám EF-G nutným k jeho uvolnění z ribozomu a pokračování proteosyntézy (Bodley *et al.* 1969). Bylo objeveno, že FusB se váže na EF-G zablokováného ribozomu a následně ho z něj uvolní. Vazebné místo pro FusB na EF-G je poměrně daleko od vazebného místa kyseliny fusidové, proto se předpokládá, že rezistence není způsobena překryvem vazebného místa na EF-G pro kyselinu fusidovou (Guo *et al.*, 2012).

Proti dalším antibiotikům, která mají svá vazebná místa na ribozomech, chrání buňky skupina ARE proteinů patřících do podrodiny ABCF proteinů. Těmito proteiny se zabýváme v samostatné kapitole ARE proteiny.

### 2.5.3. Poškození mRNA

Někdy se může stát, že translace není ukončena stop kodonem, ale ribozom narazí na 3' konec mRNA, která byla přerušena. Záchranné faktory ArfA a ArfB (alternative ribosome-rescue factor A and B) uplatňující se u *Escherichia coli*, se vážou na ribozom, ve kterém je uvíznutá mRNA bez stop kodonu. Faktor ArfA indikuje navázání RF2 do A místa a uvolní tak navázanou peptidyl-tRNA (Pech & Nierhaus, 2012).

Faktor ArfB funguje podobně. Pokud mRNA neobsahuje stop kodon nebo je složena z neobvyklých kodonů, katalyzuje hydrolýzu peptidyl-tRNA. Ribozom může být recyklován (Handa *et al.*, 2011). Působení těchto záchranných faktorů je znázorněno na obrázku 5. Oba faktory působí jako záložní k tmRNA/ssrA (transfer-messenger RNA/small stable RNA) systému, který řeší stejný problém a dokáže ukončit translaci v kódujícím úseku mRNA (Karzai *et al.*, 1999).



Obrázek 5 – schéma působení záchranných proteinů ArfA a ArfB při poškození mRNA: a) hnědý ArfA společně s zeleným RF2. b) smaragdově zelený ArfB (Starosta *et al.*, 2014).

### 2.5.4. Přejít do stacionární fáze růstu a vyčerpání živin

Stacionární fáze růstu bakteriální kultury souvisí zpravidla s vyčerpáním klíčových živin v médiu. Buňky v této fázi nerostou a nemnoží se. Buněčnou odpověď na tyto podmínky nazýváme jako stringentní. Při nedostatku živin, nemožnosti syntetizovat nové aminokyseliny a nahromadění nenabitě tRNA, se faktor RelA (bifunctional (p)ppGpp synthase) váže do A místa ribozomu a způsobuje syntézu alarmonu pppGpp (guanosinpentafofátu) na úkor ATP a GTP (Haseltine & Block, 1973). Alarmon pppGpp je ihned přeměňován na ppGpp (guanosintetrafofát) enzymem SpoT (ppGpp synthetase/hydrolase). PpGpp v buňce figuruje jako druhý posel. Ovlivňuje tak genovou expresi a je odpovědný za stringentní odpověď. Celkově tento mechanismus snižuje míru translace, podporuje využití již syntetizovaných aminokyselin a najdeme ho u  $\gamma/\beta$  – proteobakterií (Atkinson *et al.*, 2011).

Mezi faktory zastavující translaci patří také MazEF TA (Endoribonuclease toxin MazF and antitoxin MazE) systémy. U *E. Coli* toxin MazF preferenčně štěpí mRNA v ACA sekvenci, ale také 16S rRNA na 30S ribozomální podjednotce, a odstraní tak SD a aSD (anti-Shine-Dalgarno) sekvenci. Toxin MazF může být inaktivován antitoxinem MazE (Vesper *et al.*, 2014).

Další možností regulace je ovlivnění funkce ribozomu. Protein SRA (stationary-phase-induced ribosome-associated protein) se pevně váže na 30S ribozomální podjednotku a dříve

se myslelo, že je součástí ribozomu. Při stacionární fázi se počet SRA v buňce zvyšuje. Přesná funkce SRA není známá, ale u mutantů s delecí genu *sra* se při stacionární fázi utvořily nefunkční 100S ribozomy. Protein SRA byl objeven u enterobakterií (Izutsu *et al.*, 2001).

Na poměr ATP/ADP v buňce reaguje protein EttA (energy-dependent translational throttle A) patřící do rodiny ABCF proteinů. Pokud je v buňce vyšší poměr ADP ku ATP, EttA se váže do E místa ribozomu během iniciační fáze translace, kde zabraňuje vzniku první peptidové vazby, interaguje s L1 ribozomální doménou a tRNA navázanou v P místě. Tím se translace zastaví. Pokud počet molekul ATP převyší počet ADP, EttA se uvolní a translace může pokračovat (Boël *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). O detailech regulace translace proteinem EttA a dalšími ABCF proteiny se zmiňují v následujících kapitolách.



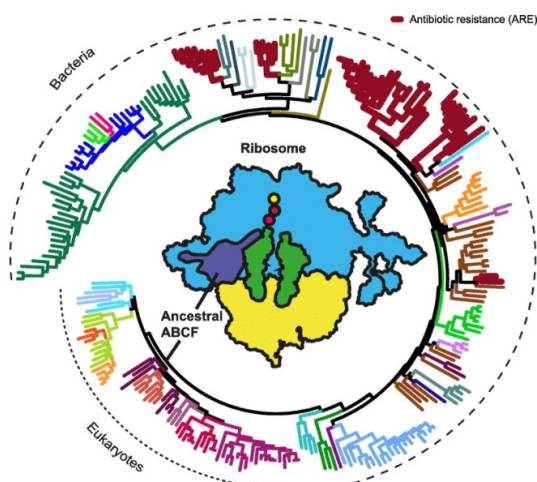
### 3. ABCF proteiny

ABCF proteiny patří mezi hojně rozšířenou, evolučně velmi starou a konzervovanou proteinovou skupinu ze superrodiny ABC (ATP-binding cassette) proteinů. Najdeme je téměř ve všech bakteriálních a eukaryotických genomech – například u člověka najdeme 3, u *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Arabidopsis thaliana* obsahuje 2, *Escherichia coli* má 4 (Boěl *et al.*, 2014).

Proteiny z dalších rodin ABC proteinů: ABCA – ABCH (ATP-binding cassette type A-H), hrají až na výjimky důležitou roli v buněčném transportu – importu důležitých látek z okolí, exportu toxinů. Výjimkou jsou proteiny patřící do ABCE a ABCF rodin (ATP-binding cassette type E or F), ty transportéry nejsou. Fylogeneticky nejbližší jsou k ABCF proteinům proteiny z rodiny ABCE (Murina *et al.*, 2019). Tyto proteiny se navazují na ribozomy, kde jsou součástí translačního aparátu a vyskytují se u eukaryot a archea (Mancera-Martínez *et al.*, 2017). Úlohou ABCF proteinů je ochrana bakteriální buňky před působením antibiotik, která se vážou na ribozom, tyto antibioticko-rezistenční proteiny označujeme zkratkou ARE nebo pravděpodobně působí jako translační faktory, a chrání tak buňku před dalšími nepříznivými vlivy okolí. U mnoha ABCF proteinů nebyla přesně nebo nebyla vůbec objevena jejich funkce. Dnes je známá přesná funkce u proteinu EttA, který figuruje jako translační faktor a u rezistenčních proteinů.

#### 3.1. Fylogeneze a taxonomie

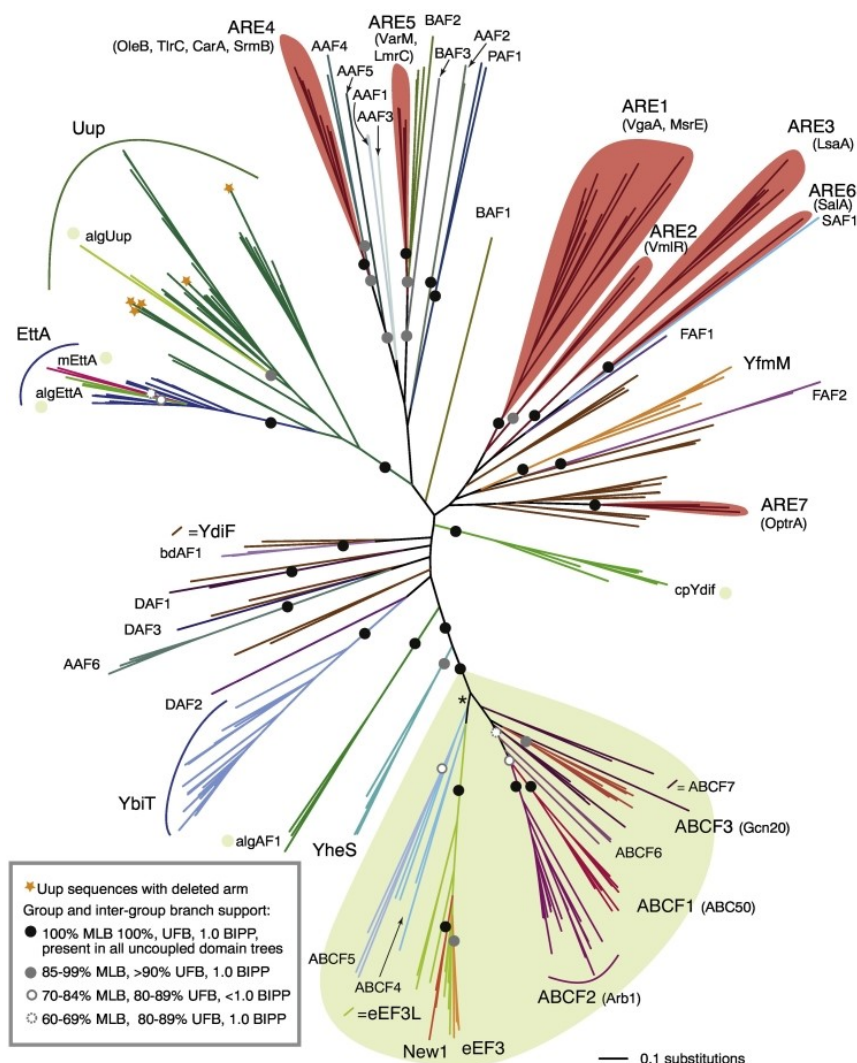
Geny, které kódují ABCF proteiny byly celkem nalezeny v 4505 genomech bakterií a eukaryot. Při hledání pomocí lokálního BlastP (Basic Local Alignment Search Tool P) vyhledávání v sekvenčních taxonomických databázích NCBI (National Center for Biotechnology Information) a vytvoření HMM (Hidden Markov model) pro lepší klasifikaci bylo nalezeno 16 848 homologních sekvencí rozdělených do 45 podrodin: 15 podrodin je eukaryotických a 30 bakteriálních. Z celkového počtu patří 7 podrodin mezi ARE proteiny. Jejich distribuce je zobrazena na obrázku 6. Eukaryotický genom obsahuje průměrně 5 ABCF proteinů a bakteriální 4. Předpokládá se, že jejich poslední společný předek ABCF proteinů měl (Murina *et al.*, 2019).



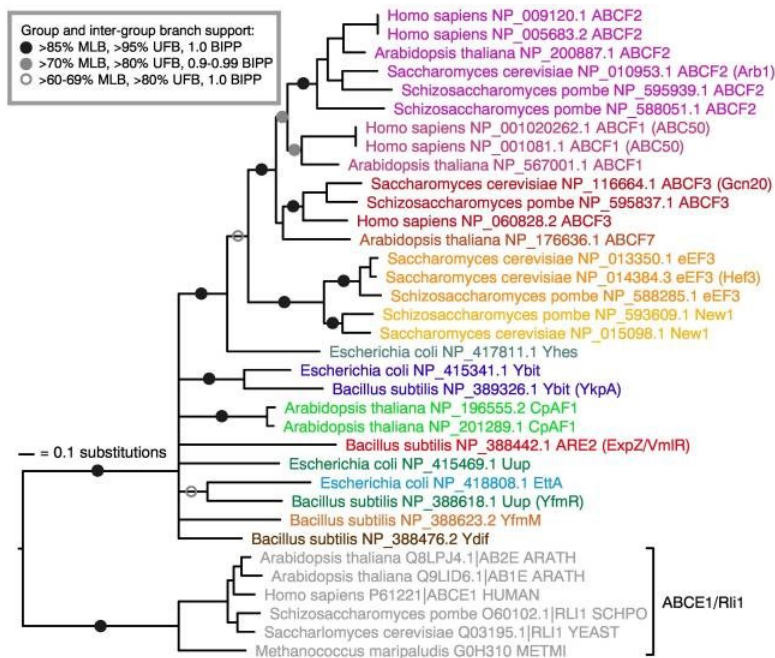
Obrázek 6 – schéma distribuce ABCF proteinů mezi organismy. Fialově je ABCF protein, který je navázán na ribozom, zeleně peptidyl-tRNA, modře 50S ribozomální podjednotka, žlutě 30S podjednotka (Murina *et al.*, 2019).

Fylogenetické zařazení ABCF proteinů do skupin je, převážně kvůli horizontálním a vertikálním genovým transferům, mutacím, duplikacím genomů a ztrátám genetického materiálu, velmi obtížné. V čase se s novými poznatky měnilo a pravděpodobně bude doplněno, (Davidson *et al.*, 2008; ter Beek *et al.*, 2014; Murina *et al.*, 2019).

Analýza se prováděla pomocí programu RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood), který se využívá k fylogenetickým analýzám velkých datových souborů při maximální pravděpodobnosti (Stamatakis, 2014). V analýze se rozlišují 3 hodnoty: MLB (maximum likelihood bootstrap, 0 – 100 %), UFB (ultrafast bootstrap, 0 – 100 %) a BIPP (Bayesian inference posterior probability, = nebo <1). Dle těchto hodnot byl sestaven fylogenetický strom ABCF proteinů, který je na obrázku 7 a 8. Čím vyšší jsou tyto hodnoty, tím jsou si proteiny evolučně bližší, například hodnoty pro EttA a Uup jsou: 100 % MLB, 100% UFB, 1.0 BIPP. To znamená, že tyto proteiny mají společného předka (Murina *et al.*, 2019).



Obrázek 7 – fylogenetický strom ABCF proteinů: světle zeleně jsou lemované eukaryotické ABCF proteiny, ostatní jsou bakteriální včetně červeně lemovaných ARE proteinů. Čím tmavší je tečka u rozdělení vývojových větví, tím jsou si evolučně bližší. Podrodiny ABCF proteinů s hodnotou MLB menší než 60 % vyobrazeny nejsou (Murina *et al.*, 2019).



Obrázek 8 – na tomto fylogenetickém stromě je vidět blízká příbuznost ABCF proteinů s proteinovou rodinou ABCE. YheS, který se vyskytuje u bakterií, je nejbližší příbuzný eukaryotickým ABCF proteinům. Podrodiny s hodnotou MLB menší než 60 % vyobrazeny nejsou (Murina *et al.*, 2019).

### 3.2. Distribuce

Rodina ABCF proteinů je díky jejich velkému rozšíření mezi organismy velmi důležitou proteinovou skupinou. U archeí se spíše nevyskytují, byly prokázány jen u *Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*, *Methanomethylophilus alvus*, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, *Thermoplasmatales archaeon BRNA1* a vždy pouze protein YdiF. Pravděpodobně budou ABCF proteiny nalezeny u dalších archeí, mnoho archeálních genomů nebylo dosud sekvenováno. U 214 bakteriálních druhů, z odlišných kmenů, ABCF proteiny zcela chybí. Jedná se zejména o endosymbiotické organismy. Pouze u zástupců kmene *Aquificae* chybí úplně. Dále jsou zastoupeny u všech eukaryotních organismů krom: *Postia placenta* (bazidiomycety), *Enterocytozoon bieneusi* (mikrosporidie) a *Theileria*, *Babesia*, *Eimeria* (apikomplexa), (Murina *et al.*, 2019). Tabulku popisující distribuci

U eukaryotických ABCF proteinů je funkce známá například u eEF3, který se vyskytuje v houbách a jeho paralog u *Saccharomyces cerevisiae* (Sarchy *et al.*, 1998). Na ribozom se eEF3 (eukaryotic elongation factor 3) váže vedle E místa svou chromo a HEAT (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR) doménou a svým C-koncem interaguje s eEF1A (eukaryotic elongation factor 1A). Tato interakce je nezbytná pro elongaci *in vivo*. Předpokládá se, že eEF1A váže aa-tRNA-eEF1A-GTP komplex do A místa a odstraňuje nenabitou tRNA z E místa na ribozomu (Anand *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2006).

Z bakteriálních ABCF proteinů je nejrozšířenější podrodina YdiF následovaná podrodinou Uup, EttA a YbiT (Murina *et al.*, 2019). V tabulce na další straně jsou vypsány všechny ABCF proteinové podrodiny spolu s jejich rozšířením mezi organismy a funkcí, pokud byla objevena. Funkce bakteriálních ABCF proteinů rozeberu v následujících kapitolách.

Tabulka 1 – tato tabulka tvoří souhrn 45 podrodin ABCF proteinů, jejich výskytu a funkcí. V prvním sloupci jsou názvy podrodin, v druhém a třetím počet kmenů a druhů, u kterých se daná proteinová podrodina vyskytuje, čtvrtý sloupec obsahuje výčet vlastností a kmenů jejich výskytu (Murina *et al.*, 2019).

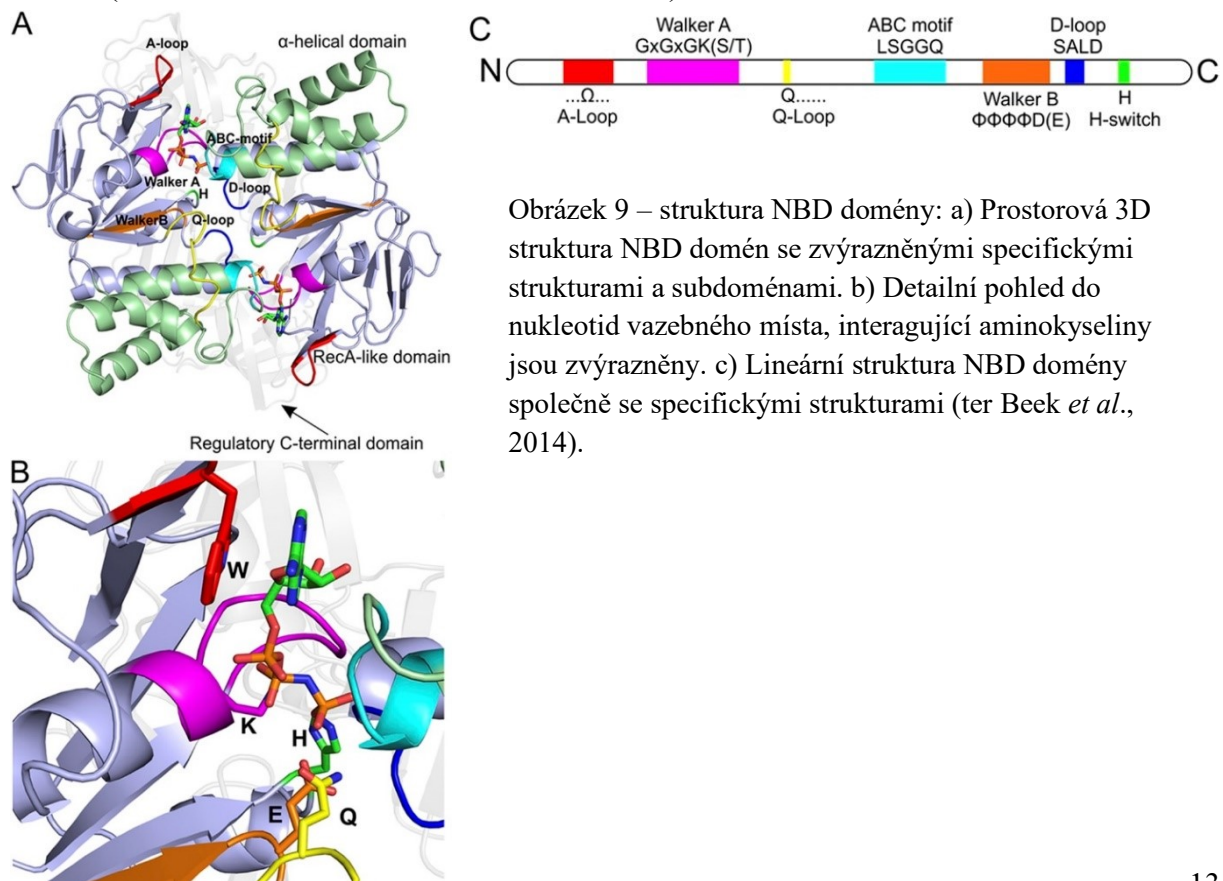
Podrodina	N kmenů	N druhů	Poznámky k funkci a taxonomickému zařazení
YdiF	42	1852	hojně rozšířený mezi bakteriemi; polyfyletický
Uup	24	3104	hojně rozšířený mezi bakteriemi; parafyletický k EttA; rezistenční TaeA
EttA	18	2337	hojně rozšířený mezi bakteriemi; translační faktor
YbiT	15	1874	hojně rozšířený mezi bakteriemi; pravděpodobně translační faktor
BAF2	7	305	Proteobacteria, Planctomycetes, Spirochaetes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Cyanobacteria
ARE1	6	269	rezistenční VgaA, MsrA, MsrE; Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Tenericutes
ARE3	5	261	rezistenční LsaA; Firmicutes, Spirochaetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria
DAF1	5	58	Spirochaetes, Proteobacteria, Deferribacteres, Fibrobacteres, Chlamydiae
YfmM	5	587	Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes
YheS	5	1234	Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Arthropoda, Elusimicrobia
BAF3	4	111	Bacteroidetes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Elusimicrobia
DAF2	4	24	Proteobacteria, Planctomycetes, Spirochaetes, Omnitrophica
ARE2	2	54	rezistenční VmlR; Firmicutes, Tenericutes
ARE4	2	173	rezistenční CarA, SrmB, TlrC, OleB; Actinobacteria, Chloroflexi
ARE5	2	408	rezistenční VarM, LmrC; Actinobacteria, Proteobacteria
BAF1	2	20	Firmicutes, Actinobacteria
PAF1	1	138	Proteobacteria
AAF1	1	313	Actinobacteria
AAF2	1	301	Actinobacteria
AAF4	1	219	Actinobacteria
AAF6	1	649	Actinobacteria
AAF3	1	8	Actinobacteria
AAF5	1	25	Actinobacteria
ARE6	1	8	rezistenční SalA; Firmicutes
ARE7	1	35	rezistenční OptrA; Firmicutes
BdAF1	1	176	Bacteroidetes
DAF3	1	36	Proteobacteria
FAF1	1	37	Firmicutes
FAF2	1	42	Firmicutes
SAF1	1	66	Firmicutes
ABCF2	27	560	hojně rozšířená podrodina, ale chybí u Apicomplexa a Microsporidia
ABCF1	23	376	objevena u rostlin, různých řas a opisthokont krom hub
ABCF7	16	131	rostliny, různé řasy, Alveolata, Excavata a Microsporidia
ABCF3	13	382	opisthokonta
eEF3L	9	83	různé řasy, Chytridiomycota a Choanoflagellata
ABCF4	7	37	různé řasy a Filozoa
ABCF5	7	105	různé řasy a houby
cpYdiF	7	85	různé řasy
algAF1	6	25	různé řasy
cpEttA	6	18	pravděpodobně chloroplast targeting proteiny; rostliny a různé řasy
algUup	5	17	různé řasy
ABCF6	5	17	různé řasy a Amoebozoa
mEttA	3	14	pravděpodobně mitochondriální targeting proteiny; různé řasy a Amoebozoa
New1	3	127	houby
eEF3	2	138	translační faktor; houby

### 3.3. Struktura

Rodina ABCF proteinů se od ostatních ABC proteinů liší absencí TMD (transmembrane domain) domén. Doména vázající a hydrolyzující ATP – NBD (nucleotide binding domain) je konzervovaná u všech ABC proteinů. Pro svou katalytickou funkci vyžaduje hořčnaté kationty (Markham *et al.*, 1980). Celkem u ABCF proteinů rozlišujeme 2 NBD domény: ABC1 a ABC2 (Boěl *et al.*, 2014). Každá z těchto domén se skládá přibližně z 200 aminokyselin a dvou subdomén: větší RecA-like, kterou najdeme i u dalších ATPáz a alfa-helikální doménu, kterou mají pouze ABC proteiny. (Beek *et al.*, 2014).

Domény NBD obsahují specifické konzervované struktury: smyčky A-loop, P-loop neboli Walker A motiv (GXXGXXGK(S/T)), Q-loop, ABC motiv (LSGGQ), Walker B motiv ( $\phi\phi\phi\phi$ DE), D-loop (SALD) a H-loop (Walker *et al.*, 1982, Davidson *et al.*, 2008; ter Beek *et al.*, 2014). Struktura NBD domény je znázorněna na obrázku 9.

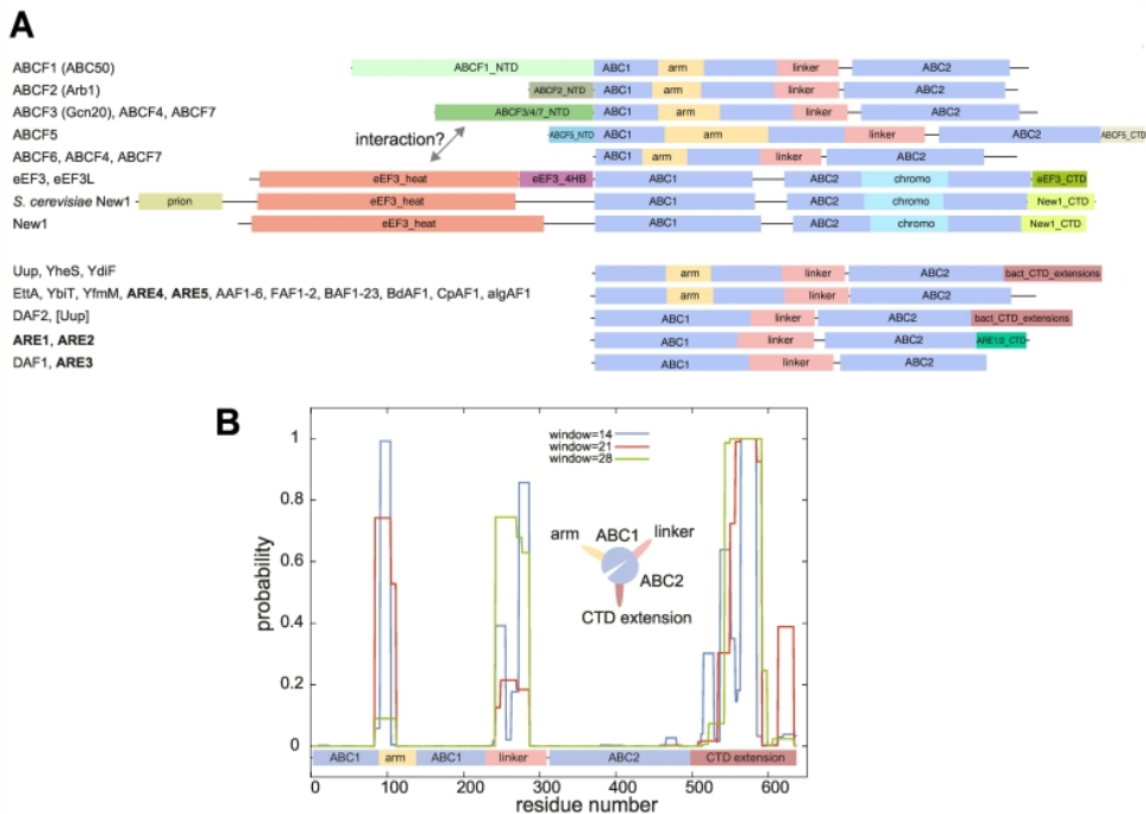
A-loop smyčka obsahuje obvykle tyrozinový aromatický zbytek, který využívá patrové interakce s adeninem, aby udržel ATP na správném místě. S Walker A motivem, se díky lyzinovému konci, vážou  $\beta$ - a  $\gamma$ - fosfáty ATP. V Q-loop smyčce má důležitou funkci glutaminový zbytek, který formuje aktivní místo NBD domény, a u ABC transportérů také interaguje s TMD doménou. ABC motiv najdeme pouze v alfa-helikálních doménách ABCs a uděluje jim kladný náboj. Walker B motiv obsahuje 4 hydrofobní aminokyseliny ( $\phi$ ) a stabilizuje hořčnatý kationt. Monomery D-loop smyček se skládají podél sebe do dimerického útvaru a změna jejich konformace mění katalytické místo. Histidinový zbytek v H-loop smyčce reaguje s aspartátem v D-loop a  $\gamma$ -fosfátem ATP. Chrání katalytické místo před vniknutím vody, pomáhá na svém místě udržovat glutamátový zbytek Walker B motivu a hořčnatý kationt (Davidson *et al.*, 2008; ter Beek *et al.*, 2014).



Obrázek 9 – struktura NBD domény: a) Prostorová 3D struktura NBD domén se zvýrazněnými specifickými strukturami a subdoménami. b) Detailní pohled do nukleotid vazebného místa, interagující aminokyseliny jsou zvýrazněny. c) Lineární struktura NBD domény společně se specifickými strukturami (ter Beek *et al.*, 2014).

Dále u ABCF proteinů nalezneme struktury pro ně typické. Z ABC1 domény vystupuje subdoména arm. U proteinu EttA u *Escherichia coli* je arm tvořena alfa-helikální vlásenkou složenou ze 45 aminokyselin. Subdoména složená z 81 aminokyselin – linker, spojuje ABC1 a ABC2 doménu. EttA dále obsahuje subdoménu toe v ABC2 doméně. Toe je antiparalelní beta-list složený z 12 aminokyselin (Boěl *et al.*, 2014).

Některé ABCF proteiny arm doménu ani linker neobsahují, namísto toho je do domény ABC2 vložena struktura zvaná chromo. U jiných jsou prodlužovány N a C konce (Murina *et al.*, 2019). Struktura domén ABCF proteinů je rozkreslena na obrázku 10.



Obrázek 10 – lineární struktura domén u vybraných ABCF podrodin a) Nahoře struktura eukaryotních ABCF podrodin, pod nimi struktura prokaryotních. Struktura eukaryotních je více různorodá a proteiny mají velmi často modifikované C a N konce. b) Předpovězená lineární struktura a schématický náčrt YheS u *Escherichia coli* (Murina *et al.*, 2019).

## 4. Rozdělení ABCF proteinů u bakterií dle jejich biologické funkce

U bakteriálních ABCF proteinů dnes rozlišujeme dvě funkce: udílejí rezistenci k antibiotikům, která působí na ribozom nebo účinkují jako regulátory translace. Antibioticko-rezistenční ABCF proteiny souhrnně nazýváme ARE proteiny a patří mezi ně proteiny: CarA, LmrC, LsaA, MsrA, MsrE, OleB, OptrA, SalA, SrmB, TaeA, TlrC, VarM, VgaA, VmlR. Nejprobádanější protein regulující translaci je EttA, který patří do stejnojmenné podrodiny. U proteinů z podrodin Uup, YbiT, YheS se odhaduje, že působí jako regulátory translace také, ale toto se prozatím s jistotou neprokázalo.

U dalších bakteriálních ABCF proteinových podrodin není známé, jak působí a víme o nich minimum informací. Podrodiny AAF(1-5) se vyskytují u streptomycet a pravděpodobně se podílejí na antibiotické rezistenci. Předpokládá se, že mezi ARE proteiny patří i proteiny z podrodin BAF(1-3), FAF(1-2) a PAF1. Funkce ostatních bakteriálních ABCF proteinových podrodin nebyla studována. Víme pouze to, v jakých bakteriálních kmenech se vyskytují (Murina *et al.*, 2019).

### 4.1. ARE proteiny

Antibioticko-rezistenční ABCF proteiny udílejí bakteriím rezistenci k antibiotikům, která se váže na ribozom, a inhibují tak proteosyntézu.

#### 4.1.1. Antibiotika

Antibiotika patří mezi chemické látky, které usmrcují mikroorganismy nebo inhibují jejich růst. Produkují-li je houby nebo bakterie, tak taková antibiotika nazýváme přírodní. V současné době se více využívají antibiotika syntetická, která jsou buď celá syntetizována *de novo* nebo jsou modifikována ta přírodní. Objev nových antibiotik se nedávno podařil i u nás v České republice, kdy byly zkombinovány dva linkosamidy: celesticetin a linkomycin. Výsledkem je antibiotikum zvané ODCELIN, které je v porovnání s komerčně užívanými antibiotiky velice účinné. Léčivo je ve fázi vývoje a klinicky se zatím netestovalo (Kadlcik *et al.*, 2017).

Ale ještě se vrátím k historii užívání antibiotik. Poprvé si jejich antimikrobiálního účinku všiml Alexandr Fleming v roce 1928, když po návratu z dovolené spatřil, že se mu na Petriho miskách s bakteriálními kulturami pomnožila plíseň a bakterie zahubila. Tehdy se jednalo o plíseň z rodu štětičkovec *Penicillium notatum*. Fleming svůj objev publikoval v roce 1929, ale nebyl schopen onu zázračnou látku, kterou nazval penicillin izolovat. (Fleming, 1929). Poprvé se izolace penicilinu zdařila o 10 let později na univerzitě v Oxfordu Howadru Floreyovi, Ernestu Chainovi a Normanu Heatleyovi (Chain *et al.*, 1940). První dávku penicilinu dostal oxfordský policista, který trpěl stafylokokovou infekcí, v únoru roku 1942. Jeho stav se zlepšoval, ale zásoba penicilinu nebyla dostatečná k celkovému vyléčení a nákaze podlehl. Ostatní pacienti, kteří dostali dávky penicilinu poté, se vyléčili (Abraham *et al.*, 1941). Během druhé světové války se výroba penicilinu přesunula do USA a došlo k jeho masovému

používání. Penicilin se začal izolovat ze štětičkovce *Penicillium chrysogenum*, kvůli jeho vyšším výtěžkům. Fleming, Chain a Florey obdrželi za svůj objev v roce 1945 Nobelovu cenu (The Nobel Prize, 2020).

Dnes je známo a komerčně se využívá mnoho skupin antibiotik. Rozdělují se podle jejich mechanismu účinku. Penicilin, ampicilin a cefalosporin obsahují beta-laktamový kruh, který znemožní spojení peptidoglykanu tvořící buněčné stěny při růstu bakterií. Nerostoucí bakterie jsou přirozeně rezistentní. Schopnost porušit cytoplazmatickou membránu má amfotericin B, používá se k léčbě mykóz. Mezi antibiotika narušující syntézu nukleových kyselin patří chinolony narušující syntézu DNA a rifampiciny narušující syntézu RNA. Proteosyntézu inhibují makrolidy, tetracykliny, linkosamidy a další antibiotika, která se vážou na ribozom.

Zdálo se, že antibiotika jsou velmi účinným lékem a jejich užívání se masově rozšířilo do celého světa. S nadužíváním antibiotik ovšem přišel problém – rezistence.

#### 4.1.2. Rezistence

Antibiotická rezistence je jev, kdy jsou mikroorganismy odolné vůči působení antibiotik. Aplikaci přežijí, mohou nadále růst a rozmnožovat se. Bakterie mohou být rezistentní, pokud jejich genom obsahuje geny pro rezistenční faktory, jako jsou RPP a ARE proteiny. Nebo se mohou stát rezistentními nanovo, když se vyskytne náhodná mutace v úseku jejich genomu, který např. pozměnění části buněčného kompartmentu nebo struktury, kam se antibiotikum váže. Pokud se mutace objeví právě při aplikaci antibiotik, daná bakteriální buňka získá vůči ostatním silnou selekční výhodu a může vytvořit novou odolnou kolonii. Při růstu bakterií v ideálním prostředí by náhodná mutace organismus spíše zatěžovala. Mezi bakteriemi se rezistenční faktory přenáší vertikálně při buněčném dělení nebo horizontálně. Do horizontálních genových transferů řadíme transformaci – cizorodá DNA je přijata z okolí bakterie, konjugaci – dvě bakterie vytvoří tzv. pili, připojí se k sobě a jedna druhé předá zreplikovanou molekulu DNA zvanou transpozon nebo plazmid. Plazmidy přinášející rezistenci označujeme jako R-plazmidy. Bakterie může obdržet rezistenční transpozon také od bakteriofága, tento přenos se nazývá transdukce.

Bohužel je dnes rezistentních mnoho bakteriálních kmenů a tato skutečnost značně komplikuje léčbu. Antibiotika by měla být dostupná pouze na lékařský předpis, což v některých zemích není zavedeno nebo jsou předepisována pacientům k jejich spokojenosti. Dalším problémem je podávání antibiotik zvířatům ve velkochovech. Antibiotika zrychlují jejich růst (Diana *et al.*, 2019). V Česku je toto již zakázáno. Sice se objevují nové účinné látky, ale dotáhnutí výzkumu ke zdárnému konci je velice nákladné, finance je prakticky nemožné pro výzkumné týmy sehnat a velkým korporacím se finančně vyplatí produkovat velké množství širokospektrých antibiotik (WHO, 2020). Osobně si myslím, že budoucnost je ve tvorbě vakcín proti strukturám konkrétních patogenů, tak aby se neporušil přirozený mikrobiom a jeho následná dysbalance v organismu nezpůsobovala vznik dalších onemocnění (Nomura *et al.*, 1991). Budoucí výzkumy by se mohly zaměřit právě na ARE proteiny a jimi způsobenou rezistenci k antibiotikům vážícím se na ribozomy.



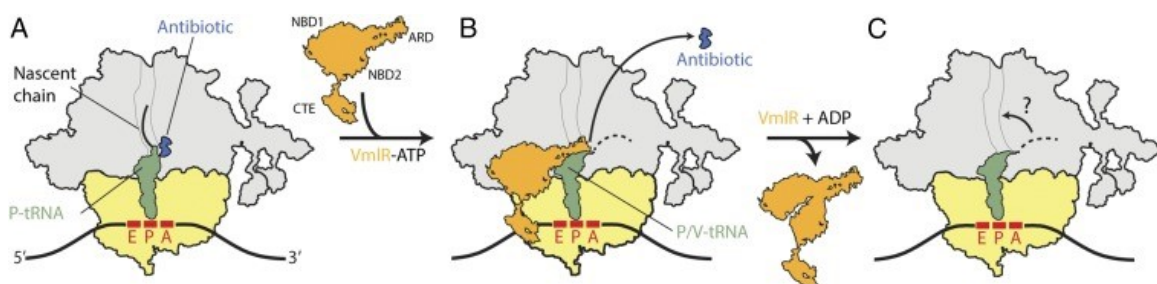


#### 4.1.2.1. Mechanismus rezistence ARE proteinů

Bakterie mají mnoho možností, jak se s působením antibiotik vypořádat. Jednou z nich je tzv. efflux antibiotika, kdy je antibiotikum aktivně pumpováno transportními proteiny zakotvenými v membráně ven z buněk. Zde figurují i již zmiňované ABC transportéry, které efflux antibiotika zprostředkovávají za spotřeby ATP.

Dalším možným způsobem ochrany je ochrana ribozomu, kterou mohou zajistit RPP TetO a TetM chránící ribozom před působením tetracyklinu (Connell *et al.*, 2003) nebo právě ARE proteiny, které udělují rezistenci k antibiotikům vázajícím se na 50S ribozomální podjednotku. Skutečnost, jak ARE proteiny chrání bakterie před antibiotiky, byla 25 let předmětem diskuzí a uvažovalo se i o tom, že ARE proteiny jsou v membránách a způsobují antibiotický efflux (Chesneau *et al.*, 2005). V roce 2016 byl publikován výsledek výzkumu, který potvrzuje, že se ARE proteiny navazují na ribozomy a nejspíše vyvazují antibiotika z jejich vazebných míst na ribozomech (Sharkey *et al.*, 2016), tak jak to předpokládaly dřívější výzkumy (Kerr *et al.*, 2005; Lenart *et al.*, 2015), ale stále nebylo známo, jak přesně toto vyvazování probíhá.

Antibiotika, která se navazují do struktur na ribozomu zvaných PTC (peptidyl transferase center) – streptograminy A, linkosamidy nebo do NPET (nascent polypeptide exit tunnel) – streptograminy B, makrolidy, zablokuje proteosyntézu. Prokázat přesnou ribozomální funkci se zatím podařilo u proteinů MsrE a VmlR. Předpokládá se, že ostatní ARE proteiny mají mechanismus ochrany ribozomu před účinkem antibiotik podobný. Pro názornost ochrannou funkci popisují na proteinu VmlR, u kterého bylo prokázáno, že se váže do E místa ribozomu, zasahuje svým linkerem do PTC a C-koncem do 30S podjednotky. Aby mohl dosáhnout do PTC, mění konformaci ribozomu, díky čemu se uvolní antibiotikum (streptogramin A, linkosamid nebo pleuromutilin) ze svého vazebného místa, viz obrázek 11 (Crowe-McAuliffe *et al.*, 2018).



Obrázek 11 – mechanismus působení proteinu VmlR – a) Antibiotikum je navázáno v PTC a blokuje proteosyntézu. b) Protein VmlR s navázaným ATP se váže do E místa ribozomu, navázané antibiotikum se uvolňuje. Je zde vidět změna konformace ribozomu, kdy je nově vznikající polypeptidový řetězec odkloněn z NPET a zasáh do malé podjednotky. c) Probíhá hydrolyza ATP, VmlR se uvolňuje z ribozomu, proteosyntéza může pokračovat (Crowe-McAuliffe *et al.*, 2018).

Proteiny ze skupiny ARE se vyskytují převážně u grampozitivních bakterií, ale byly nalezeny i u některých gramnegativních bakterií. Sekvence jejich genů jsou obsaženy jak v chromozomální, tak i v plazmidové DNA. Nachází se např. u patogenních kmenů *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (Sharkey *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2018). Tyto patogeny mohou způsobit smrtelná onemocnění. Před vynálezem antibiotik se na nemoci, které způsobují, běžně umíralo.

V následujících odstavcích řadím ARE proteiny do skupin podle toho, k jakým antibiotikům udělují rezistenci.

#### **4.1.2.2. ABCF proteiny udílející rezistenci k streptograminům A, linkosamidům a pleuromutilinům**

Do této skupiny patří protein VgaA, LsaA, Sala, VmlR, TaeA, VarM a LmrC. Dané proteiny udělují rezistenci k streptograminům A, linkosamidům a občas k pleuromutilinům nebo alespoň jednomu z nich. Tato antibiotika se navazují do PTC a překrývají A, P místo nebo exit tunel. (Crowe-McAuliffe *et al.*, 2018). U proteinu VgaA, z podrodiny ARE1, bylo poprvé prokázáno, že ARE proteiny zprostředkovávají přímou ochranu ribozomů (Sharkey *et al.*, 2016).

Purifikovaný protein VgaA byl vložen *in vitro* do translačního cyklu a dokázal ochránit ribozomy před antibiotiky, která se na ně navazují, jako jsou: virginiamycin M, linkomycin (linkosamidy) a retapamulin (pleuromutiliny). Před účinkem erythromycinu (makrolidy), florfenikolu (amfenikoly) a linezolidu (oxalzolidinony) VgaA ribozomy neochránil (Sharkey *et al.*, 2016). Evolučně novější protein Vga<sub>ALC</sub>, který byl objeven u *Streptococcus haemolyticus*, se od VgaA liší složením 7 aminokyselin, uděluje rezistenci k streptograminům A a oběma linkosamidům – linkomycinu a klindamycinu (Novotna & Janata, 2006).

U proteinu LsaA z podrodiny ARE3 bylo prokázáno, že u *Enterococcus faecalis* uděluje rezistenci ke klindamycinu a kvinupristinu/dalfopristinu. Toto antibiotikum bývá účinné i na rezistentní bakterie, ale kvůli vedlejším účinkům při léčbě se tolik nepoužívá. Skládá ze směsi kvinupristinu (streptograminy B) a dalfopristinu (streptograminy A) v poměru 30 : 70 (Gurk-Turner, 2000; Singh *et al.*, 2002). Kvinupristin a dalfopristin mají na ribozomu odlišná vazebná místa. Po navázání dalfopristinu do svého vazebného místa, se změní ribozomální konformace a tak se zvýší afinita pro kvinupristin. Použití streptograminů A a B vykazuje značný synergický efekt (Vannuffel *et al.*, 1992). Pokud se tedy dalfopristin nemůže na ribozom navázat, konformace zůstane nezměněna, a vazebné místo pro kvinupristin, který patří mezi streptograminy B, vykazuje nízkou afinitu. Protein LsaA u *Staphylococcus aureus* chrání před bakteriostatickými účinky linkomycinu a virginiamycinu M (Sharkey *et al.*, 2016).

Protein Sala patřící do podrodiny ARE6 byl objeven u *Staphylococcus sciuri* a indukuje rezistenci k streptograminům A a linkosamidovým antibiotikům. Dokud nebyl protein Sala objeven, tento typ rezistence byl u stafylokoků neznámý (Hot *et al.*, 2014).

O proteinu VmlR z podrodiny ARE2 je již delší dobu známé, že udává rezistenci k linkomycinu a virginiamycinu M. Tato studie byla provedena u *Bacillus subtilis* (Ohki *et al.*, 2005). Dále způsobuje rezistenci k tiamulinu z třídy pleuromutilinů u *Deinococcus Radiodurans* (Schlünzen *et al.*, 2004). Dnes je známá i přesná struktura a mechanismus působení VmlR, který jsem popisovala v kapitole Mechanismus rezistence (Crowe-McAuliffe *et al.*, 2018).

Za rezistenci k tiamulinu je odpovědný také TaeA, který patří do podrodiny Uup parařfyletické k EttA. Přirozeně se vyskytuje u *Paenibacillus* sp. Plazmid s genem *taeA* byl přenesen a otestován u *Escherichia coli* (Pawlowski *et al.*, 2016, Murina *et al.*, 2019).

Protein VarM patřící do podrodiny ARE5 byl objeven u *Streptomyces virginiae*, která produkuje virginiamycin M1. Jelikož tyto streptomycety samy antibiotikum produkují, musí se před jeho účinkem chránit. Ochranu zprostředkovává právě protein VarM. Po přesunutí plazmidu s genem *varM* do *Streptomyces lividans*, se rezistence k virginiamycinu M1 a dalším antibiotikům použitým v experimentu nezvýšila (Kitani *et al.*, 2010).

Další aktinobakterie, která vytváří antibiotikum – linkomycin a rezistenční proteiny, je *Streptomyces lincolnensis*. Byly u ní objeveny 3 rezistenční proteiny: LmrA, LmrB a LmrC, ale mezi ABCF proteiny patří pouze protein LmrC z podrodiny ARE5 (Murina *et al.*, 2019). Geny pro tyto rezistenční proteiny byly přesunuty a testovány u *Streptomyces lividans*, kde také vykazují rezistenci k linkomycinu a LmrC vykazuje částečnou rezistenci k erythromycinu. Zajímavé je, že všechny geny pro tři rezistenční proteiny leží společně s geny pro linkomycin ve stejném clusteru. Geny *lmrA* a *lmrC* tento cluster ohraničují (Peschke *et al.*, 1995).

#### **4.1.2.3. ABCF proteiny udílející rezistenci k streptograminům B makrolidům a jejich derivátům**

Makrolidy, streptograminy B a ketolidy, které jsou semi-synteticky odvozeny od erythromycinu (Agouridas *et al.*, 1998), se navazují do NPET v blízkosti PTC bezprostředně před zúžením, kde se nacházejí ribozomální proteiny L4 a L22. Mohou blokovat NPET nebo narušují tvorbu peptidové vazby nově vznikajícího proteinového řetězce (Kannan & Mankin, 2011). Mezi charakterizované ABCF proteiny udílející rezistenci k těmto antibiotikům patří: MsrA, MsrE, CarA, SrmB, TlrC, OleB.

U proteinů Msr rozlišujeme 4 homology – Msr(A,C,D,E), které udávají rezistenci k makrolidům a streptograminům B (Ross *et al.*, 1990). Proteiny MsrA a MsrE, patřící mezi ABCF proteiny z podrodiny ARE1, jsou specifické tím, že mají jedny z nejdelších linkerů. Najdeme je u stafylokoků, streptokoků, enterokoků a nedávno byl MsrE identifikován u klinického izolátu *Pseudomonas aeruginosa*, do které se *msrE* horizontálně přenesl. Známa je i jeho struktura a přesný způsob ochrany ribozomu – váže se stejně jako EttA do E místa na ribozomu, linkerem zasahuje do NPET a PTC, čím udržuje peptidyl-tRNA na svém místě, aby se neodpojila (Su *et al.*, 2018).

Proteiny: CarA vyizolovaný ze *Streptomyces thermotolerans*, TlrC ze *Streptomyces fradiae* a SrmB ze *Streptomyces ambofaciens*, patří do podrodiny ARE4 a vyvolávají rezistenci

na makrolidová antibiotika. Tyto tři proteiny jsou si velmi blízké – TlrC a CarA jsou si z 68 % sekvenčně identické a z 80 % sekvenčně podobné, TlrC a SrmB vykazují 66% identitu a 80% podobnost, SrmB a CarA jsou identické z 76 % a podobné z 87 % (Schoner *et al.*, 1992).

Aktinobakterie, produkují antibiotikum oleandomycin patřící mezi makrolidy. *Streptomyces antibioticus* se chrání před jeho účinkem vytvářením rezistenčního ABCF proteinu OleB, který patří do podrodiny ARE4. Krom OleB *Streptomyces antibioticus* vytváří protein OleC a OleD, které se na ochraně před účinkem antibiotik také podílejí (Olano *et al.*, 1995).

#### 4.1.2.4. ABCF proteiny udílející rezistenci k oxazolidinonům a fenikolům

Oxazolidinony a fenikoly mají vazebná místa blízko u sebe v P místě na 50S ribozomální podjednotce a mohou o ně kompetovat (Bozdogan & Appelbaum, 2004). Co se týče rezistenčních proteinů, v této skupině najdeme prozatím pouze protein OptrA patřící do podrodiny ARE7. Z testovaných antibiotik se rezistence potvrdila u linezolidu a tedizolidu (oxazolidinony) a chloramfenikolu a florfenikolu (fenikoly). Výzkum se prováděl u enterokoků a stafylokoků, izolovaných od lidí a zvířat – *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* a *Staphylococcus aureus*, do kterých byl plazmid s genem *optrA* vložen pomocí elektroporace buněk (Wang *et al.*, 2015).

## 4.2. Regulační proteiny

O regulačních ABCF proteinech je známo mnohem méně informací než o rezistenčních. Váží se na ribozom, a regulují tak chod translace. Průlom přišel v roce 2014, kdy se poprvé podařilo charakterizovat strukturu a určit funkci jednoho ABCF proteinu. Jednalo se o regulátor translace EttA (Boël *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). U podrodin Uup, YbiT a YheS se regulační funkce předpokládá.

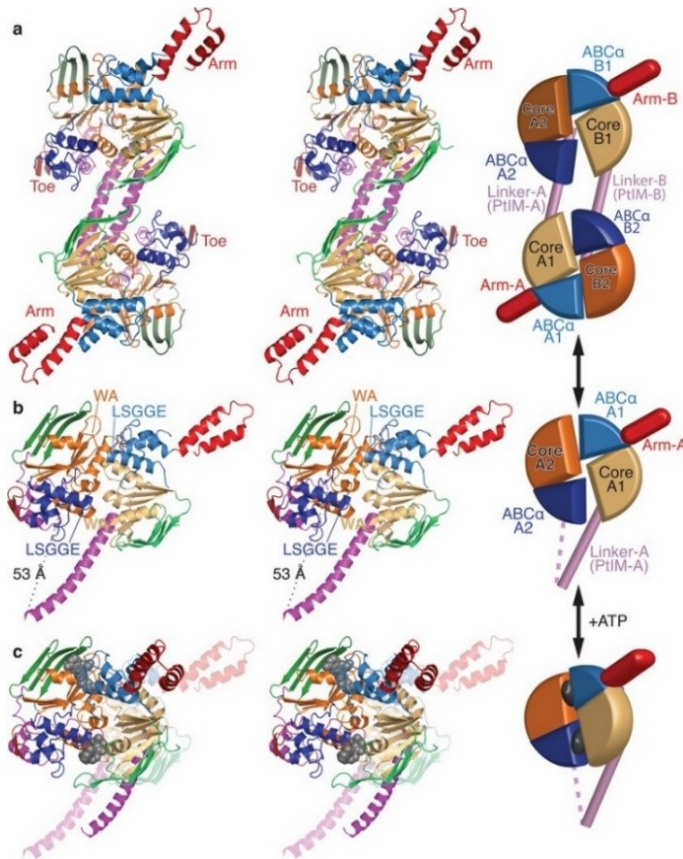
### 4.2.1. Protein EttA

Regulátor translace EttA ze stejnojmenné podrodiny, dříve zvaný Yjjk, je rozšířen mezi více než polovinu známých bakteriálních kmenů, což znamená, že patří mezi nejrozšířenější ABCF proteiny u bakterií (Boël *et al.*, 2014; Murina *et al.*, 2019).

#### 4.2.1.1. Struktura

Pro rentgenovou a kryoelektronovou mikroskopickou strukturní analýzu byl vybrán protein EttA z *Escherichia coli*. Bylo *in vitro* zjištěno, že EttA vytváří komplex se 70S ribozomy během iniciace translace. Na ribozom se váže vždy jako monomer, ale při vysoké koncentraci proteinu EttA v roztoku může vytvářet inaktivní dimery s vzájemně prohozenými ABC1 a ABC2 doménami, viz obrázek 12. Subdoména zvaná „arm“ se nachází v ABC1 doméně a „toe“ v ABC2 doméně. Arm i toe se vyskytují ve smyčce po prvním ze tří alfa-helixů v ABC $\alpha$  subdoméně, která je hlavním místem kontaktu transmembránových domén v ABC transportérech (Boël *et al.*, 2014). Bez navázaného ATP je celková konformace proteinu EttA

více rozvolněná, vazebná místa pro ATP na NBD doménách jsou uložena v hlubokých žlábcích, natočená proti sobě, ale nejsou v těsném kontaktu. Naopak při navázání ATP do svých vazebných míst na NBD doménách, se konformace zkompaktní, a protein EttA tak získává lepší schopnost navázat se do ribozomu (Chen *et al.*, 2014). Struktura a možné konformace proteinu EttA jsou vyobrazeny na obrázku 12.



Obrázek 12 – struktura regulačního proteinu EttA u *Escherichia coli*, vlevo zobrazena detailní proteinová konformace, vpravo schéma struktury: a) Dimer EttA s vzájemně prohozenými ABC1 a ABC2 doménami. b) Monomer EttA. c) Monomer EttA s navázaným ATP (Boěl *et al.*, 2014).

Katalytická místa proteinu EttA jsou, až na dvě výjimky, konzervativní. U většiny ortologů EttA chybí aromatický zbytek na C-konci prvního beta vlákna na ABC $\beta$  subdoméně ABC1 domény přesně v místě, kde tyrozinový zbytek utváří patrové interakce s adeninem v molekule ATP. Patrové interakce jsou důležité pro stabilizaci struktur. Druhou zvláštností je výměna glutamátu za glutamin v LSGGQ motivech na ABC1 doméně u všech ortologů EttA a stejná výměna na ABC2 doméně u většiny ortologů. Substituovaný motiv je označován LSGGE (Boěl *et al.*, 2014).

Linker je unikátní subdoména ABCF proteinů spojující NBD domény. Regulační protein EttA u *Escherichia coli* obsahuje linker složený z 81 aminokyselinových zbytků. Označujeme ho jako strukturu zvanou PtIM (P-site tRNA-interaction motif) – zasahuje do P místa na ribozomu, a zprostředkovává tak kontakt mezi E místem a iniciační tRNA v P místě. Část PtIM náležící do ABC1 domény tvoří prodloužení na C-konci alfa-helixu dlouhé 50 Å. Na doméně ABC2 tvoří druhou polovinu PtIM pár kratších alfa-helixů, na které navazuje 7 aminokyselinový zbytek zasahující do žlábků mezi ABC $\alpha$  a F1-like core subdoménami na ABC2 doméně naproti rozhraní s ABC1 doménou (Boěl *et al.*, 2014).

#### 4.2.1.2. Regulace proteosyntézy

Protein EttA se uplatňuje při regulaci proteosyntézy právě tehdy, když se v buňce ustanoví vyšší koncentrace ADP než ATP. Tento stav nastává, pokud se buňka dostane do stacionární fáze růstu nebo jinak není schopná vytvářet dostatek energie. Při zvýšení koncentrace ADP v buňce, se v iniciační fázi translace komplex EttA s navázaným ADP vstupuje do 70S ribozomu, váže se do jeho E místa a zabraňuje ribozomu vstoupit do elongační fáze translace, protože blokuje vytvoření první peptidové vazby (Boěl *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). Experimentálně bylo potvrzeno, že u buněk ve stacionární fázi se exprese proteinu EttA zvýšila (Boěl *et al.*, 2014). Naopak komplex EttA s navázaným ATP vytvoření první peptidové vazby umožní, hned poté probíhá hydrolýza ATP, EttA opouští ribozom a nastává elongační fáze translace. Díky těmto jevům se předpokládá, že poměr ATP ku ADP reguluje prostřednictvím proteinu EttA ribozomální aktivitu.

Studie byly prováděny na třech mutantech. Mutant EttA-EQ<sub>2</sub> ztratil svou hydrolyzační funkci díky výměně dvou glutaminů za glutamáty v obou katalytických místech na NBD doménách. Tato mutace vytváří pevný komplex EttA-ATP, který inhibuje proteosyntézu navázáním na 70S ribozomální iniciační komplex, poté se utvoří první peptidová vazba a translace se zastavuje. Dále bylo při kryoelektronové mikroskopické analýze zjištěno, že komplex vykazuje vysokou elektronovou hustotu v A, P a E místech na ribozomu (Boěl *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014).

Druhý mutant, který má deletovanou subdoménu arm – EttA- $\Delta$ arm, neměl na chod proteosyntézy a růst buněk vliv (Boěl *et al.*, 2014).

Třetí mutant, u kterého je gen pro protein EttA deletován –  $\Delta$ ettA, vykazoval při stacionární fázi defektní fenotyp, protože proteosyntéza při dlouhotrvajícím nedostatku energie nebyla nijak regulována.

### 4.2.2. Uup, YbiT a YheS

Protein Uup společně s YbiT a YheS patří mezi ABCF proteiny, které produkuje *Escherichia coli* a prozatím u nich nebyla s jistotou prokázána ribozomální funkce. Nicméně je známo, že proteiny YheS a Uup vykazují genovou interakci s translačním faktorem BipA (Murina *et al.*, 2019), který se pravděpodobně uplatňuje při skládání ribozomu (Choi & Hwang, 2018).

Katharyn L. Cochrane ve své práci objevila, že po přidání genu pro protein Uup, jeho expresí a zároveň delecí faktoru BipA, dokáže protein Uup potlačit mnoho negativních fenotypových projevů způsobených právě delecí faktoru BipA, jako je například správné sestavení ribozomu. Proto můžeme předpokládat, že protein Uup funguje jako regulátor translace (Cochrane, 2015). V dřívější studii, která se zabývala mutanty s deletovaným genem pro protein Uup, je popsán mutantní fenotyp potomka, který vykazuje citlivost ke kolonii mateřských buněk, při jejich společném růstu v jednom médiu. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost neporušených Walker A motivů v proteinu Uup a schopnost hydrolýzy ATP je potřebná k rezistenci dceřiné kolonie vůči mateřské kolonii (Murat *et al.*, 2008).

V krátkosti se vrátím ke genu *bipA*, protein BipA jsem popsala v kapitole Změna abiotických faktorů na straně 5. Delece genu *bipA* vede v buňkách rostoucích při teplotě 18 °C ke značnému poškození ribozomů (Gibbs & Fredrick, 2018). Při vyřazení genu *bipA* neměla produkce proteinů EttA a YdiF na výsledný fenotyp žádný vliv. Naopak při produkci proteinu YheS byly buněčné fenotypy značně poškozeny, ale během růstu buněk v 18 °C fenotyp ovlivněn nebyl. To naznačuje, že mezi geny *bipA* a *yheS* je specifická genová interakce (Murina *et al.*, 2019).

Podobně jako mutant EttA-EQ<sub>2</sub>, tak i mutované proteiny Uup-EQ<sub>2</sub>, YbiT-EQ<sub>2</sub> a YheS-EQ<sub>2</sub> bez schopnosti hydrolýzy ATP, inhibovaly proteosyntézu, ovšem ne v takové míře jako EttA-EQ<sub>2</sub> (Murina *et al.*, 2019).

Jejich struktura a přesná funkce nebyla objevena, ale výše uvedená fakta svědčí o tom, že proteiny Uup, YbiT a YheS, ze stejnojmenných podrodin, pravděpodobně interagují s ribozomy za účelem regulace proteosyntézy (Murina *et al.*, 2019).



## 5. Závěr

Doufám, že se mi podařilo čtenáře své bakalářské práce detailně a zřetelně seznámit s doposud málo probádanými ABCF proteiny a nahlédnout pod pokličku regulace části dějů odehrávajících se v bakteriálních buňkách.

Krom doposud objevených struktur a funkcí antibioticko-rezistenčních proteinů VgaA a VmlR a regulačního proteinu EttA zbývá prozkoumat mnoho dalších ABCF proteinů. Myslím si, že zkoumání dalších antibioticko-rezistenčních proteinů má smysl při hledání nových účinných léčiv proti patogenům a má potenciál zachránit mnoho lidských životů. I v segmentu regulačních proteinů je prostor pro velké objevy. Je nesmírně zajímavé, jak se regulační mechanismy diverzifikovaly mezi organismy během mnoha milionů let evoluce.

Jsem zvědavá, jaké nové užitečné informace se na poli ABCF proteinů v budoucnu objeví.

## Seznam použité literatury

- Abraham, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Florey, H.W., 1941. FURTHER OBSERVATIONS ON PENICILLIN. *The Lancet* 238, 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)72122-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)72122-2)
- Agouridas, C., Denis, A., Auger, J.-M., Benedetti, Y., Bonnefoy, A., Bretin, F., Chantot, J.-F., Dussarat, A., Fromentin, C., D'Ambrières, S.G., Lachaud, S., Laurin, P., Le Martret, O., Loyau, V., Tessot, N., 1998. Synthesis and Antibacterial Activity of Ketolides (6-*O*-Methyl-3-oxoerythromycin Derivatives): A New Class of Antibacterials Highly Potent Against Macrolide-Resistant and -Susceptible Respiratory Pathogens †. *J. Med. Chem.* 41, 4080–4100. <https://doi.org/10.1021/jm980240d>
- Alexander Fleming Discovery and Development of Penicillin - Landmark [WWW Document], n.d. . American Chemical Society. URL <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html> (accessed 5.15.20).
- Anand, M., Chakraburty, K., Marton, M.J., Hinnebusch, A.G., Kinzy, T.G., 2003. Functional interactions between yeast translation eukaryotic elongation factor (eEF) 1A and eEF3. *J. Biol. Chem.* 278, 6985–6991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209224200>
- Andersen, C.B.F., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., Balar, B., Mielke, T., Boesen, T., Pedersen, J.S., Spahn, C.M.T., Kinzy, T.G., Andersen, G.R., Beckmann, R., 2006. Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* 443, 663–668. <https://doi.org/10.1038/nature05126>
- Arenz, S., Nguyen, F., Beckmann, R., Wilson, D.N., 2015. Cryo-EM structure of the tetracycline resistance protein TetM in complex with a translating ribosome at 3.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5401–5406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501775112>
- Atkinson, G.C., Tenson, T., Hauryliuk, V., 2011. The RelA/SpoT Homolog (RSH) Superfamily: Distribution and Functional Evolution of ppGpp Synthetases and Hydrolases across the Tree of Life. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>
- Balakrishnan, R., Oman, K., Shoji, S., Bundschuh, R., Fredrick, K., 2014. The conserved GTPase LepA contributes mainly to translation initiation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 42, 13370–13383. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1098>
- Bodley, J.W., Zieve, F.J., Lin, L., Zieve, S.T., 1969. Formation of the ribosome-G factor-GDP complex in the presence of fusidic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 437–443. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(69\)90934-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(69)90934-6)
- Boël, G., Smith, P.C., Ning, W., Englander, M.T., Chen, B., Hashem, Y., Testa, A.J., Fischer, J.J., Wieden, H.-J., Frank, J., Gonzalez, R.L., Hunt, J.F., 2014. The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nat Struct Mol Biol* 21, 143–151. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2740>
- Bozdogan, B., Appelbaum, P.C., 2004. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.11.003>
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V., 2000. The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. *Cell* 103, 1143–1154. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00216-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00216-6)
- Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J., Sanders, A.G., 1940. PENICILLIN AS A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT. *The Lancet* 236, 226–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)08728-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)08728-1)
- Chen, B., Boël, G., Hashem, Y., Ning, W., Fei, J., Wang, C., Gonzalez, R.L., Hunt, J.F., Frank, J., 2014. EttA regulates translation by binding to the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nat Struct Mol Biol* 21, 152–159. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2741>
- Chesneau, O., Ligeret, H., Hosan-Aghaie, N., Morvan, A., Dassa, E., 2005. Molecular Analysis of Resistance to Streptogramin A Compounds Conferred by the Vga Proteins of Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 973–980. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.973-980.2005>

- Choi, E., Hwang, J., 2018. The GTPase BipA expressed at low temperature in *Escherichia coli* assists ribosome assembly and has chaperone-like activity. *J Biol Chem* 293, 18404–18419. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002295>
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260 ; second page, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- Cobb, M., 2017. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003243>
- Cochrane, K.L., 2015. Elucidating Ribosomes—Genetic Studies of the ATPase Uup and the Ribosomal Protein L1. [WWW Document]. URL <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/116786> (accessed 5.29.20).
- Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H., Taylor, D.E., 2003. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3675–3681. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3675-3681.2003>
- Crick, F., 1970. Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Crowe-McAuliffe, C., Graf, M., Huter, P., Takada, H., Abdelshahid, M., Nováček, J., Murina, V., Atkinson, G.C., Hauryliuk, V., Wilson, D.N., 2018a. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 8978–8983. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808535115>
- Davidovich, C., Belousoff, M., Wekselman, I., Shapira, T., Krupkin, M., Zimmerman, E., Bashan, A., Yonath, A., 2010. The Proto-Ribosome: an ancient nano-machine for peptide bond formation. *Isr J Chem* 50, 29–35. <https://doi.org/10.1002/ijch.201000012>
- \* Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J., 2008. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 317–364. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>
- Diana, A., Boyle, L.A., Leonard, F.C., Carroll, C., Sheehan, E., Murphy, D., Manzanilla, E.G., 2019. Removing prophylactic antibiotics from pig feed: how does it affect their performance and health? *BMC Vet Res* 15. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1808-x>
- Fei, J., Wang, J., Sternberg, S.H., MacDougall, D.D., Elvekrog, M.M., Pulukkunat, D.K., Englander, M.T., Gonzalez, R.L., 2010. A highly purified, fluorescently labeled in vitro translation system for single-molecule studies of protein synthesis. *Meth. Enzymol.* 472, 221–259. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)72008-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)72008-5)
- Fleming, A., 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10, 226–236.
- Gaynes, R., 2017. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis* 23, 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Gibbs, M.R., Fredrick, K., 2018. Roles of elusive translational GTPases come to light and inform on the process of ribosome biogenesis in bacteria. *Mol Microbiol* 107, 445–454. <https://doi.org/10.1111/mmi.13895>
- Godtfredsen, W.O., Jahnsen, S., Lorck, H., Roholt, K., Tybring, L., 1962. Fusidic acid: a new antibiotic. *Nature* 193, 987. <https://doi.org/10.1038/193987a0>
- Guo, X., Peisker, K., Bäckbro, K., Chen, Y., Koripella, R.K., Mandava, C.S., Sanyal, S., Selmer, M., 2012. Structure and function of FusB: an elongation factor G-binding fusidic acid resistance protein active in ribosomal translocation and recycling. *Open Biol* 2. <https://doi.org/10.1098/rsob.120016>
- Gurk-Turner, C., 2000. Quinupristin/dalfopristin: the first available macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotic. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 13, 83–86.
- Handa, Y., Inaho, N., Nameki, N., 2011. YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. *Nucleic Acids Res* 39, 1739–1748. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1097>

- Haseltine, W.A., Block, R., 1973. Synthesis of Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Requires the Presence of a Codon-Specific, Uncharged Transfer Ribonucleic Acid in the Acceptor Site of Ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 1564–1568.
- Hot, C., Berthet, N., Chesneau, O., 2014. Characterization of sal(A), a Novel Gene Responsible for Lincosamide and Streptogramin A Resistance in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 3335. <https://doi.org/10.1128/AAC.02797-13>
- Izutsu, K., Wada, C., Komine, Y., Sako, T., Ueguchi, C., Nakura, S., Wada, A., 2001. *Escherichia coli* Ribosome-Associated Protein SRA, Whose Copy Number Increases during Stationary Phase. *J Bacteriol* 183, 2765–2773. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2765-2773.2001>
- Jacob, F., Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3, 318–356. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7)
- Jiang, L., Schaffitzel, C., Bingel-Erlenmeyer, R., Ban, N., Korber, P., Koning, R.I., de Geus, D.C., Plaisier, J.R., Abrahams, J.P., 2009. Recycling of Aborted Ribosomal 50S Subunit-Nascent Chain-tRNA Complexes by the Heat Shock Protein Hsp15. *Journal of Molecular Biology* 386, 1357–1367. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.079>
- Kadlcik, S., Kamenik, Z., Vasek, D., Nedved, M., Janata, J., 2017. Elucidation of salicylate attachment in celesticetin biosynthesis opens the door to create a library of more efficient hybrid lincosamide antibiotics †Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6sc04235j Click here for additional data file. *Chem Sci* 8, 3349–3355. <https://doi.org/10.1039/c6sc04235j>
- Kannan, K., Mankin, A.S., 2011. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action: Species-specific binding and action of macrolides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1241, 33–47. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x>
- Karzai, A.W., Susskind, M.M., Sauer, R.T., 1999. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J* 18, 3793–3799. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.13.3793>
- Kerr, I.D., Reynolds, E.D., Cove, J.H., 2005. ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochem Soc Trans* 33, 1000–1002. <https://doi.org/10.1042/BST0331000>
- Kitani, S., Yamauchi, T., Fukushima, E., Lee, C.K., Ningsih, F., Kinoshita, H., Nihira, T., 2010. Characterization of varM Encoding Type II ABC Transporter in *Streptomyces virginiae*, a Virginiamycin M1 Producer. *Actinomycetologica* 24, 51–57. <https://doi.org/10.3209/saj.SAJ240206>
- Korber, P., Stahl, J.M., Nierhaus, K.H., Bardwell, J.C.A., 2000. Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *EMBO J* 19, 741–748. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.741>
- Kumar, V., Ero, R., Ahmed, T., Goh, K.J., Zhan, Y., Bhushan, S., Gao, Y.-G., 2016. Structure of the GTP Form of Elongation Factor 4 (EF4) Bound to the Ribosome. *J Biol Chem* 291, 12943–12950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725945>
- Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> (accessed 5.18.20).
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Aravind, L., 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317, 41–72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378>
- Lenart, J., Vimberg, V., Vesela, L., Janata, J., Balikova Novotna, G., 2015. Detailed Mutational Analysis of Vga(A) Interdomain Linker: Implication for Antibiotic Resistance Specificity and Mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1360–1364. <https://doi.org/10.1128/AAC.04468-14>
- Mancera-Martínez, E., Brito Querido, J., Valasek, L.S., Simonetti, A., Hashem, Y., 2017. ABCE1: A special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation. *RNA Biol* 14, 1279–1285. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1269993>

- Margus, T., Remm, M., Tenson, T., 2007. Phylogenetic distribution of translational GTPases in bacteria. *BMC Genomics* 8, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-15>
- Murat, D., Goncalves, L., Dassa, E., 2008. Deletion of the *Escherichia coli* uup gene encoding a protein of the ATP binding cassette superfamily affects bacterial competitiveness. *Research in Microbiology* 159, 671–677. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.09.004>
- Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinnu, M., Saha, C.K., Grimshaw, J.W., Seki, T., Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., Strahl, H., Haurlyiuk, V., Atkinson, G.C., 2019. ABCF ATPases Involved in Protein Synthesis, Ribosome Assembly and Antibiotic Resistance: Structural and Functional Diversification across the Tree of Life. *J Mol Biol* 431, 3568–3590. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.013>
- Markham, G.D., Hafner, E.W., Tabor, C.W., Tabor, H., 1980. S-Adenosylmethionine synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255, 9082–9092.
- Nomura, A., Stemmermann, G.N., Chyou, P.-H., Kato, I., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J., 1991. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New England Journal of Medicine* 325, 1132–1136. <https://doi.org/10.1056/NEJM199110173251604>
- Novotna, G., Janata, J., 2006. A New Evolutionary Variant of the Streptogramin A Resistance Protein, Vga(A)LC, from *Staphylococcus haemolyticus* with Shifted Substrate Specificity towards Lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 4070–4076. <https://doi.org/10.1128/AAC.00799-06>
- Ohki, R., Tateno, K., Takizawa, T., Aiso, T., Murata, M., 2005. Transcriptional Termination Control of a Novel ABC Transporter Gene Involved in Antibiotic Resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 187, 5946–5954. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.5946-5954.2005>
- Olano, C., Rodriguez, A.M., Méndez, C., Salas, J.A., 1995. A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol Microbiol* 16, 333–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02305.x>
- Pawlowski, A.C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H.A., McArthur, A.G., Wright, G.D., 2016. A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nat Commun* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13803>
- Pech, M., Nierhaus, K.H., 2012. Three mechanisms in *Escherichia coli* rescue ribosomes stalled on non-stop mRNAs: one of them requires release factor 2. *Molecular Microbiology* 86, 6–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08207.x>
- Perez, C.E., Gonzalez, R.L., 2011. In vitro and in vivo single-molecule fluorescence imaging of ribosome-catalyzed protein synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 15, 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.11.002>
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.-Z., Piepersberg, W., 1995. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* 16, 1137–1156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02338.x>
- Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., Hartsch, T., Yonath, A., Franceschi, F., 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* 20, 1829–1839. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1829>
- Qin, Y., Polacek, N., Vesper, O., Staub, E., Einfeldt, E., Wilson, D.N., Nierhaus, K.H., 2006. The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. *Cell* 127, 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.037>
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., Wootton, J.C., 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 4, 1207–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00696.x>

- Sarthy, A.V., McGonigal, T., Capobianco, J.O., Schmidt, M., Green, S.R., Moehle, C.M., Goldman, R.C., 1998. Identification and kinetic analysis of a functional homolog of elongation factor 3, YEF3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 239–253. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199802\)14:3<239::AID-YEA219>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199802)14:3<239::AID-YEA219>3.0.CO;2-B)
- Schlünzen, F., Pyetan, E., Fucini, P., Yonath, A., Harms, J.M., 2004. Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Mol. Microbiol.* 54, 1287–1294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04346.x>
- Schoner, B., Geistlich, M., Rosteck, P., Rao, R.N., Seno, E., Reynolds, P., Cox, K., Burgett, S., Hershberger, C., 1992. Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. *Gene* 115, 93–96. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90545-Z](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90545-Z)
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., Nirenberg, M., 1968. Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 768–774. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.768>
- Sharkey, L.K.R., Edwards, T.A., O'Neill, A.J., 2016. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *mBio* 7, e01975-15, /mbio/7/2/e01975-15.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.01975-15>
- Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) Is Required for the Resistance of This Species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1845–1850. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1845-1850.2002>
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- \* Starosta, A.L., Lassak, J., Jung, K., Wilson, D.N., 2014. The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiol Rev* 38, 1172–1201. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12083>
- \* Stouthamer, A.H., Bettenhausen, C., 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms: A reevaluation of the method for the determination of ATP production by measuring molar growth yields. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 301, 53–70. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(73\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0304-4173(73)90012-8)
- Su, W., Kumar, V., Ding, Y., Ero, R., Serra, A., Lee, B.S.T., Wong, A.S.W., Shi, J., Sze, S.K., Yang, L., Gao, Y.-G., 2018. Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 5157–5162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803313115>
- Temin, H.M., Mizutani, S., 1970. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* 226, 1211–1213. <https://doi.org/10.1038/2261211a0>
- \* ter Beek, J., Guskov, A., Slotboom, D.J., 2014. Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* 143, 419–435. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945 [WWW Document], n.d. . NobelPrize.org. URL <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/> (accessed 5.31.20).
- Vannuffel, P., Di Giambattista, M., Cocito, C., 1992. The role of rRNA bases in the interaction of peptidyltransferase inhibitors with bacterial ribosomes. *J. Biol. Chem.* 267, 16114–16120.
- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A.C., Engelberg-Kulka, H., Moll, I., 2011. Selective Translation of Leaderless mRNAs by Specialized Ribosomes Generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell* 147, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.047>
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951.
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., Wang, D., Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Feßler, A.T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., Shen, J., 2015. A novel gene, *optrA*, that confers transferable

resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. J. Antimicrob. Chemother. 70, 2182–2190. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv116>

Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature 171, 964–967. <https://doi.org/10.1038/171964b0>

Willi, K., Sandmeier, H., Kulik, E.M., Meyer, J., 1997. Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages Aap23. CMLS, Cell. mol. life sci. 53, 904–910. <https://doi.org/10.1007/s000180050109>

Review jsou označena \*