

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

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



**Kateřina Mařková**

Biosyntéza buněčné stěny u gram-pozitivních bakterií a inhibiční účinek antibiotik  
The cell wall biosynthesis in gram-positive bacteria and inhibitory effect of antibiotics

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Aleř Ulrych, Ph.D.

Praha, 2020

**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 dne 5.6.2020

.....

Kateřina Mašková

*Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli RNDr. Aleši Ulrychovi, Ph.D. za ochotu, odborné rady, vstřícný přístup a trpělivost při vedení mé bakalářské práce.*

*Díky patří také mé rodině za podporu a Mgr. Leoši Hvižd'ovi za pomoc při formátování.*

## Abstrakt

Buněčná stěna grampozitivních bakterií obsahuje kromě stěžejní molekuly peptidoglykanu také unikátní polysacharidy, jako jsou teichoové kyseliny, kapsulární polysacharidy a exopolysacharidy, a kovalentně vázané povrchové proteiny. Dohromady vytváří silnou a odolnou vrstvu, která zajišťuje ochranu, ale také komunikaci s vnějším prostředím.

Biosyntézu peptidoglykanu u grampozitivních bakterií lze rozdělit do tří fází: cytoplasmatická fáze, membránová fáze a extracytoplasmatická fáze. Jednotlivé fáze se skládají ze specifických reakcí, které jsou katalyzovány často konzervovanými bakteriálními enzymy, jenž tvoří potenciální cíle pro antibiotické molekuly. Většina známých antibiotik účinných proti grampozitivním bakteriím je cílená právě k inhibici procesu syntézy buněčné stěny. Mechanismy účinků jednotlivých antibiotik jsou popsány s různou mírou podrobností. Některá jsou známá a široce využívána v medicíně či veterinární praxi a některá vykazují zatím pouze potenciál stát se léčivy. Další využití antibiotik je v samotném základním výzkumu, především při studiu biosyntézy buněčné stěny a bakteriálního dělení.

V této práci jsem shrnula poznatky o biosyntéze buněčné stěny grampozitivních bakterií a výčet antibiotik a popis mechanismů jejich účinku na biosyntézu především peptidoglykanu.

**Klíčová slova:** syntéza buněčné stěny, peptidoglykan, grampozitivní bakterie, antibiotika

## **Abstract**

The cell wall of Gram-positive bacteria includes, in addition to the core peptidoglycan molecule, unique polysaccharides such as teichoic acids, capsular polysaccharides and exopolysaccharides, and covalently bound surface proteins. Together, they create a strong and durable layer that provides protection but also communication with the external environment.

Peptidoglycan biosynthesis in Gram-positive bacteria can be divided into three phases: cytoplasmic, membrane and extracytoplasmic phase. The individual phases consist of specific reactions that are catalyzed by often conserved bacterial enzymes, which are potential targets for antibiotic molecules. Most known antibiotics effective against Gram-positive bacteria are aimed at inhibiting the process of cell wall synthesis. The mechanisms of action of individual antibiotics are described with varying degrees of detail. Some are known and widely used in medicine or veterinary practice, and some have so far only shown the potential to become drugs. Another use of antibiotics is in the basic research itself, especially in the study of cell wall biosynthesis and bacterial division.

In this work, I have compiled a summary of knowledge about cell wall biosynthesis of Gram-positive bacteria and a list of antibiotics and a description of the mechanisms of their effect on the cell wall biosynthesis, primarily peptidoglycan.

**Key words:** cell wall synthesis, peptidoglycan, Gram-positive bacteria, antibiotics

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Grampozitivní bakterie.....	2
2.1	Peptidoglykan.....	2
2.1.1	Chemické složení peptidoglykanu.....	2
2.1.2	Struktura peptidoglykanu.....	3
2.2	Teichoové kyseliny.....	4
3	Biosyntéza buněčné stěny.....	6
3.1	Syntéza peptidoglykanu.....	6
3.1.1	Cytoplasmatická fáze.....	6
3.1.2	Membránová fáze.....	8
3.1.3	Extracytoplasmatická fáze.....	8
3.2	Biosyntéza teichoových kyselin.....	11
3.3	Regulace syntézy buněčné stěny.....	12
3.4	Celkový model biosyntézy peptidoglykanu.....	12
3.4.1	Elongasome.....	13
3.4.2	Divizome.....	13
4	Antibiotika.....	14
4.1	Inhibitory syntézy buněčné stěny.....	14
4.1.1	Antibiotika inhibující I. fázi biosyntézy.....	15
4.1.1.1	Fosfomycin.....	15
4.1.1.2	4-thiazolidinony.....	16
4.1.1.3	Feglymycin.....	16
4.1.1.4	Sulfonamidy.....	16
4.1.1.5	Fosfináty.....	17
4.1.1.6	ATP-analogy.....	18
4.1.1.7	D-cykloserin.....	18
4.1.2	Antibiotika inhibující II. fázi biosyntézy.....	19
4.1.2.1	Inhibitory MraY.....	19
4.1.2.2	Ramoplanin.....	20
4.1.3	Antibiotika inhibující III. fázi biosyntézy.....	20
4.1.3.1	Beta-laktamy.....	20
4.1.3.2	Glykopeptidy.....	21
4.1.3.3	Mannopeptimyciny.....	22
4.1.3.4	Defensiny.....	22
4.1.3.5	Lantibiotika.....	23
4.1.3.6	Bacitracin.....	23
4.1.3.7	Moenomyciny.....	24
4.1.3.8	Teixobactin.....	24
5	Závěr.....	25
6	Seznam použité literatury.....	26

## Seznam použitých zkratk

Alr	D-ala racemáza
AMP-PCP	Adenylyl 5'- ( $\beta,\gamma$ -methyldifosfonát), analog ATP
C55-P	Undekaprenylfosfát, lipidový přenašeč
CTP	Citidintrifosfát
Ddl	D-ala-D-ala ligáza
D-iGln	D-isoglutamin
D-iGlu	D-isoglutamová kyselina
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HMM PBPs	Penicilin vazebné proteiny s vysokou molekulovou hmotností
Hpg	4-hydroxyfenylglycin, neproteinogenní aminokyselina
kDa	Kilodalton
LMM PBPs	Penicilin vazebné proteiny s nízkou molekulovou hmotností
LTA	Lipoteichoové kyseliny
mDap	Kyselina diaminopimelová
MurNAc	N-acetylmuramová kyselina
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PASTA	Proteinová doména asociovaná s penicilin-vazebnými proteiny a serin/threoninovými kinázami
PBP	Penicilin vazebný protein
PG	Peptidoglykan
PNPT	Polyprenyl-fosfát
SEDS	Rodina proteinů zajišťující polymeraci buněčné stěny a dělení buňky
STK	Serin/threoninová proteinkináza
UDP	Uridindifosfát
UMP	Uridinmonofosfát
WTA	Teichoové kyseliny buněčné stěny

# 1 Úvod

Mnoho lidských i zvířecích patogenů má status grampozitivní bakterie. Jejich unikátní buněčná stěna, tvořená silnou vrstvou peptidoglykanu z nich dělá mistry ve skrývání se v hostitelském organismu a také v obraně proti jeho imunitnímu systému. Hustá polymerní síť peptidoglykanu zajišťuje celulární integritu v proměnlivém okolním prostředí a zároveň je natolik flexibilní, že umožňuje bakteriální růst, dělení a interakci s hostitelem. Peptidoglykan, enzymy účastníci se jeho výstavby a další molekuly, které tvoří stavební kameny buněčné stěny, se liší od jakýchkoliv struktur produkovaných eukaryotickými buňkami. Právě díky této velké odlišnosti je buněčná stěna velmi vhodným cílem antibiotických léčiv.

Biosyntéza buněčné stěny zahrnuje celou řadu enzymatických reakcí, které tvoří koordinovaný a komplexní proces. Kompletní představa o průběhu syntézy a vzhledu buněčné stěny grampozitivních bakterií však stále není zcela objasněna. I přes to se antibiotika cílená inhibovat tuto syntézu vyvíjí už od 40. let 20. století. V období zlatého věku antibiotik dokonce padaly myšlenky a názory, že lidé boj s bakteriemi definitivně vyhráli. Dnes už je dobře známo, že to byly předčasné závěry, jelikož musíme čelit dopadům nadužívání těchto léčiv. Se zvyšující se spotřebou antibiotik, ať už u hospodářských zvířat či v lidské medicíně, se objevuje čím dál více rezistentních kmenů (tzv. superbakterií), které působení antibiotik odolávají. Mnohá antibiotika už nejsou na některé kmeny účinná a hledat alternativy je stále obtížnější.

Tato bakalářská práce se zabývá bližší charakterizací procesu, který vede k biosyntéze buněčné stěny. Cílem bylo vytvořit souhrn poznatků o syntéze dvou hlavních komponent buněčné stěny, peptidoglykanu a teichoových kyselin u grampozitivních bakterií a vytvořit přehled antibiotik inhibujících jednotlivé kroky jejich syntézy.



## 2 Grampozitivní bakterie

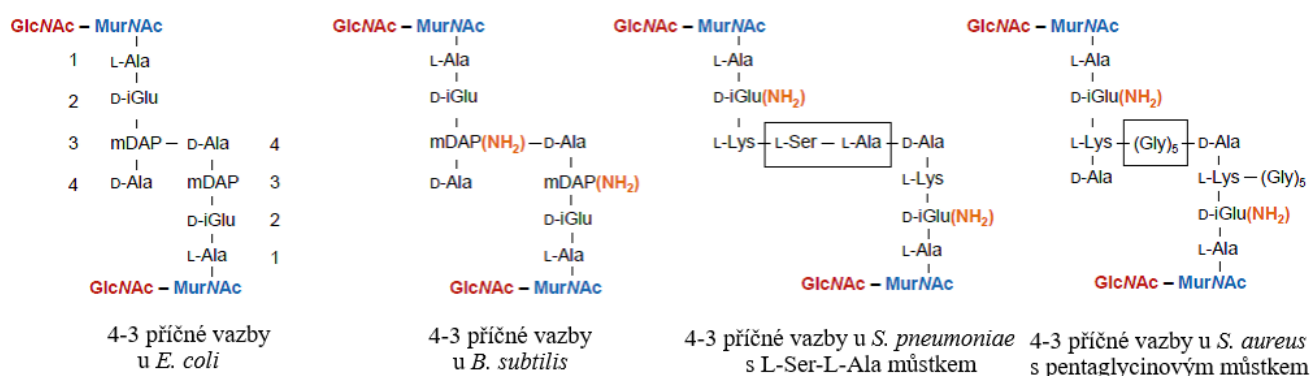
Grampozitivní bakterie se dají definovat jako monodermické organismy neboli organismy mající jednu jednoduchou cytoplasmatickou membránu. Postrádají druhou vnější membránu, která se vyskytuje u gramnegativních bakterií, avšak o to komplexnější a sofistikovanější mají vrstvu peptidoglykanu (Siegel *et al.*, 2016). Zatímco gramnegativní bakterie je chráněna pouze tenkou vrstvou peptidoglykanu o tloušťce 3-6 nm, grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou vícevrstevným peptidoglykanem silným 10-100 nm (Egan *et al.*, 2017; Mistou *et al.*, 2016). Buněčná stěna grampozitivních bakterií dále obsahuje široké spektrum sekundárních složek, jako jsou teichoové kyseliny, kapsulární polysacharidy, exopolysacharidy a množství kovalentně vázaných proteinů (Siegel *et al.*, 2016; Mistou *et al.*, 2016). Dohromady dávají vzniknout propletené síti, která zajišťuje ochranu, odolnost vůči buněčnému turgoru, umožňuje komunikaci a interakce s prostředím, udává tvar a obecně se dá říci, že definuje danou grampozitivní bakterii (Mistou *et al.*, 2016; Vollmer *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2016). Ze složek buněčné stěny se budu v rámci předkládané bakalářské práce věnovat především peptidoglykanu a teichoovým kyselinám, jelikož jejich syntéza je cílem antibiotik.

### 2.1 Peptidoglykan

#### 2.1.1 Chemické složení peptidoglykanu

Peptidoglykan (PG) je základní makromolekula buněčné stěny bakterií. Jeho struktura připomínající síť je tvořena dlouhými vlákny glykanu propojenými krátkými oligopeptidy, které obsahují L a D aminokyseliny. Základním stavebním kamenem glykanu je disacharid tvořený  $\beta$ -1,4-N-acetylglucosaminem (GlcNAc) a kyselinou N-acetylmuramovou (MurNAc) (Pazos & Peters, 2019). Nenahraditelné pilíře buněčné stěny tvoří oligopeptidové můstky, které propojují jednotlivá vlákna glykanů a dávají buněčné stěně specifické vlastnosti. Připojení oligopeptidového můstku probíhá na pozici uhlíku C3 MurNAc, kde je navázaná D-laktátová skupina (Vollmer *et al.*, 2008). V dobře prozkoumaném modelu gramnegativní bakterie *Escherichia coli* je sekvence peptidu následující: L-Ala, D-iGlu, mDap, D-Ala, D-Ala. Tato sekvence prochází u různých druhů bakterií modifikacemi, což přináší celou škálu změn ve vlastnostech buněčné stěny. Srovnání struktury peptidových můstků u bakterií *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus* je znázorněno na **Obr. 1**. U grampozitivních bakterií se často objevuje amidace D-iGlu (D-isoglutamová

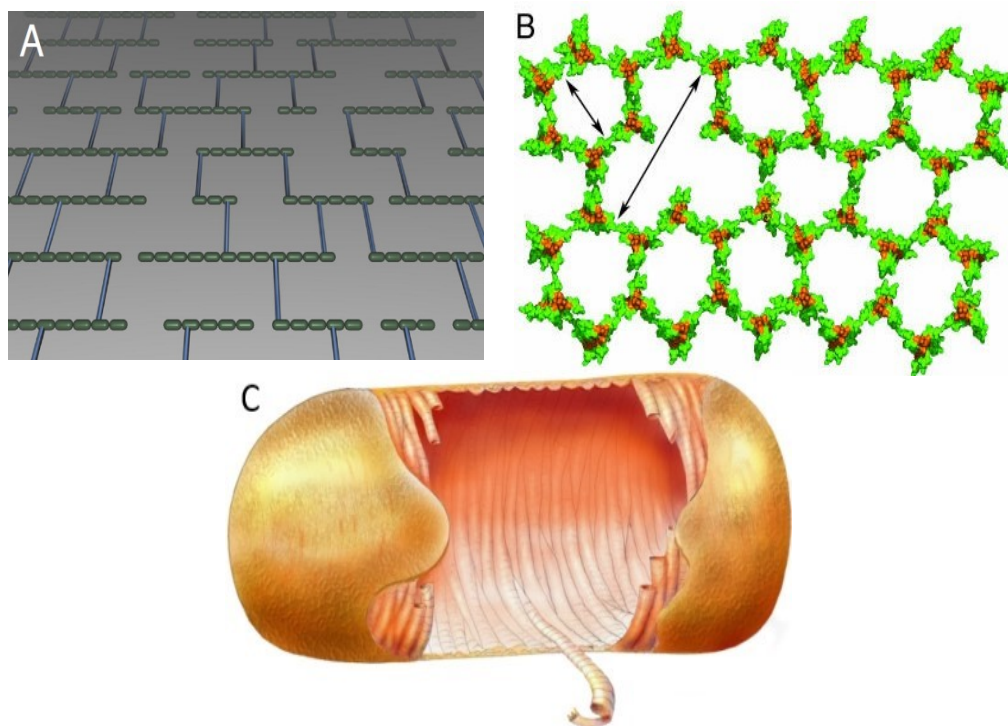
kyselina) na D-iGln (D-isoglutamin) pomocí esenciální amidotransferázy MurT/GatD a záměna mDap (kyselina diaminopimelová) za L-Lys jako např. u *S. pneumoniae* nebo *S. aureus* (Egan *et al.*, 2017; Pazos & Peters, 2019). Dále může docházet k O-acetylacím D-Glu nebo mDap jako u např. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* aj. Nejen oligopeptid, ale i glykan má svou modifikaci a tou je N-glykolylace muramové kyseliny. Tato modifikace se stala charakteristickým znakem pro příbuzné kmeny bakterií řádu *Actinomycetales* (Vollmer, 2008). Na posledních dvou zbytcích D-Ala se modifikace nevyskytují, jelikož se jedná o vysoce konzervovanou strukturu a cílové molekuly pro enzymy transpeptidázy zajišťující zesíťování PG (Pazos & Peters, 2019).



**Obr. 1: Struktura oligopeptidových spojů v peptidoglykanu u grampozitivních bakterií.** Na obrázku jsou vidět modifikace peptidových můstků v peptidoglykanu u *B. subtilis*, *S. pneumoniae* a *S. aureus* ve srovnání s gramnegativní bakterií *E. coli*. Převzato dle (Pazos & Peters, 2019).

### 2.1.2 Struktura peptidoglykanu

Chemické složení peptidoglykanu je u mnoha kmenů dobře popsáno, avšak celková trojrozměrná struktura buněčné stěny grampozitivních bakterií patří v biochemii stále mezi nedořešené problémy (Meroueh *et al.*, 2006; Rohde, 2019). V minulosti byly vytvořeny tři modely 3D struktury (**Obr. 2**). Model vrstvený, který předpokládá podobnou strukturu peptidoglykanu jako u gramnegativních bakterií, tedy glykanová vlákna vedoucí po obvodu podle delší osy bakteriální buňky (Beeby *et al.*, 2013; Rohde, 2019). Druhý model, model lešení, byl vytvořen na základě NMR grampozitivního peptidoglykanu a představuje variantu, ve které glykanové prameny vedou kolmo k membráně a tvoří síť šestiúhelníků (Meroueh *et al.*, 2006). Třetím modelem je tzv. stočený kabelový model, ve kterém glykan vytváří 50 nm kabely, vlákna stočená do helixu, kopírující obvod bakterie (Hayhurst *et al.*, 2008). Tento model už není v současné době považován za pravděpodobný, jelikož při podrobném zkoumání se ukázalo, že buněčná stěna grampozitivní bakterie nevykazuje žádné struktury podobné kabelům (Rohde, 2019).



**Obr. 2: Tři modely struktury peptidoglykanu.** Na obrázku je vidět srovnání tří uvedených modelů peptidoglykanu grampozitivních bakterií. Obr. A zobrazuje vrstevnatý model, který je shodný s PG gramnegativních bakterií (zeleně glykanové řetězce, modře peptidové můstky). Obr. B představuje model lešení, ve kterém glykany a peptidové můstky vytváří šestiúhelníky kolmé k membráně (oranžově glykanové řetězce, zeleně peptidové můstky). Šipky znázorňují malý a větší pór ve struktuře. Na obr. C je vidět kabelový model, ve kterém glykan vytváří kabely stočené do helixů. Převzato dle (Gan *et al.*, 2008; Meroueh *et al.*, 2006; Hayhurst *et al.*, 2008).

## 2.2 Teichoové kyseliny

Teichoové kyseliny jsou polymerní látky, které se vyskytují výhradně u grampozitivních bakterií jako součást buněčné stěny. Mají významnou funkci v bakteriální fyziologii, určování tvaru buněk, příjmu živin, vzniku rezistence vůči antibiotikům, buněčném dělení, tvorbě biofilmu a v interakci mezi bakterií a hostitelem (Shiraishi *et al.*, 2016; van der Es, 2018). Obecná chemická struktura spočívá v řetězci aniontových polyolových podjednotek propojených pomocí fosfodiesterových vazeb a lze je rozdělit na lipoteichoové kyseliny (LTA) a teichoové kyseliny buněčné stěny (WTA) (Brown *et al.*, 2013). LTA jsou připojené k buněčné membráně (přes hexózové zbytky glykolipidů membrány) a jejich hlavní osu tvoří povětšinou poly-glycerolfosfát, zatímco WTA jsou zakotvené v peptidoglykanu (přes C6 MurNAc v PG) a jejich struktura se mezi bakteriálními druhy výrazně liší (uspořádání LTA a WTA je znázorněno na **Obr. 3**). Nejtypičtěji se skládají z poly-glycerolfosfátu nebo poly-ribitolfosfátu (Shiraishi *et al.*, 2016). Výsledná LTA nebo WTA je připojena glykolipidovou kotvou k membráně nebo k peptidoglykanu pomocí enzymů LCP (proteiny LytR, CpsA a Psr), přítomných u všech grampozitivních bakterií (Siegel *et al.*, 2016).

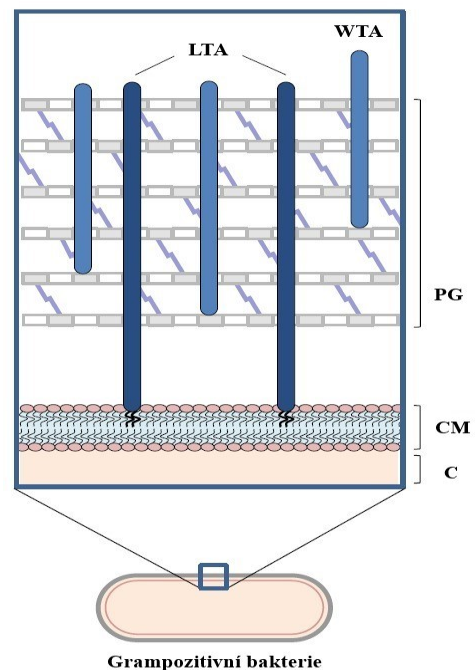
### 2.3 Ostatní složky buněčné stěny

Dalšími složkami povrchu grampozitivních bakterií jsou kapsulární polysacharidy, exopolysacharidy a povrchové proteiny.

Kapsulární polysacharidy jsou připojené k podjednotkám peptidoglykanu z vnější strany buněčné stěny a vytváří glykanový obal u patogenních i komenzálních bakterií. Jejich hlavní funkcí je ochrana proti vlivům prostředí a zejména u patogenů jsou důležitými virulenními faktory (Dasgupta a Kasper, 2010 cit. dle Cress *et al.*, 2014).

Exopolysacharidy jsou strukturálně i funkčně stejné jako kapsulární polysacharidy. Obvykle se od kapsulárních polysacharidů liší tím, že nebývají pevně vázané k buněčnému povrchu a jsou uvolňovány na povrch bakterie, kde tvoří slizovou vrstvu. Vyskytují se spíše u gramnegativních bakterií, ale i grampozitivní mají svého zástupce, například *Streptococcus equisimilis*. Tyto molekuly hrají důležitou roli v ochraně vůči vlivům vnějšího prostředí a virulenci (Cescutti, 2010).

Povrchové proteiny se u grampozitivních bakterií vyskytují ve velkém množství, na rozdíl od gramnegativních bakterií, u kterých jsou spíše vyjimečně. Tyto proteiny jako například protein A, proteiny vázající fibronectin nebo kolagenový adhezin, hrají významnou roli v patogenezí a virulenci (Vollmer *et al.*, 2008). Ukázalo se, že se také účastní procesu tvorby biofilmu. Struktura prekurzorů povrchových proteinů je tvořena z N-terminálního signálního peptidu potřebného pro sekreci a konzervované C-terminální sekvence CWSS (Cell Wall Sorting Signal), která je nezbytná pro přichycení proteinu k buněčné stěně enzymem sortázou (Hanson & Neely, 2012).



**Obr. 3: Buněčná stěna grampozitivních bakterií.** Na obrázku je znázorněno uspořádání teichoových kyselin v buněčné stěně grampozitivních bakterií. (LTA) znázorňuje lipoteichoové kyseliny, které kotví peptidoglykan k cytoplasmatické membráně, (WTA) jsou teichoové kyseliny, které stabilizují strukturu peptidoglykanu, (PG) peptidoglykan, (CM) cytoplasmatická membrána, (C) cytoplazma. Převzato a upraveno dle (Pazos & Peters, 2019).

### 3 Biosyntéza buněčné stěny

Syntéza buněčné stěny bakterií je složitý biochemický proces, který zatím není dopodrobna zcela objasněn. V současné době se preferuje model, podle kterého je peptidoglykan syntetizován pomocí velkých multiproteinových komplexů, jejichž součástí jsou PG syntázy, hydrolázy a další proteiny morfogeneze (Egan *et al.*, 2017; Pazos *et al.*, 2017).

#### 3.1 Syntéza peptidoglykanu

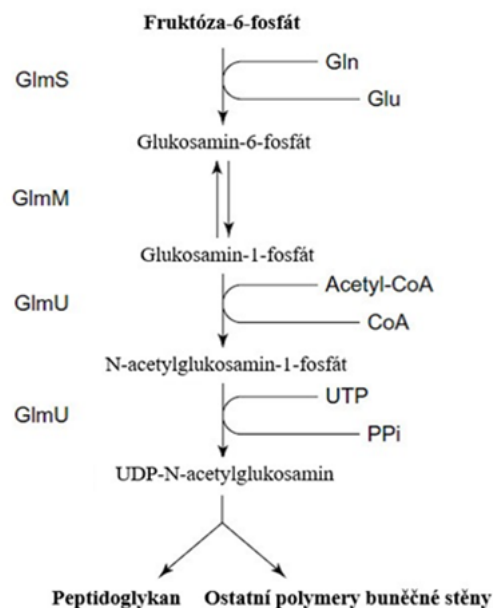
Hlavní složka buněčné stěny - peptidoglykan je stěžejní molekulou buněčné stěny bakterií. Díky svým vlastnostem zachovává integritu buňky, zajišťuje odolnost vůči cytoplasmatickému turgoru, interakci mezi hostitelem a mikroben, buněčnou signalizaci bakterií a slouží také jako signál klíčivosti spor. (Bassler a Lostick, 2006; Shah *et al.*, 2008). Peptidoglykan je u grampozitivních bakterií syntetizován ve třech fázích. První fáze probíhá v cytoplasmě, kde vede ke vzniku intermediátu UMP-MurNAc-pentapeptidu, tzv. Parkovu nukleotidu. Následuje sestavení Lipidu II a poslední fází je polymerace a konečné zesílení, které probíhá na vnější straně membrány (Siegel *et al.*, 2016). Schéma celého procesu je znázorněno na **Obr. 4**.

##### 3.1.1 Cytoplasmatická fáze

Počátečním krokem cytoplasmatické fáze syntézy je vznik důležitého prekurzoru peptidoglykanu i teichoových kyselin UDP-N-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc) z fruktózy-6-fosfátu. Tento krok sestává ze 4 reakcí, jejichž schéma je znázorněno na **Obr. 5**. Nejprve enzym GlnS (glutamin-fruktóza-6-fosfát aminotransferáza) přeměňuje D-fruktózu-6-fosfát na D-glukosamin-6-fosfát. Tento enzym je bifunkční a má dvě domény. N-terminální doména katalyzuje hydrolýzu L-glutaminu na L-glutamát a amoniak a C-terminální doména váže uvolněný amoniak a dává vzniknout D-glukosamin-6-fosfátu. Další reakcí je konverze D-glukosamin-6-fosfátu na D-glukosamin-1-fosfát pomocí fosfoglukosaminmutázy (GlnM). Tato mutáza je aktivní pouze po (auto)fosforylaci konkrétního serinového zbytku a reakce zahrnuje meziproduct D-glukosamin-1,6-difosfát. Posledním enzymem v řadě je GlnU (N-acetylglukosamin-1-fosfát uridyltransferáza), který je rovněž bifunkční a katalyzuje acylaci a uridilaci. Acylaci D-glukosamin-1-fosfátu za spotřeby acetyl-CoA provádí C-koncová

doména a následnou uridylaci vzniklého N-acetylglukosamin-1-fosfátu katalyzuje N-koncová doména za spotřeby UTP a vzniku UDP-GlcNAc (Heijenoort, 2010).

Dalším krokem je přenos enolpyruvylové skupiny z fosfoenolpyruvátu na prekurzor UDP-GlcNAc za vzniku UDP-enolpyruvyl-GlcNAc (UDP-EP-GlcNAc) (Benson *et al.*, 1996). Tato reakce je katalyzovaná enzymem MurA, který má v genomu grampozitivních bakterií dvě varianty genu a obě produkují zcela funkční enzymy (Lovering *et al.*, 2012 cit. dle Du *et al.*, 2000). Navazující redukcí UDP-EP-GlcNAc katalyzovanou MurB, dochází k transformaci enolpyruvyly na laktyl za spotřeby jednoho redukovaného koenzymu NADPH a vzniká UDP-MurNAc (Benson *et al.*, 1996). Následují 4 reakce katalyzované Mur ligázami, které za spotřeby ATP připojují na kostru UDP-MurNAc jednotlivé aminokyseliny peptidového spojovacího můstku. MurC katalyzuje připojení první aminokyseliny L-Ala (Loverig *et al.*, 2012). Dalším enzymem v pořadí je MurD, který za spotřeby ATP připojuje D-iGlu k rostoucímu prekurzoru. D-iGlu je u některých bakterií (např. *Rhodospirillum rubrum*) syntetizován z D-alaninu a  $\alpha$ -ketoglutarátu pomocí aminotransferázy nebo může být syntetizován z L-glutamátu katalýzou enzymem MurI (glutamát racemáza), což využívají například bakterie rodu *Lactobacillus* (Yoshimura *et al.*, 1993). MurD grampozitivních bakterií vyžaduje ke správnému fungování přítomnost pouze  $Mg^{2+}$ , oproti gramnegativům, jejichž MurD potřebuje monokationty jako  $NH_4^+$  nebo  $K^+$  (Walsh *et al.*, 1999). Vzniklý UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanin-D-glutamát přebírá enzym MurE a přidává k němu L-lysin (nebo u gramnegativů mDap) (Lovering *et al.*, 2012). V pořadí čtvrtá ligáza MurF katalyzuje začlenění čtvrté a páté aminokyseliny ve formě dipeptidu D-Ala-D-Ala za vzniku Parkova nukleotidu (UDP-MurNAc-L-Ala-D-iGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala). Dipeptid D-Ala-D-Ala vzniká pomocí dvou enzymů: alaninové racemázy Alr, která převádí L-Ala na D-Ala a ligázy Ddl, která spojuje molekuly D-Ala za vzniku dimeru (Vollmer *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2016, Prosser & Carvalho, 2013). U pneumokoků se



**Obrázek č. 5: Syntéza UDP-GlcNAc z fruktózy-6-fosfátu.** Schéma znázorňuje sled 4 reakcí katalyzovaných enzymy GlmS, GlmM a GlmU. GlmS zprostředkovává přeměnu fruktózy-6-fosfátu na glukosamin-6-fosfát, GlmM katalyzuje následnou konverzi na glukosamin-1-fosfát a GlmU provádí uridylaci a acetylaci za vzniku UDP-N-acetylglukosaminu. Převzato dle Heijenoort (2010).

syntézy peptidoglykanu dále účastní také enzymy MurM a MurN. MurM je aminoacyl ligáza, která připojením L-alanin nebo L-serin k první aminokyselině peptidového můstku L-lysinu, způsobuje větvení příčných spojek v peptidoglykanu. MurN katalyzuje následné připojení druhé aminokyseliny postranní větve L-alaninu k L-serinu nebo L-alaninu (Lloyd *et al.*, 2008; De Pascale *et al.*, 2008).

### 3.1.2 Membránová fáze

První reakci II. fáze biosyntézy PG probíhající v membráně provádí transferáza MraY. Jedná se o esenciální enzym, který se nevyskytuje u eukaryot. MraY katalyzuje přenos UMP-MurNAc-pentapeptidu z UDP-MurNAc-pentapeptidu na undekaprenylfosfát (C55-P), který slouží k přichycení substrátu na membráně. Ukotvením vzniká molekula zvaná Lipid I (MurNAc-pentapeptid-C55-PP) a uridin monofosfát - UMP (Lecerclé *et al.*, 2010). Lipid I je substrátem pro hydrofobní enzym MurG, který katalyzuje uvolnění N-acetylglukosaminu z UDP-GlnNAc a jeho připojení na Lipid I za vzniku bezprostředního prekurzoru peptidoglykanu Lipidu II (van den Brink-van der Laan *et al.*, 2003). Lipid II je pravděpodobně pomocí enzymu flipázy translokován na vnější stranu membrány. Jako flipázy byly navrhovány proteiny rodiny SEDS (Shape, Elongation, Division, Sporulation) viz kapitola 3.1.3. To se potvrdilo jen u některých grampozitivních bakterií, např. *C. glutamicum* (Mohammadi *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2016). U grampozitivní bakterie *B. subtilis* byl jako potencionální flipáza identifikován protein Amj jako funkční nikoli však strukturní homolog proteinu MurJ, jehož funkce flipázy Lipidu II u *E.coli* je již ověřena (Siegel *et al.*, 2016; Sham *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017). Rovněž u *S. pneumoniae* se předpokládá, že MurJ je hlavní flipáza pro lipid II (Straume *et al.*, 2017).

### 3.1.3 Extracytoplasmatická fáze

Klíčovými kroky v III. fázi syntézy jsou polymerace Lipidu II v glykanové řetězce a zesíťování PG, které jsou katalyzovány PG syntázami označované jako PBPs = Penicilin vazebné proteiny (Goffin & Ghuysen, 1998). PBPs lze rozdělit do dvou kategorií podle molekulové hmotnosti na PBPs s vysokou molekulovou hmotností (HMW) a PBPs s nízkou molekulovou hmotností (LMW). HMW-PBPs jsou multimodulární a podílí se na polymeraci peptidoglykanu. Podle aktivity a struktury se HMW-PBPs dále rozdělují do dvou tříd – A a B. PBPs třídy A se vyznačují transglykosylační aktivitou na N-terminální doméně a transpeptidázovou aktivitou na C-terminální doméně. Třída B má transpeptidázovou aktivitu

rovněž na C-terminálu, avšak role N-terminální části se předpokládá v buněčné morfogenezi a buněčném cyklu. LMW PBPs jsou monofunkční enzymy často označované jako PBPs třídy C (Sauvage et al., 2008).

Polymerace Lipidu II probíhá prostřednictvím transglykosylační reakce, která spočívá v uvolnění peptidoglykanové podjednotky z lipidické kotvy (C55-PP) a připojení na rostoucí glykanový pramen přes 1-4 vazbu (Goffin & Ghuyesen, 1998). Lipidická kotva se po uvolnění působením fosfatáz přeměňuje na C55-P (undekaprenylfosfát) a recykluje pomocí zatím neznámé flipázy (Zhao *et al.*, 2017). Transglykosylace je katalyzovaná glykosyltransferázami, které se vyskytují ve formě N-terminálního konce PBPs třídy A asociovaného s C-koncovou doménou z rodiny GT51, která vykazuje transpeptidázovou aktivitu nebo ve formě samostatných membránových proteinů s glykosyltransferázovou aktivitou (proteiny SEDS - RodA, FtsW aj.) (Heijenoort, 2010; Chen *et al.*, 2019). Transpeptidační reakce zprostředkovávají zesíťování peptidoglykanu, které je nezbytné pro stabilní strukturu buněčné stěny (Heijenoort, 2010).

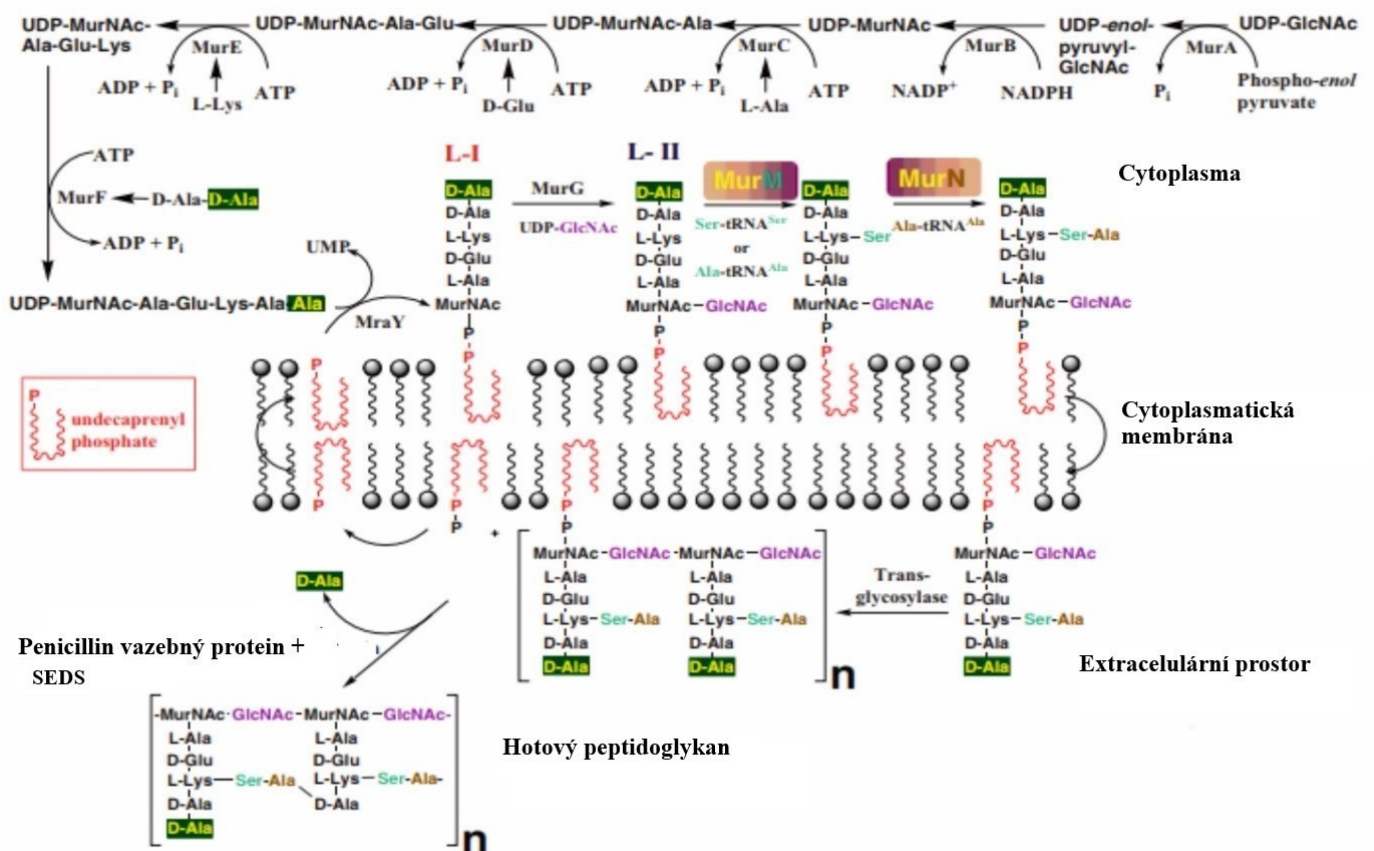
Existují dva typy zesíťovacích reakcí – DD-transpeptidace a LD-transpeptidace. DD-transpeptidace zahrnuje reakci mezi karboxylovou skupinou D-alaninu v pozici 4 donorové podjednotky peptidoglykanu a aminoskupinou L-lysinu nebo mDap v pozici 3 akceptorové podjednotky. DD-transpeptidázy se vyskytují jako C-terminální doména PBP třídy A nebo PBP třídy B a jsou vázané k cytoplasmatické membráně (Heijenoort, 2010). LD-transpeptidace je reakce, která je katalyzovaná penicilin-rezistentními proteiny, které jsou u řady bakterií stále neznámé. U *E. faecium* byla detekována LD-transpeptidáza Ldt<sub>fm</sub>, u *B. subtilis* Ldt<sub>bs</sub> a u *E. fecalis* Ldt<sub>fs</sub> (Magnet *et al.*, 2007b). LD-transpeptidázy katalyzují tvorbu vazby mezi karboxylem L-lysinu nebo mDap v pozici 3 donoru a aminoskupinou peptidového řetězce akceptoru v pozici 3 za uvolnění D-alaninu. Obecně jsou LD-transpeptidace méně časté, tvoří 3-10% obsahu muropeptidů. (Heijenoort, 2010; Magnet *et al.*, 2007a).

Počet a skladba PBPs je u bakterií individuální, například *B. subtilis* obsahuje 16 PBPs, z nichž jsou 4 PBPs třídy A a 6 PBPs třídy B a C, zatímco *S. pneumoniae* má 3 PBPs třídy A, 2 třídy B a 1 třídy C (Sauvage *et al.*, 2008). Jednotlivé třídy se rozdělují do dalších specifických podtříd. Obecně lze říci, že grampozitivní bakterie mají k dispozici tři podtřídy PBPs třídy A (A3, A4 a A5) (Sauvage *et al.*, 2008; Goffin & Ghuyesen, 1998). Z PBPs třídy B jsou typické B1, B4 a B5. B1 a B5 jsou domnělými ekvivalenty PBP2 *E. coli*, který lokalizuje v místě dělení a je nezbytný pro prodlužování a udržování tvaru. B4 jsou nezbytné pro



buněčné dělení a obsahují PASTA (penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated) domény (Sauvage *et al.*, 2008).

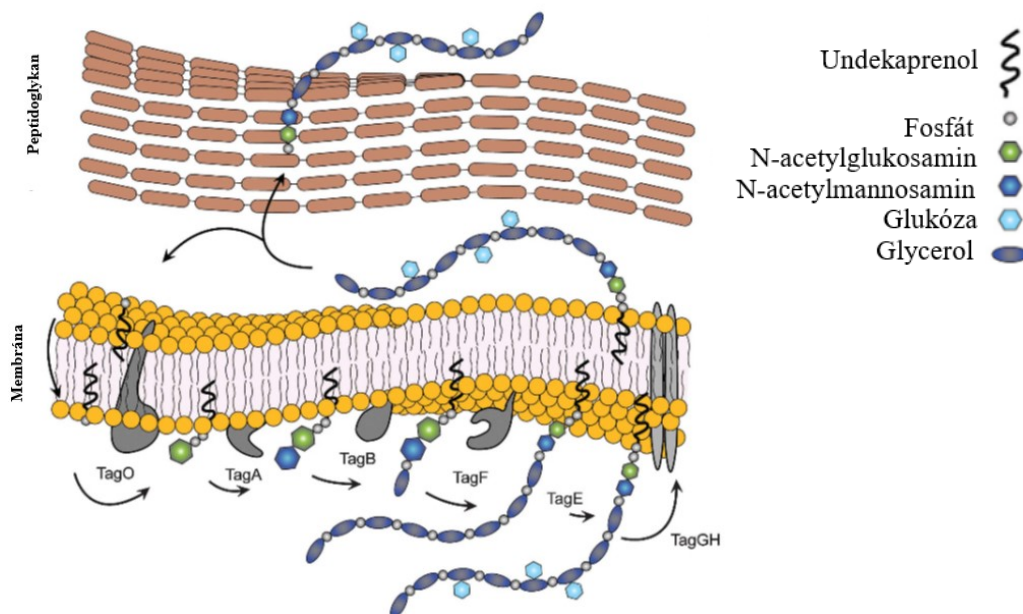
Syntéza buněčné stěny je spjata s dalšími procesy jako je prodlužování, dělení a sporulace řízené proteiny SEDS. Jedná se o integrální membránové proteiny, které představují rodinu glykosyltransferáz nezbytnou pro syntézu buněčné stěny. Do této rodiny patří třídy RodA, FtsW, SpoVE aj. Předpokládá se, že SEDS a PBP třídy B koordinovaně spolupracují a tvoří subkomplexy bPBP-SEDS (Meeske *et al.*, 2016; Emami *et al.*, 2017). U modelového organismu *B. subtilis* se v Rod komplexu, vyskytuje PBP2A a RodA (dále MreB a RodZ) a v divizomu PBP2B a FtsW (Meeske *et al.*, 2016). V současné době byl na základě pozorování dělení *S. pneumoniae* navržen model, ve kterém by PBP třídy A přejímaly peptidoglykan vytvořený komplexem PBP třídy B (PBP2x) a FtsW a opravovaly chyby nebo zhušťovaly vytvořenou síť (Straume *et al.*, 2020).



**Obr. 4: Syntéza peptidoglykanu.** Schéma znázorňuje všechny tři fáze biosyntézy buněčné stěny u gram pozitivních bakterií. První fáze probíhá v cytoplasmě a je zakončena vznikem Parkova nukleotidu. Druhá fáze se vyznačuje ukotvením prekurzorů k cytoplasmatické membráně a končí aktivací flipázy. Třetí fáze probíhá extracelulárně, dochází zde k tvorbě glykanových řetězců a zesílení PG. Převzato dle (Lloyd *et al.*, 2008).

### 3.2 Biosyntéza teichoových kyselin

Biosyntéza teichoových kyselin není u grampozitivních bakterií dobře prozkoumaná. Jedním z nejlépe zpracovaných modelů je *B. subtilis*, schéma syntézy teichoových kyselin je znázorněno na **Obr. 6**. Teichoové kyseliny *B. subtilis* jsou stejně jako peptidoglykan syntetizovány intracelulárně pomocí lipidového nosiče a výchozí molekulou je UDP N-acetylglukosamin. Geny kódující enzymy, které katalyzují jednotlivé reakce u *B. subtilis* jsou *tagABDEFGHO* a *mnaA*. Syntéza začíná reakcí UDP N-acetylglukosamin-1-fosfátu s lipidovým nosičem undekaprenylfosfátem za vzniku lipidu  $\alpha$  (Sewell & Brown, 2014). Reakce je katalyzována enzymem TagO. Dále se pomocí TagA připojuje N-acetylmannosamin, který vzniká epimerací GlcNAc enzymem MnaA. Vzniká lipid  $\beta$ , na který TagB navazuje první podjednotku glycerolfosfátu. Enzym TagD provádí aktivaci molekul glycerolu hydrolyzou CTP a vzniká CDP-glycerol, který je substrátem enzymů TagF a TagE. Následuje polymerace glycerolfosfátového řetězce katalyzovaná TagF s výsledným počtem 45-60 molekul glycerolfosfátu (Formstone *et al.*, 2008). Poslední modifikací je připojení molekul alfa-glukózy enzymem TagE na syntetizovaný řetězec. Konečnou fází je transport hotové kyseliny přes membránu pomocí ABC transportního systému TagGH a připojení fosfodiesterovou vazbou k peptidoglykanu (Sewell & Brown, 2014).



**Obr. 6:** Syntéza teichoových kyselin u grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*. Na obrázku jsou vidět jednotlivé kroky biosyntézy teichoových kyselin zprostředkované pomocí enzymů Tag a jejich výsledná struktura. Převzato dle (Sewell & Brown, 2014).

### 3.3 Regulace syntézy buněčné stěny

Regulační mechanismus syntézy buněčné stěny je složitý systém procesů. Vzhledem k hlavnímu zaměření této práce je zde uveden pouze stručný nástin problematiky.

Většina prokaryot využívá jako mechanismus regulace dvoukomponentové systémy složené z histidinkinázy a příslušného regulátoru (Stock *et al.*, 2000). Avšak bylo prokázáno, že v bakteriální biosyntéze buněčné stěny je velmi čtým mechanismem regulace také fosforylace/defosforylace příslušných proteinů pomocí serin/threoninových kináz eukaryotického typu (STK) a serin/threoninových fosfatáz (Egan *et al.*, 2017). U grampozitivních bakterií se vyskytuje ultrakonzervovaná podrodina těchto STK účastníci se procesů buněčného dělení. Tyto STK mají dvě hlavní části, kinázovou doménu a C-terminální doménu, která obsahuje několik PASTA domén (Nováková *et al.*, 2005). V případě *B. subtilis* byla identifikována proteinkináza PrkC (Shah *et al.*, 2008). U bakterie *S. aureus* se vyskytuje proteinkináza PknB, jejíž ligandem je prekurzor PG Lipid II (Hardt *et al.*, 2017). Bakterie *S. pneumoniae* obsahuje proteinkinázu StkP (Nováková *et al.*, 2005). Obecně lze říct, že ligandy proteinkinázových PASTA domén jsou peptidoglykanové podjednotky, které vazbou na doménu indukují enzymatickou aktivitu STK. U *S. pneumoniae* bylo dokázáno, že na doménu PASTA se váží beta-laktamová antibiotika (Maestro *et al.*, 2011). STK dále regulují enzymy buněčného dělení a syntézy PG, v případě StkP u *S. pneumoniae* jsou to například, FtsA, DivIVA, PpaC a GlmM (Nováková *et al.*, 2005; Nováková *et al.*, 2010; Beilharz *et al.*, 2012).

### 3.4 Celkový model biosyntézy peptidoglykanu

Nejpodstatnějším dějem v syntéze peptidoglykanu a stejně tak i v jiných buněčných dějích je koordinace jednotlivých buněčných procesů. V případě buněčné stěny je důležitá koordinace mezi její syntézou a degradací, kterou mají na starosti dva multiproteinové komplexy identifikované ve většině tyčinkovitých bakterií - elongasom a divisom (Billini *et al.*, 2019). Rozdílný systém lze pozorovat u koků. Koky obsahují nižší počet PBPs (obvykle 4-7) a jeden multiproteinový komplex, který lokalizuje přímo v septu (Zapun *et al.*, 2008). Podrobné složení komplexů stojících za biosyntézou je nad rámec předkládané bakalářské práce, a proto jsou v této kapitole pouze stručně nastíněny hlavní komponenty těchto složitých systémů.

### 3.4.1 Elongasom

Jelikož je celková představa o elongasomu zatím nejasná, rozvíjí se vícero teorií o jeho podobě. Velký zájem budí homolog aktinu protein MreB, který se vyskytuje u většiny tyčinkovitých bakterií a má u nich podle všeho v elongasomu důležitou roli. Stěžejní teorie hovoří o spirálovité vláknité struktuře MreB nebo o tvaru pohyblivých záplat (disconnected patches) (Jones *et al.*, 2001; Errington, 2015). MreB je zobrazován jako vláknitý protein napojený na vnitřní část membrány, který řídí umístění elongasomu (Errington, 2015; Billini *et al.*, 2019). Má zvláštní afinitu k aberantním místům membrány, díky které přispívá k udržení tvaru bakterie a jeho vlákna tvoří kostru elongasomu, jelikož mají funkci scaffold (lešení) a váží na sebe PBPs, hydrolázy peptidoglykanu a další regulační proteiny (Errington & Wu, 2017; Egan *et al.*, 2017). Některé bakterie jako například *Corynebacterium glutamicum* MreB ani jeho homolog neobsahují. Prodlužování u *C. glutamicum* je založeno na zcela odlišném modelu. Během elongace se PG-syntetický komplex formuje na pólech buňky a obsahuje proteiny FtsZ, FtsEX, FtsK, FtsQ, FtsB, FtsW a tři HMW-PBPs třídy B (Letek *et al.*, 2008). Obecně je však přesné složení proteinů v elongasomu a jejich interakce u většiny bakterií zatím neznámé. Existuje několik seznamů potenciálních proteinů elongasomu, kde se objevují i známé proteiny jako některé PBPs, proteiny Tag, RodA, RodZ, proteiny Fts a další (Errington & Wu, 2017; Errington, 2015).

### 3.4.2 Divisom

Divisom je multiproteinový komplex, který zajišťuje konstrikci membrány při dělení a tvorbu nových povrchových struktur (Tsang & Bernhardt, 2015). Označení místa dělení a regulaci celého procesu zajišťuje homolog tubulinu GTPáza FtsZ, který společně vytváří základ prstencovité struktury zvané Z-ring. Z-ring označuje místo rozdělení a je nezbytný pro lokalizaci a aktivitu všech ostatních proteinů dělicí mašinerie (Errington *et al.*, 2003; Bisson-Filho *et al.*, 2016). Zejména stimuluje septální PG syntázy, hydrolázy a další regulační proteiny (například u *B. subtilis* PBP2b, FtsW, DivIB, DivIC, FtsL), které řídí syntézu nově vznikající buněčné stěny. Jako negativní regulátor Z-ring byl v případě *B. subtilis* identifikován protein EzrA, který destabilizuje polymery FtsZ (Errington *et al.*, 2003). Celková organizace a dynamika FtsZ v reálném čase stále není známá. Stejně tak zatím není jasný komplexní model organizace a interakcí proteinů divisomu (Bisson-Filho *et al.*, 2016).

## 4 Antibiotika

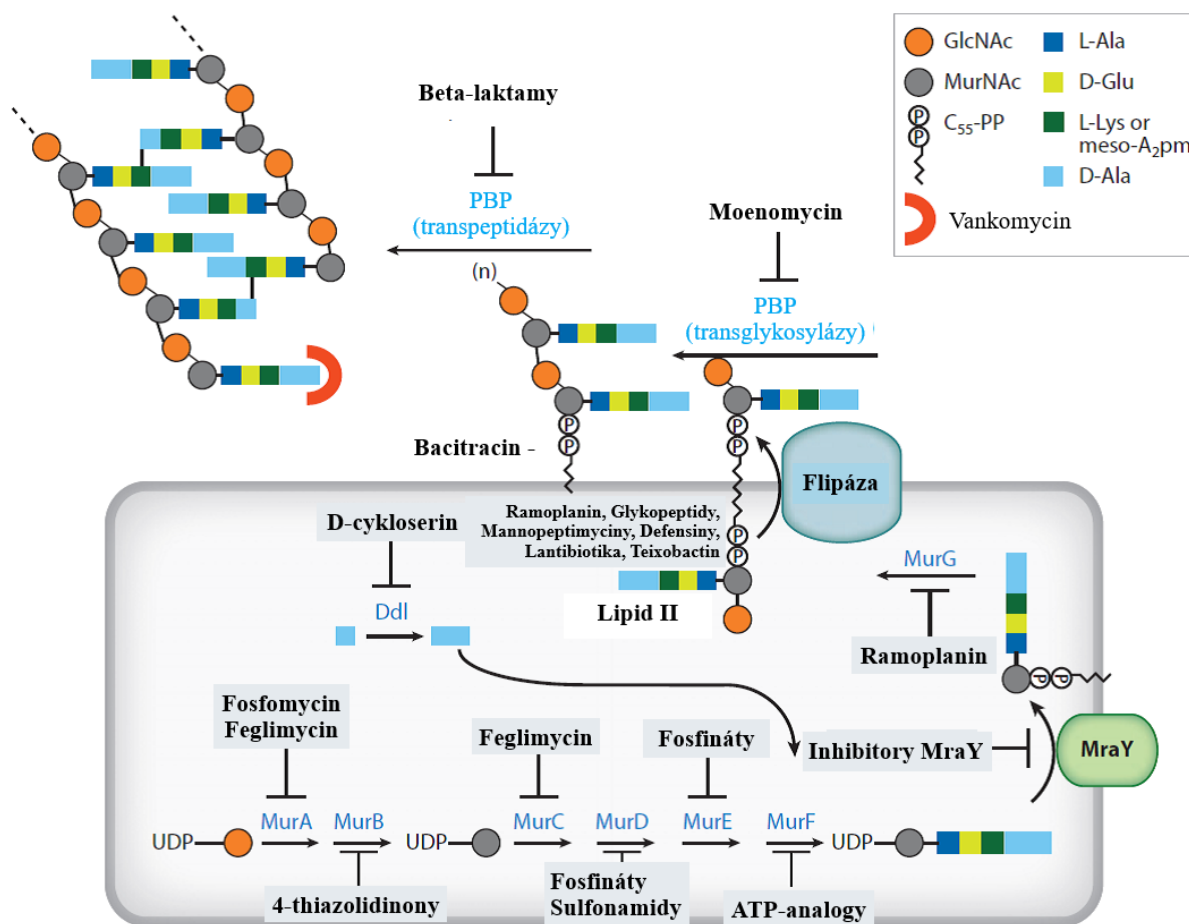
Antibiotika jsou různorodá skupina chemických látek s rozmanitými biologickými účinky. Zpravidla se jedná o nízkomolekulární metabolity (hmotnost pod 2000 kDa) produkované mikroorganismy, které hubí jiné organismy nebo inhibují jejich růst. V současné době existují antibiotika i s vyšší molekulovou hmotností než 2000 kDa. Antibiotika se využívají ve veterinární i humánní medicíně včetně terapie nádorových onemocnění. Přírodně se vyskytující antibiotika jsou často chemicky modifikována a transformována na látky s novými biologickými účinky (Spížek, 2016). Antibiotika lze systematicky rozdělit podle místa účinku. Dělí se na antibiotika, která cílí na buněčnou stěnu, cytoplasmatickou membránu, nukleové kyseliny, ribozomy a dále na oxidačně působící antibiotika a antibiotika inhibující jednotlivé metabolické dráhy (Beneš, 2018). V rámci této práce se zaměříme na antibiotika působící na syntézu buněčné stěny grampozitivních bakterií.

### 4.1 Inhibitory syntézy buněčné stěny

Peptidoglykan je pro bakterii velmi fyziologicky významný, a proto jsou enzymy jeho syntézy ideálním cílem antibiotik. Inhibitory syntézy buněčné stěny jsou tak jednou z nejúčinnějších a nejrozsáhlejších tříd (Sarkar *et al.*, 2017). Přehled jednotlivých fází biosyntézy peptidoglykanu s příslušnými antibiotiky a s konkrétními cílovými molekulami je znázorněn na **Obr. 7** a v **Tab. 1**.

Fáze biosyntézy buněčné stěny	Antibiotikum	Cílová molekula
Fáze I.	Fosfomycin	MurA
	4-Thiazolidinony	MurB
	Feglymycin	MurA, MurC
	Sulfonamidy	MurD
	Fosfináty	MurD, MurE
	ATP-analogy	MurF
	D-cycloserin	Ddl, Alr
Fáze II.	MraY inhibitory	MraY
	Ramoplanin	MurG, Lipid II
Fáze III.	Beta-laktamy	PBPs
	Glykopeptidy	Lipid II (D-Ala-D-Ala terminál)
	Mannopeptimyciny	Lipid II, LTA
	Defensiny (Plectacin)	Lipid II
	Lantibiotika (Nisin)	Lipid II
	Bacitracin	Undekaisoprenylpyrofosfát
	Moenomycin	Transglykosyláza
	Teixobactin	Lipid II, prekurzory WTA

Tab. 1: Přehled antibiotik inhibujících biosyntézu buněčné stěny a jejich cílové molekuly



**Obr. 7:** Schéma zobrazuje přehled reakcí účastnících se syntézy peptidoglykanu u grampozitivních bakterií a antibiotik, která příslušné reakce inhibují. VI. fázi syntézy je počáteční molekulou UDP-GlcNAc, která je pomocí enzymů Mur modifikována na UDP-MurNAc-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Mezi inhibitory této kaskády patří fosfomycin, 4-thiazolidinony, feglimycin, sulfonamidy, fosfináty, ATP-analogy a D-cykloserin. V druhé membránové fázi se uplatňují MraY inhibitory a Ramoplanin. Ve III. fázi jsou účinné beta-laktamy, glykopeptidy, ramoplanin, defensiny, lantibiotika, bacitracin, moenomycin a teixobactin. Převzato dle (Lovering et al., 2012) a upraveno.

#### 4.1.1 Antibiotika inhibující I. fázi biosyntézy

Látky působící na intracelulární část biosyntézy peptidoglykanu jsou v praxi využívány jen velmi málo a klinické využití mají zatím jen dvě látky tohoto typu Fosfomycin a D-cykloserin (Simčič et al., 2012; Sarkar et al., 2017).

##### 4.1.1.1 Fosfomycin

Fosfomycin je širokospektrální antibiotikum účinné proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, které je produkováno bakteriemi rodu *Streptomyces* a *Pseudomonas* (Sarkar et al., 2017). Inhibiční účinek fosfomycinu spočívá v analogii se substrátem enzymu MurA - fosfoenolpyruvát (PEP). Fosfomycin se kovalentně váže na thiolovou skupinu cysteinu C115 v aktivním místě enzymu MurA, což vyvolává inhibici jeho aktivity (Falagas et al., 2016; Lovering et al., 2012). Některé bakterie (*Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi* aj.) jsou vůči fosfomycinu rezistentní v důsledku záměny klíčového cysteinu za kyselinu asparagovou. Existují další případné inhibitory MurA

s nekovalentní vazbou na aktivní místo enzymu jako například pyrazolopyrimidin a anology purinu, u kterých se však zároveň prokázaly i nespecifické inhibice DNA, RNA a proteinů (Hrast *et al.*, 2014).

#### 4.1.1.2 4-thiazolidinony

4-thiazolidinony účinné v I. fázi biosyntézy peptidoglykanu jsou 2,3,5 trisubstituované 4-thiazolidinony. Jedná se o deriváty thiazolidinu s karbonylovou skupinou v poloze 4. Další substituenty v poloze 2, 3 a 5 jsou variabilní a mohou ovlivňovat vlastnosti molekuly. Bylo prokázáno, že stěžejní částí pro antibakteriální aktivitu 4-thiazolidinonů je thiazolidinový kruh (Verma & Saraf, 2008). Tyto sloučeniny byly vyvinuty jako inhibitory enzymu MurB. Mechanismus účinku spočívá v analogické struktuře 4-thiazolidinonů s difosfátovou skupinou enolpyruvát-UDP-GlcNAc, který se váže do vazebného místa pro nukleové cukry enzymu MurB (Verma & Saraf, 2008; Hrast *et al.*, 2014).

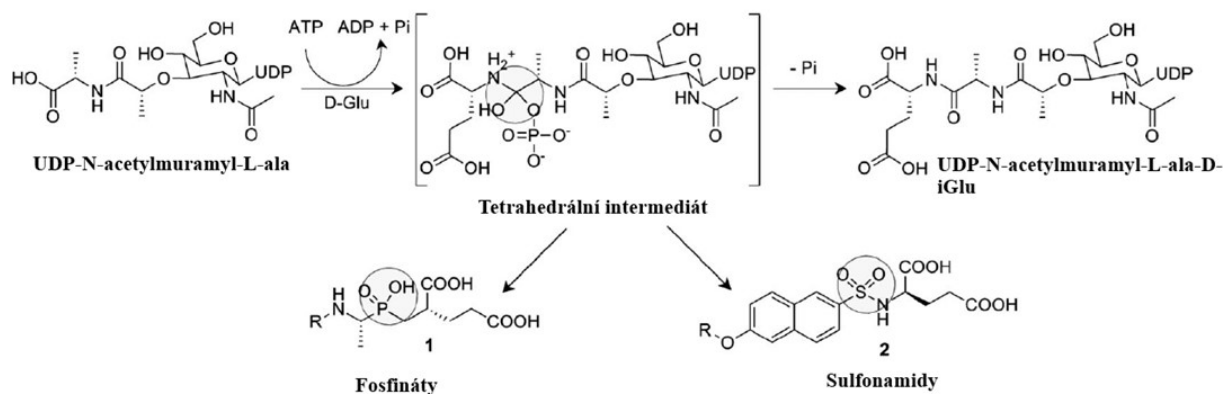
#### 4.1.1.3 Feglymycin

Feglymycin izolovaný z bakterií rodu *Streptomyces* je účinné antibiotikum i antivirotikum (Rausch *et al.*, 2011). Strukturně se jedná o lineární 13-merní peptid tvořený především neproteinogenními aminosylinami 4-hydroxyfenylglycinem (Hpg) a 3,5-dihydroxyfenylglycinem (Hänchen *et al.*, 2013). Antibiotický účinek je omezený pouze na grampozitivní bakterie, jelikož feglymycin neprochází vnější membránou gramnegativů (Rausch *et al.*, 2011). Cílová molekula feglymycinu je stejně jako u fosfomycinu enzym MurA, ale hlavně také enzym MurC, který je k němu 10x citlivější. Mechanismus účinku je pravděpodobně zajištěn vazbou na enzym, jelikož inhibice má nekompetitivní charakter, a proto je vyloučeno, že by se jednalo o analog substrátu. Samotná inhibiční reakce je reverzibilní, což naznačuje, že inhibice má nekovalentní charakter (Rausch *et al.*, 2011; Hänchen *et al.*, 2013). Důležitou roli v účinku hrají strukturní aminosyliny D-Hpg1, L-Hpg5 a L-Phe12. Aromatický charakter těchto aminosylin naznačuje, že se inhibice účastní  $\pi$ - $\pi$  interakce (Hänchen *et al.*, 2013).

#### 4.1.1.4 Sulfonamidy

Sulfonamidy patří obecně mezi důležité skupiny farmaceutických léčiv a jedná se o jednu z nejstarších antibiotických tříd. Jejich obecný vzorec je A-SO<sub>2</sub>-NHR, kde funkční skupina může být vázána na aromatické, heterocyklické, alifatické nebo cukerné lešení (ve vzorci onačeno jako A). R může mít také různou strukturu od vodíku H až po různé funkční skupiny jako například OH, NH<sub>2</sub> aj. (Supuran, 2017). Několik derivátů sulfonamidů s antibiotickými účinky bylo optimalizováno pro inhibici enzymu MurD. Enzym MurD je u

bakterií vysoce stereospecifický pro D-glutamovou kyselinu a katalyzuje v syntéze peptidoglykanu vytvoření peptidové vazby mezi touto kyselinou a UDP-N-acetylmuramyl-L-Ala (Walsh *et al.*, 1999; Humljan *et al.*, 2008). Při reakci zprvu dochází k fosforylaci karboxylu UDP-N-acetylmuramoyl-L-Ala a k přeměně ATP na ADP, tento acylfosfát je následně napaden D-glutamovou kyselinou a vzniká tetrahedrální meziproduct (**Obr. 8**). Tento meziproduct se rozpadá na produkt UDP-N-acetylmuramoyl-L-Ala-D-iGlu a fosfát (Humljan *et al.*, 1999).

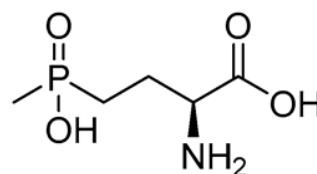


**Obr. 8: Analogie mezi tetrahedrálním intermediátem a sulfonamidy.** Na obrázku je vidět schéma reakce zprostředkované enzymem MurD a struktura fosfinátových a sulfonamidových antibiotik inhibujících biosyntézu peptidoglykanu. Struktura sulfonamidů i fosfinátů je analogní se strukturou tetrahedrálního meziproductu reakce. Převzato dle Humljan *et al.* (1999).

Sulfonamidy a stejně tak fosfináty byly vytvořeny jako analogní molekuly tetrahedrálního meziproductu vyskytujícího se v reakci katalyzované MurD (Humljan *et al.*, 1999; Hrast *et al.*, 2014). Existují dvě generace sulfonamidových inhibitorů MurD. Sulfonamidy první generace mají základ v naftalen-N-sulfonyl-D-glutamové kyselině, která se dále substituuje. V druhé generaci je pro zvýšení inhibičního účinku nahrazována flexibilní D-glutamová kyselina stabilními analogy na bázi benzenu nebo cyklohexyl dikarboxylových kyselin (Simčič *et al.*, 2012; Hrast *et al.*, 2014).

#### 4.1.1.5 Fosfináty

Obecně jsou fosfináty poměrně vzácnou třídou molekul produkovaných různými druhy *Actinobacteria*. Nejvýznamnější skupinou fosfinátů jsou peptidová antibiotika vyznačující se výskytem ojedinělé fosfinátové aminokyseliny fosfinitricinu (**obr. 9**). Konkrétně mezi taková antibiotika patří například fosfinitricylalanylglycin nebo fosfinitricylalanylvalin produkované *Streptomyces*



**Obrázek č. 9: Fosfinitricin.** Strukturální vzorec fosfinátové aminokyseliny fosfinitricinu produkované bakterií *Streptomyces hygroscopicus*. Převzato dle (Petkowski *et al.*, 2019).



*hygroscopius* (Petkowski *et al.*, 2019). Účinek fosfinátů je znám u grampozitivních i gramnegativních bakterií a spočívá v inhibici enzymů MurD a MurE, jejichž funkcí je připojování aminokyselin peptidového spoje v peptidoglykanové síti (Štrancar *et al.*, 2007). Zatímco MurD je vysoce specifický, specifita MurE se může mezi bakteriálními druhy lišit. V *E. coli* nebo *B. subtilis* katalyzuje připojení mDap na třetí pozici, ale např. v *S. pneumoniae* a *S. aureus* dochází na třetí pozici k připojení L-lys (Pazos & Peters, 2019). Mechanismus inhibice MurD fosfináty je stejný jako v případě sulfonamidů uvedený v kapitole 4.1.1.4. Jde o analogii mezi fosfináty a tetrahedrálním meziproduktem. Jako inhibitory MurE byly vytvořeny analogy jeho substrátu UDP-MurNac-dipeptidu a některé z nich vykazují inhibiční účinnost u obou těchto enzymů zároveň (Štrancar *et al.*, 2007).

#### **4.1.1.6 ATP-analogy**

MurF je v pořadí poslední Mur ligázou katalyzující připojení dipeptidu D-Ala-D-Ala k UDP-MurNac tripeptidu za vzniku Parkova nukletidu (Vollmer, 2008). Inhibitorů cílících na MurF je velmi málo. Jedním z důvodů je, že jeho substrát UDP-MurNac-tripeptid není komerčně dostupný a je potřeba jeho syntéza. Jedním z mála existujících inhibitorů je nehydrolyzovatelný analog ATP adenyllyl 5'-( $\beta,\gamma$ -methylendifosfonát) (AMP-PCP). AMP-PCP konkuruje ATP, které se k enzymu MurF váže v prvním kroku katalýzy a blokuje enzym MurF (Baum *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 1996). Aktivita ATP-analogů byla prokázána především u *E. coli*, ale také u některých grampozitivních bakterií jako například *S. aureus* (kmeny citlivé a rezistentní vůči methicilinu), *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* (Baum *et al.*, 2007).

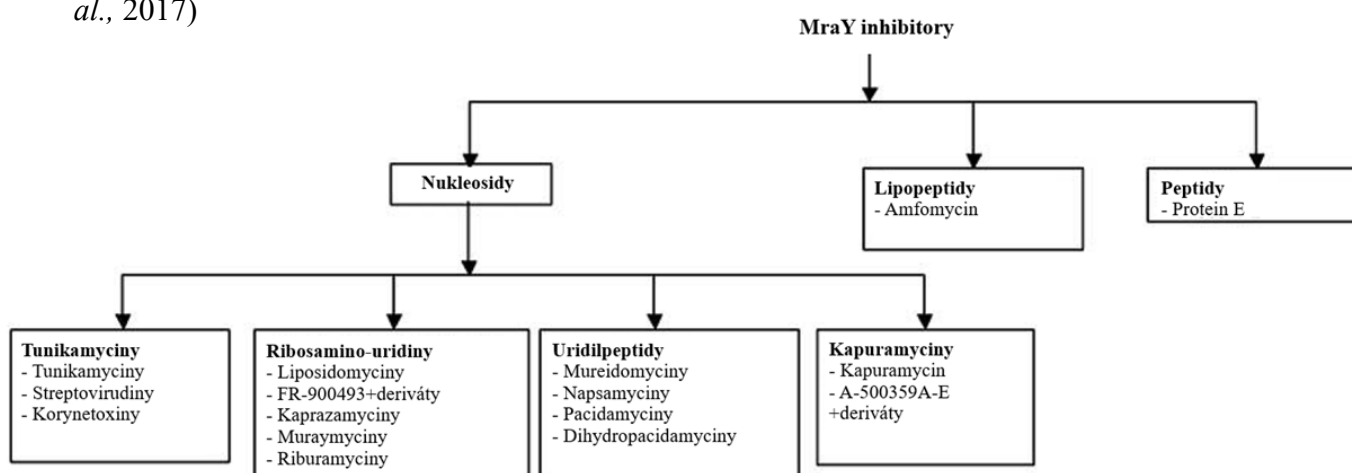
#### **4.1.1.7 D-cykloserin**

Jedná se o další antibiotikum produkované bakteriemi rodu *Streptomyces*, které se užívá k léčbě tuberkulózy (Sarkar *et al.*, 2017). D-cykloserin cílí na dva typy konzervovaných enzymů D-ala-D-ala ligázy (Ddl) a D-ala racemázy (Alr), které v syntéze peptidoglykanu zprostředkovávají propojení dvou koncových aminokyselin peptidového můstku peptidoglykanové podjednotky (Sarkar *et al.*, 2017, Siegel *et al.*, 2016). Jelikož cyklická struktura molekuly D-cykloserinu je analogická D-alaninu, mechanismus účinku odpovídá kompetitivní inhibici (Prosser & Carvalho, 2013). Inhibice Alr je nevratná, což vyvolává reakci bakterie ve formě zvýšené exprese Alr. Díky tomu dochází ke snížení poměru antibiotika vůči enzymu Alr a tím se snižuje množství volného antibiotika, což snižuje jeho účinek. Dle výzkumu, jehož autory jsou Prosser & Carvalho (2013), je inaktivace Ddl naopak reverzibilní a probíhá přes inhibici vazebného místa pro D-Ala-D-ala.

## 4.1.2 Antibiotika inhibující II. fázi biosyntézy

### 4.1.2.1 Inhibitory *MraY*

Enzym *MraY* je esenciální transmembránový protein patřící do superrodiny PNPT (polyprenyl-fosfát N-acetylhexosamin-1-fosfát transferázy), který u bakterií katalyzuje přenos UMP-MurNAc-pentapeptidu z UDP-MurNAc-pentapeptidu na undekaprenylfosfát (C55-P) za vzniku Lipidu I a UMP (Lecerclé *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2013). Inhibitory *MraY* lze rozdělit do tří velkých kategorií: nukleosidová antibiotika, lipopeptidová antibiotika a peptidové inhibitory. Pod tyto kategorie spadá několik antibiotických tříd (**Obr. 10**), avšak žádná z nich neobsahuje antibiotikum, které by bylo klinicky schválené (Dini, 2005; Sarkar *et al.*, 2017)



**Obr. 10: Rozdělení inhibitorů *MraY*.** Schéma zobrazuje rozdělení *MraY* inhibitorů na nukleosidy, lipopeptidy a peptidy. Nukleosidy se dále dělí na Tunikamyciny, Ribosamino-uridiny, Uridilpeptidy a Kapuramyciny. Převzato dle (Dini, 2005).

Výraznou účinnost na grampozitivní bakterie vykazují především Tunicamyciny, Riburamyciny a Amfomycin. (Dini, 2005). Tunicamyciny jsou strukturálními analogy UDP-N-acetylhexosaminu, jejichž kostru tvoří molekula tunicamin. Byla potvrzena jejich schopnost tvořit komplexy v přítomnosti  $Mg^{2+}$ . Tyto ionty se vyskytují v aktivním místě enzymu *MraY* a jsou k jeho fungování nezbytné (Dini, 2005; Chung *et al.*, 2014). Riburamyciny jsou syntetická antibiotika. Jejich strukturu tvoří disacharid tvořený ze zbytku ribosaminu vázaného pomocí glykosidické vazby na uridin. Amfomycin je undekapeptid, který obsahuje 3-isododekanovou kyselinu. Mechanismus účinku je nekompetitivní inhibice *MraY*. Amfomycin vytváří komplexy s undekaprenylfosfátem za přítomnosti vápenatých iontů, což zabraňuje enzymatické reakci (Dini, 2005).

#### 4.1.2.2 *Ramoplanin*

Ramoplanin byl poprvé izolován z bakterií rodu *Actinoplanes* v 80. letech (Sarkar *et al.*, 2017). Jedná se o lipoglykopeptidové antibiotikum výborně účinkující na gram pozitivní bakterie včetně kmenů rezistentních na vankomycin, které obsahuje neobvyklé aminokyseliny jako hydroxyfenylglycin a zbytky N-lipo-asparaginu (Hashizume *et al.*, 2008). Ramoplanin byl původně navržen, aby se vázal na Lipid I a tím blokoval enzym MurG (Helm *et al.*, 2002). Tento účinek byl potvrzen, avšak tato inhibice je tak slabá, že jí není přikládán hlavní antibiotický účinek (Hu *et al.*, 2003). Bylo však zjištěno, že ramoplanin se s větší afinitou váže na substrát Lipid II (Helm *et al.*, 2002). Hlavní mechanismus účinku ramoplaninu spočívá v jeho dimerizaci do molekuly tvaru „V“ lemovanou krajními ornithiny. Právě ornithiny hrají důležitou roli ve vazbě na Lipid II, jelikož při jejich acylaci se inhibiční účinek výrazně snižuje. Navázáním dimeru ramoplaninu na Lipid II dochází k inhibici transglykosyláz (Hu *et al.*, 2003; Hashizume *et al.*, 2008).

#### 4.1.3 Antibiotika inhibující III. fázi biosyntézy

##### 4.1.3.1 *Beta-laktamy*

Beta-laktamy patří mezi nejobsáhlejší a nejpoužívanější skupiny antibiotik. Patří do nich 5 významných tříd: peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a také inhibitory beta-laktamáz, které jsou, díky přibývajícím rezistencím nejmladším přírůstkem (Bush & Bradford, 2016). Dále pod beta-laktamy spadají další samostatné molekuly, které mají různé odlišnosti ve struktuře jádra molekuly: cefamyciny, penemy, karbacefemy, oxacefemy a další (Beneš, 2018). Pro beta-laktamy je charakteristický čtyřčlenný beta-laktamový kruh, který se v případě monobaktamů vyskytuje samostatně nebo je napojen na sekundární kruh. K inhibici syntézy peptidoglykanu dochází vazbou na PBPs - kap. 3.1.3. (Sarkar *et al.*, 2017). Beta-laktamy svou strukturou napodobují charakteristickou koncovou část oligopeptidového řetězce peptidoglykanové podjednotky – aminokyselinovou sekvenci D-Ala-D-Ala (Tipper & Strominger, 1965; Bush & Bradford, 2016). Serin v aktivním místě PBPs atakuje karbonyl beta-laktamového kruhu, dochází ke štěpení kruhu a tvorbě neaktivního acyl-enzymu. Díky kovalentní vazbě a chybějící odstupující skupině má tento komplex dlouhou trvanlivost a dochází k blokaci aktivního místa enzymu (Sarkar *et al.*, 2017).

Významné a hojně používané třídy beta-laktamů jsou především peniciliny a cefalosporiny. Peniciliny jsou nejstarší skupinou antibiotik vůbec, poprvé byl penicilin

pozorován již v roce 1928 A. Flemingem. Strukturu penicilinů tvoří thiazolidinový kruh připojený k beta-laktamu. Jádro molekuly je tvořeno kyselinou 6-amino penicilanovou (6-APA), která je základem i semisyntetických penicilinů, u kterých lze pomocí substituce postranních řetězců modifikovat biologickou aktivitu. Tímto způsobem vznikly dnes užívané peniciliny jako například fenethicilin, methicilin, ampicilin, amoxycilin a další (Shahid et al., 2009).

Cefalosporiny byly objeveny jako produkt houby *Cephalosporium acremonium*, která produkuje cefalosporiny C, N a P. Základ molekuly cefalosporinu je tvořen kyselinou 7-aminocefalosporanovou, jejíž substitucí se modifikují vlastnosti antibiotika (Shahid et al., 2009). Cefalosporiny jsou obsáhlá třída, která se rozděluje do čtyř generací. Proti grampozitivním bakteriím účinkují cefalosporiny první, druhé a čtvrté generace. První generace je účinná proti aerobním grampozitivním kokům a druhá generace vykazuje variabilní aktivitu proti stafylokokům. Do čtvrté generace se řadí širokospektrální antibiotikum cefepim, které inhibuje růst grampozitivních i gramnegativních bakterií včetně penicilin-rezistentního *S. pneumoniae* (Marshall & Blair, 1999; Giamarellou et al., 2013).

#### 4.1.3.2 Glykopeptidy

Glykopeptidy jsou glykosylované heptapeptidy s antibiotickou aktivitou, které produkují některé půdní Aktinomycety. Jsou účinné především na grampozitivní bakterie včetně penicilin-rezistentních kmenů. Základní strukturu přírodních glykopeptidů tvoří heptapeptid obsahující aromatické aminokyseliny, které jsou v případě semisyntetických glykopeptidů substituované dalšími skupinami, jako jsou zbytky cukrů, chlor nebo lipidové řetězce (Binda et al., 2014). Účinek glykopeptidů spočívá ve vazbě antibiotika na C-konec pentapeptidu Lipidu II, konkrétně na koncovou část D-Ala-D-Ala pomocí pěti vodíkových vazeb a řadou Van der Waalsových interakcí. Navázáním glykopeptidu dochází k destabilizaci buněčné stěny a antibiotikum zároveň fyzicky brání transglykosylaci a transpeptidaci, čímž způsobuje inhibici biosyntézy (Binda et al., 2014; James et al., 2012). Sled těchto událostí zapříčiní ztenčování peptidoglykanu a vyšší citlivost bakterie na osmotické změny, které vedou k buněčné lyzi (Sarkar et al., 2017; Binda et al., 2014).

Mezi glykolipidy první generace patří nejznámější zástupci této třídy antibiotik vankomycin a teikoplanin, které se užívají proti komplikovaným grampozitivním infekcím. Obě tato antibiotika obsahují jak proteinogenní, tak neproteinogenní aminokyseliny (4-hydroxyfenylglycin, 3,5-dihydroxyfenylglycin a p-hydroxytyrosin), přičemž vankomycin má

ve své struktuře pět aromatických a dvě alifatické aminokyseliny a teikoplanin obsahuje pouze aromatické (Binda *et al.*, 2014). Antibakteriální aktivita a toxicita teikoplaninu a vankomycinu je obdobná. Rozdílem je, že vankomycin v roztoku dimerizuje a díky tomu má větší afinitu k substrátu. Teikoplanin nedimerizuje a vykazuje vyšší účinnost proti některým bakteriím rodu *Stafylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus* (Sarkar *et al.*, 2017; Binda *et al.*, 2014). Glykopeptidy druhé generace mají vyšší antibakteriální aktivitu než vankomycin a účinkují i na vankomycin-rezistentní kmeny. Společným strukturálním znakem je hydrofobní řetězec, který slouží jako membránová kotva. Do této třídy patří antibiotika telavancin, oritavancin a dalbavancin (Sarkar *et al.*, 2017).

#### **4.1.3.3 Manno-peptimyciny**

Manno-peptimyciny byly poprvé izolovány v 50. letech 20. století. Představují třídu lipoglykopeptidových antibiotik a jsou produkovány bakterií *Streptomyces hygroscopicus* (Olivier *et al.*, 2010). Významná je jejich aktivita proti širokému spektru gram pozitivních bakterií včetně methicilin rezistentním stafylokokům a vankomycin rezistentním enterokokům. Z hlediska struktury se jedná o glykosylované cyklické hexapeptidy, které obsahují střídající se L a D stereoizomery aminokyselin, z nichž aminokyseliny  $\beta$ -hydroxyenduracididiny jsou naprosto unikátní a nevyskytují se v žádném jiném přírodním produktu. Na toto peptidové lešení jsou napojené disacharidové skupiny a mannosylsacharid (He *et al.*, 2004, Olivier *et al.*, 2010). Mechanismus účinku manno-peptimycinů je stejný jako u glykopeptidů, který byl popsán v předchozí kapitole 4.1.3.2. Některé manno-peptimyciny zároveň elektrostaticky interagují s LTA, což by mohlo znamenat další inhibiční účinek. I přes to, že se s vankomycinem váží na stejnou cílovou molekulu Lipid II, nekonkurují si, a proto je vyloučeno, že by manno-peptimyciny interagovaly s peptidovou částí Lipidu II (Ruzin *et al.*, 2004).

#### **4.1.3.4 Defensiny**

Defensiny představují kationtové a amfipatické peptidy, které se vyskytují v rostlinách, hmyzu i savcích. V organismech se vyvinuly během evoluce především jako obranný mechanismus proti virovým, bakteriálním a houbovým infekcím. Z hlediska chemické struktury se jedná o malé proteiny tvořené 18-45 aminokyselinami, které obsahují 6-8 cysteinových zbytků (Falanga *et al.*, 2017). Významnou aktivitu proti gram pozitivním bakteriím vykazuje houbový defesin plectasin. Bylo prokázáno, že plectasin se s vysokou afinitou váže na Lipid II a vytváří komplex, čímž blokuje syntézu buněčné stěny. Jeho molekula obsahuje 40 aminokyselin a skládá se do cysteiny stabilizované alfa-beta struktury.

Pravděpodobným způsobem účinku je, že plectasin má hydrofobní část umístěnou v membránovém rozhraní a váže se na pyrofosfátovou skupinu Lipidu II z vnější strany membrány. Primární struktury plectasinu jsou obdobné také u defensinů některých bezobratlých. (Schneider *et al.*, 2010). Defensiny obratlovců se rozdělují do tří rodin  $\alpha$ -defensiny,  $\beta$ -defensiny a  $\theta$ -defensiny.  $\alpha$ -defensiny a  $\beta$ -defensiny se vyskytují v lidském těle,  $\theta$ -defensiny jsou pseudocyklické defensiny s výskytem u opic rodu Makak rhesus. Tyto netoxické a obzvláště stabilní molekuly představují slibný základ pro navrhování nových antimikrobiálních látek (Falanga *et al.*, 2017).

#### **4.1.3.5 Lantibiotika**

Lantibiotiky se nazývají antimikrobiálně aktivní lantipeptidy produkované bakteriemi druhů *Firmicutes* a *Actinobacteria*, které obsahují aminokyselinu lantionin (Gomes *et al.*, 2017; Hsu *et al.*, 2004). Struktura lantibiotik může být globulární nebo fibrilární a člení se do tří kategorií podle příslušného biosyntetického aparátu, který je modifikuje. I. kategorie je modifikována enzymy LanB a LanC, II. kategorie pomocí LanM a III. kategorie LanKC (Rea *et al.*, 2011). Mechanismus inhibice spočívá ve vazbě na pyrofosfát-cukerný zbytek prekursoru Lipidu II, popřípadě na další prekuzory undekaprenylfosfátu (C55-P). Za jedno z nejúčinnějších lantibiotik je považován mikrobisporicin, který se vyznačuje silnou aktivitou proti aerobním i anaerobním grampozitivům (Gomes *et al.*, 2017). Dalším významným antibiotikem spadajícím do této skupiny je nisin, který tvoří peptid se 34 zbytky obsahující pět lantioninových kruhů a tři dehydratované aminokyseliny. Navrhovaný mechanismus účinku je vazba na pyrofosfátovou skupinu Lipidu II obdobně jako v případě plectasinu. V případě nisinu bylo pozorováno, že dochází také k tvorbě póru (Hsu *et al.*, 2004).

#### **4.1.3.6 Bacitracin**

Bacitracin je metalopeptidové antibiotikum izolované z bakterie *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*, které se řadí do antibiotické skupiny cyklických lipopetidů, avšak strukturou se jedná spíše o cyklický peptid (Beneš, 2018). Antibiotické účinky vykazuje v přítomnosti dvojmocných kationtů hlavně proti grampozitivním kokům a bacilům, včetně *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Clostridium difficile* i některým archaebakteriím (Ming & Epperson, 2002). Nejvýznamnější a klinicky používaný je Bacitracin A, který strukturně odpovídá cyklickému dodekapeptidu. Ve své struktuře obsahuje neobvyklý thiazolidinový kruh, vytvořený kondenzací karboxylové skupiny isoleucinu s merkapto- a amino- skupinami cysteinu, sedmičlenný peptidový kruh a čtyři D-aminokyseliny, z nichž jedna je D-ornithin (Ming & Epperson, 2002; Galardy *et al.*, 1971). Mechanismus účinku bacitracinu spočívá ve

vazbě na C55-PP. Navázáním blokuje jeho recyklaci na C55-P, čímž inhibuje kompletní cyklus přenosu Lipidu II přes membránu (Economou *et al.*, 2013; Stone & Strominger, 1971; Ming & Epperson, 2002). Další aktivitou bacitracinu je, že se váže na proteázy a na proteiny asociovanými s membránou, což má vliv na její funkci. Inhibuje také glukosyltransferázový systém a disulfidovou izomerázu (Ming & Epperson, 2002). Nedávné studie objevily zcela nový účinek bacitracinu v lidském organismu. Bacitracin neutralizuje řadu bakteriálních toxinů včetně transferázy (binární toxin) *C. difficile* a chrání lidské buňky před intoxikací, aniž by došlo ke změně jejich morfologie (Zhu *et al.*, 2019).

#### 4.1.3.7 Moenomyciny

Moenomyciny někdy nazývané také jako bambermyciny nebo flavomyciny jsou skupina fosfoglykolipidových antibiotik, které produkují zástupci rodu *Streptomyces* (včetně *S. bambergiensis*, *S. ghanaensis*, *S. ederensis* aj.). Antibiotická účinnost je zaměřená především proti grampozitivním bakteriím a někteří zástupci této třídy se používají jako doplňky krmiva hospodářských zvířat (Zehl *et al.*, 2006, Ostash & Walker, 2010). Strukturálně charakterizované jsou Moenomyciny A, A12, C4, C3 a C1. Všechny tyto molekuly se skládají z centrální oligosacharidové části, na kterou je z jedné strany připojen fosfodiesterovou vazbou isoprenoidní alkohol (moenocinol) a glycerová kyselina a z druhé strany 2-hydroxy-5-oxo-1-cyklopenten-1-yllová skupina. Syntéza buněčné stěny je inhibována interakcí s membránově vázanými monofunkčními glykosyltransferázami a HMW-PBPs třídy A. Předpokládaný mechanismus účinku je kompetitivní inhibice v transglykosylázové doméně. Ukázalo se, že moenocinol je stěžejní pro vazbu antibiotika na cytoplasmatickou membránu a glycerová kyselina s oligosacharidem tvoří epitop, který je rozpoznáván transglykosylázou (Zehl *et al.*, 2006). Existuje několik antibiotik interagujících s transglykosylázami, avšak moenomyciny jsou doposud jediná známá, která se váží přímo na enzym nikoliv na substrát. (Zehl *et al.*, 2006, Ostash & Walker, 2010).

#### 4.1.3.8 Teixobactin

Teixobactin je novým a nadějným přírůstkem do inhibitorů syntézy buněčné stěny. Byl objeven a izolován ze vzorku půdy v roce 2015 novou kultivační technologií zvanou iChip (technologie izolačních čipů). Producentem je  $\beta$ -proteobacterium *Eleftheria terrae*. Teixobactin je depsipeptid, který se skládá z 11 aminokyselinových zbytků, které tvoří L i D izomery. Neobvyklou aminokyselinou je L-allo-enduracididin, který je součástí laktonové struktury molekuly. Teixobactin je vyjímečný tím, že vykazuje vynikající účinnost proti grampozitivním bakteriím včetně rezistentních kmenů *S. pneumoniae*, *S. aureus*,

*Enterococcus*, *M. tuberculosis* aj. a zatím se nepodařilo detekovat vůči němu rezistenci. Mechanismus účinku spočívá pravděpodobně ve vazbě na pyrofosfátovou skupinu a první cukernou podjednotku Lipidu II v poměru 2:1. Podobná struktura se vyskytuje i v prekurzoru teichoových kyselin (WTA) na něž se rovněž váže a je tedy inhibitorem i jejich syntézy. Tento dvojitý účinek způsobuje destabilizaci a degradaci buněčné stěny a je důvodem výborné baktericidní aktivity. Toto antibiotikum je, díky své neobyčejné odolnosti vůči rezistencím, příslibem do budoucna v léčbě bakteriálních infekcí (Ling et al., 2015; Guo et al., 2018).

## 5 Závěr

Biosyntéza buněčné stěny je komplexní a pro danou bakterii specifický soubor reakcí, který hraje zásadní roli v ochraně vůči vnějšímu prostředí. I přes dlouholetý a intenzivní výzkum, není řada jevů a interakcí zcela objasněna a popsána. V této práci jsem shrnula poznatky o syntéze buněčné stěny u grampozitivních bakterií. Zaměřila jsem se na syntézu PG a teichoových kselin, které jsou z hlediska účinku antibiotik nejdůležitějšími komponentami buněčné stěny. Grampozitivní bakterie se od gramnegativních liší již na úrovni modifikací oligopeptidových spojů PG, kde lze pozorovat rozdílné aminokyseliny napříč druhy. Dále velkým rozdílem je složení buněčné stěny. Kromě PG a polysacharidů obsahuje grampozitivní buněčná stěna také teichoové kyseliny a velké množství povrchových proteinů, které ovlivňují fyziologii bakterie, virulenci a hrají roli v tvorbě biofilmu. Celkový detailní model stěžejní složky buněčné stěny, peptidoglykanu, grampozitivních bakterií je stále nejasný. Teorie kabelového uspořádání není již relevantní a existuje několik dalších teorií, ale zatím žádná není podložena prokazatelnými a nevyvratitelnými důkazy o její správnosti.

O syntéze peptidoglykanu grampozitivních bakterií je mnoho známo a existuje celá řada prací. Jednotlivé reakce a jejich mechanismus jsou do značné míry popsány. Výjimkou je flipáza, která translokuje Lipid II přes cytoplasmatickou membránu. Názory na protein plnící tuto úlohu se rozcházejí a u různých bakterií existuje řada návrhů. To, co však zůstává velkou otázkou, je celkový model a synchronizace jednotlivých kroků. Syntéza peptidoglykanu není samostatný proces. Je spojená s prodlužováním, dělením a s případnou sporulací bakteriální buňky. Předpokládaný model staví na představě, že hlavní proteiny PBPs a SEDS jsou spojené do subkomplexů, které umožňují kontakt proteinů, koordinovanost celého procesu a také dodatečné úpravy a opravy případných chyb.



Antibiotika zaměřená na buněčnou stěnu bakterií jsou účinná, obsáhlá a velmi rozšířená skupina. Důvodem je, že eukaryotická buňka neobsahuje struktury podobné peptidoglykanu, teichoovým kyselinám ani proteinům a prekurzorům stojících za jeho tvorbou. Díky tomu, účinkují specificky na mikroby a jsou netoxická pro člověka. Většina uvedených antibiotik jsou biologické produkty nebo sloučeniny odvozené z biologických produktů, což znamená, že mikroorganismy jsou stále významným zdrojem nových účinných látek. Z popsaných účinků antibiotik vyplývají dva hlavní mechanismy inhibice – inhibice vazbou na enzym (analogy substrátů), která převažuje u antibiotik účinných v 1. a 2. fázi syntézy PG a inhibice vazbou na substrát, která se uplatňuje spíše ve 3. fázi. V klinické praxi nejrozšířenějšími a nejúspěšnějšími antibiotiky jsou léčiva cílená napenicilin vazebné bílkoviny, avšak nejčastější cílovou molekulou, napříč antibiotiky uvedenými v této práci, je molekula Lipid II, která je do budoucna zajímavým cílem pro vývoj nových antibakteriálních látek.

I přes množství existujících preparátů účinných na inhibici biosyntézy buněčné stěny, se většina z nich nevyužívá klinicky a jsou tedy zatím pouze možnými potenciálními prekurzory léčiv. Kvůli stoupajícímu počtu rezistencí je stále potřeba vyvíjet a zavádět do klinické praxe nová antibiotika, avšak v současnosti se paradoxně vývoj značně zpomalil. Do budoucna slibný základ tvoří například defensiny, které se svým původem liší a mají potenciál vytvořit novou skupinu účinných látek nebo teixobactin, který zatím představuje prototyp antibiotika, proti kterému se dosud neobjevila rezistence. Podrobnější charakterizace celého procesu syntézy PG je nezbytným předpokladem pro vývoj zcela nových tříd antimikrobiálních látek cílených na regulační mechanismy syntézy buněčné stěny.

## 6 Seznam použité literatury

ANDERSON, M. S., S. S. EVELAND, H. R. ONISHI, D. L. POMPLIANO. Kinetic mechanism of the Escherichia coli UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding enzyme: use of a glutathione S-transferase fusion. *Biochemistry*. 1996, **35** (50), 16264-16269.

BASSLER, Bonnie L. a Richard LOSICK. Bacterially Speaking. *Cell*. 2006, **125**(2), 237-246.

BAUM, E. Z., S. M. CRESPO-CARBONE, A. KLINGER, B. D. FOLENO, I. TURCHI, M. MACIELAG a K. BUSH. A MurF Inhibitor That Disrupts Cell Wall Biosynthesis in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, **51**(12), 4420-4426.

BEEBY, Morgan, James C. GUMBART, Benoît ROUX a Grant J. JENSEN. Architecture and assembly of the Gram-positive cell wall. *Molecular Microbiology*. 2013, **88**(4), 664-672.

BEILHARZ, K., L. NOVAKOVA, D. FADDA, P. BRANNY, O. MASSIDDA a J.-W. VEENING. Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(15), E905-E913.

BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.

BENSON, Timothy E, Christopher T WALSH a James M HOGLE. The structure of the substrate-free form of MurB, an essential enzyme for the synthesis of bacterial cell walls. *Structure*. 1996, **4**(1), 47-54.

BILLINI, Maria, Jacob BIBOY, Juliane KÜHN, Waldemar VOLLMER, Martin THANBICHLER a Josep CASADESÚS. A specialized MreB-dependent cell wall biosynthetic complex mediates the formation of stalk-specific peptidoglycan in *Caulobacter crescentus*. *PLOS Genetics*. 2019, **15**(2).

BINDA, Elisa, Flavia MARINELLI, Giorgia MARCONE, A. MALIK, H. M. KHAN, D. JONAS a P. M. HAWKEY. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics*. 2014, **3**(4), 572-594.

BISSON-FILHO, Alexandre W., Yen-Pang HSU, Georgia R. SQUYRES, et al. Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*. 2017, **355**(6326), 739-743.

BROWN, Stephanie, John P. SANTA MARIA a Suzanne WALKER. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2013, **67**(1), 313-336.

BUSH, Karen a Patricia A. BRADFORD. B-Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016, **6**(8).

CESCUTTI, Paola. Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides. *Microbial Glycobiology*. Elsevier, 2010, 2010, 93-108.

CHEN, Xiaorui, Chi-Huey WONG a Che MA. Targeting the Bacterial Transglycosylase: Antibiotic Development from a Structural Perspective. *ACS Infectious Diseases*. 2019, **5**(9), 1493-1504.

CHEN, Xiaorui, Chi-Huey WONG a Che MA. Targeting the Bacterial Transglycosylase: Antibiotic Development from a Structural Perspective. *ACS Infectious Diseases*. 2019, **5**(9), 1493-1504.

CHUNG, B. C., J. ZHAO, R. A. GILLESPIE, D.-Y. KWON, Z. GUAN, J. HONG, P. ZHOU a S.-Y. LEE. Crystal Structure of MraY, an Essential Membrane Enzyme for Bacterial Cell Wall Synthesis. *Science*. 2013, **341**(6149), 1012-1016.

CRESS, Brady F., Jacob A. ENGLAENDER, Wenqin HE, Dennis KASPER, Robert J. LINHARDT a Mattheos A. G. KOFFAS. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014, **38**(4), 660-697.

DASGUPTA, Suryasarathi a Dennis L. KASPER. *Novel Tools for Modulating Immune Responses in the Host—Polysaccharides from the Capsule of Commensal Bacteria*. Elsevier, 2010, 61-91. Advances in Immunology. ISBN 9780123813046.

DE PASCALE, Gianfranco, Adrian J. LLOYD, James A. SCHOUTEN, Andrea M. GILBEY, David I. ROPER, Christopher G. DOWSON a Timothy D. H. BUGG. Kinetic Characterization of Lipid II-Ala: Alanyl-tRNA Ligase (MurN) from *Streptococcus pneumoniae* using Semisynthetic Aminoacyl-lipid II Substrates. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, **283**(50), 34571-34579.

- DINI, Christophe. MraY Inhibitors as Novel Antibacterial Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2005, **5**(13), 1221-1236.
- DU, W., J. R. BROWN, D. R. SYLVESTER, et al. Two Active Forms of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase in Gram-Positive Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2000, **182**(15), 4146-4152.
- ECONOMOU, N. J., S. COCKLIN a P. J. LOLL. High-resolution crystal structure reveals molecular details of target recognition by bacitracin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, **110**(35), 14207-14212.
- EGAN, Alexander J. F., Robert M. CLEVERLEY, Katharina PETERS, Richard J. LEWIS a Waldemar VOLLMER. Regulation of bacterial cell wall growth. *The FEBS Journal*. 2017, **284**(6), 851-867.
- EMAMI, Kaveh, Aurelie GUYET, Yoshikazu KAWAI, Jenny DEVI, Ling J. WU, Nick ALLENBY, Richard A. DANIEL a Jeff ERRINGTON. RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nature Microbiology*. 2017, **2**(3).
- ERRINGTON, Jeff a Ling Juan WU. Cell Cycle Machinery in *Bacillus subtilis*. *Prokaryotic Cytoskeletons*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 67-101. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-3-319-53045-1.
- ERRINGTON, Jeff. Bacterial morphogenesis and the enigmatic MreB helix. *Nature Reviews Microbiology*. 2015, **13**(4), 241-248.
- ERRINGTON, Jeffery, Richard A. DANIEL a Dirk-Jan SCHEFFERS. Cytokinesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003, **67**(1), 52-65.
- FALAGAS, Matthew E., Evridiki K. VOULOUMANOU, George SAMONIS a Konstantinos Z. VARDAKAS. Fosfomycin. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016, **29**(2), 321-347.
- FALANGA, Annarita, Ersilia NIGRO, Margherita DE BIASI, et al. Cyclic Peptides as Novel Therapeutic Microbicides: Engineering of Human Defensin Mimetics. *Molecules*. 2017, **22**(7), 1680-1683.
- FORMSTONE, A., R. CARBALLIDO-LOPEZ, P. NOIROT, J. ERRINGTON a D.-J. SCHEFFERS. Localization and Interactions of Teichoic Acid Synthetic Enzymes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 2008, **190**(5), 1812-1821.
- GALARDY, R. E., PRINZ M. P. and CRAIG, L. C. Tritium-Hydrogen exchange of bacitracin A. Evidence for an intramolecular hydrogen bond. *Biochemistry*. 1971, **10**: 2429-2436.
- GAN, L., S. CHEN a G. J. JENSEN. Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(48), 18953-18957.
- GIAMARELLOU, H., F. SOBIA, A. SINGH, A. MALIK, H. M. KHAN, D. JONAS a P. M. HAWKEY. Fourth Generation Cephalosporins in the Antimicrobial Chemotherapy of Surgical Infections: A comprehensive update. *Journal of Chemotherapy*. 2013, **11**(6), 486-493.
- GOFFIN C., J. M. GHUYSEN, Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998. **62**(4):1079-93.

GOMES, Karen Machado, Rafael Silva DUARTE a Maria do Carmo DE FREIRE BASTOS. Lantibiotics produced by Actinobacteria and their potential applications (a review). *Microbiology*. 2017, **163**(2), 109-121.

GU, Yu Gui, Alan S. FLORJANCIC, Richard F. CLARK, et al. *Structure–activity relationships of novel potent MurF inhibitors*. 2004, **14**(1), 267-270.

GUO, Chuchu, Dhanaraju MANDALAPU, Xinjian JI, Jiangtao GAO a Qi ZHANG. Chemistry and Biology of Teixobactin. *Chemistry - A European Journal*. 2018, **24**(21), 5406-5422.

HÄNCHEN, Anne, Saskia RAUSCH, Benjamin LANDMANN, Luigi TOTI, Antje NUSSER a Roderich D. SÜSSMUTH. Alanine Scan of the Peptide Antibiotic Feglymycin: Assessment of Amino Acid Side Chains Contributing to Antimicrobial Activity. *ChemBioChem*. 2013, **14**(5), 625-632.

HANSON, Brett R a Melody N NEELY. Coordinate regulation of Gram-positive cell surface components. *Current Opinion in Microbiology*. 2012, **15**(2), 204-210.

HARDT, Patrick, Ina ENGELS, Marvin RAUSCH, et al. The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017, **307**(1), 1-10.

HASHIZUME, Hideki a Yoshio NISHIMURA. Cyclic Lipopeptide Antibiotics. *Bioactive Natural Products (Part O)*. Elsevier, 2008, 693-751. Studies in Natural Products Chemistry. ISBN 9780444531810.

HAYHURST, E. J., L. KAILAS, J. K. HOBBS a S. J. FOSTER. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(38), 14603-14608.

HE, Haiyin, Bo SHEN, Peter J. PETERSEN, et al. Mannopectimycin esters and carbonates, potent antibiotic agents against drug-resistant bacteria. 2004, **14**(1), 279-282.

HEIJENOORT, Jean van. Biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbial Glycobiology*. Elsevier, 2010, 285-304.

HELM, Jeremiah S., Lan CHEN, Suzanne WALKER, Xiang-Yang YE a Suzanne WALKER. Rethinking Ramoplanin: The Role of Substrate Binding in Inhibition of Peptidoglycan Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, **124**(47), 13970-13971.

HRAST, Martina, Izidor SOSIČ, Roman ŠINK a Stanislav GOBEC. Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F. *Bioorganic Chemistry*. 2014, **55**, 2-15.

HSU, Shang-Te D, Eefjan BREUKINK, Eugene TISCHENKO, Mandy A G LUTTERS, Ben DE KRUIJFF, Robert KAPTEIN, Alexandre M J J BONVIN a Nico A J VAN NULAND. *The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics*. 2004, **11**(10), 963-967.

HU, Yanan, Jeremiah S. HELM, Lan CHEN, Xiang-Yang YE a Suzanne WALKER. Ramoplanin Inhibits Bacterial Transglycosylases by Binding as a Dimer to Lipid II. *Journal of the American Chemical Society*. 2003, **125**(29), 8736-8737.

HUMLJAN, Jan, Miha KOTNIK, Carlos CONTRERAS-MARTEL, Didier BLANOT, Uroš URLEB, Andréa DESSEN, Tom ŠOLMAJER a Stanislav GOBEC. Novel Naphthalene- N -sulfonyl- d -glutamic Acid Derivatives as Inhibitors of MurD, a Key Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008, **51**(23), 7486-7494.

JAMES, Robert C., Joshua G. PIERCE, Akinori OKANO, Jian XIE, Dale L. BOGER, D. JONAS a P. M. HAWKEY. Redesign of Glycopeptide Antibiotics: Back to the Future. *ACS Chemical Biology*. 2012, **7**(5), 797-804.

JONES, Laura J.F., Rut CARBALLIDO-LÓPEZ a Jeffery ERRINGTON. Control of Cell Shape in Bacteria. *Cell*. 2001, **104**(6), 913-922.

LECERCLÉ, Delphine, Anthony CLOUET, Bayan AL-DABBAGH, Muriel CROUVOISIER, Ahmed BOUHSS, Christine GRAVIER-PELLETIER a Yves LE MERRER. *Bacterial transferase MraY inhibitors: Synthesis and biological evaluation*. 2010, **18**(12), 4560-4569.

LETEK, Michal, María FIUZA, Efrén ORDÓÑEZ, Almudena F. VILLADANGOS, Astrid RAMOS, Luís M. MATEOS a José A. GIL. Cell growth and cell division in the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008, **94**(1), 99-109.

LING, Losee L., Tanja SCHNEIDER, Aaron J. PEOPLES, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015, **517**(7535), 455-459.

LLOYD, Adrian J., Andrea M. GILBEY, Anne M. BLEWETT, et al. Characterization of tRNA-dependent Peptide Bond Formation by MurM in the Synthesis of *Streptococcus pneumoniae* Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, **283**(10), 6402-6417.

LOVERING, Andrew L., Susan S. SAFADI a Natalie C. J. STRYNADKA. Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annual Review of Biochemistry*. 2012, **81**(1), 451-478.

MAESTRO, Beatriz, Linda NOVAKOVÁ, Dusan HESEK, Mijoon LEE, Eduardo LEYVA, Shahriar MOBASHERY, Jesús M. SANZ a Pavel BRANNY. Recognition of peptidoglycan and  $\beta$ -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Letters*. 2011, **585**(2), 357-363.

MAGNET, Sophie, Ana ARBELOA, Jean-Luc MAINARDI, et al. Specificity of L,D-Transpeptidases from Gram-positive Bacteria Producing Different Peptidoglycan Chemotypes. *Journal of Biological Chemistry*. 2007b, **282**(18), 13151-13159.

MAGNET, Sophie, Samuel BELLAIS, Lionel DUBOST, et al. Identification of the L,d-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. 2007a, **189**(10), 3927-3931.

MARSHALL, William F. a Janis E. BLAIR. The Cephalosporins. *Mayo Clinic Proceedings*. 1999, **74**(2), 187-195.

MEESKE, Alexander J., Eammon P. RILEY, William P. ROBINS, et al. SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature*. 2016, **537**(7622), 634-638.

MEROUEH, S. O., K. Z. BENCZE, D. HESEK, M. LEE, J. F. FISHER, T. L. STEMMLER a S. MOBASHERY. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(12), 4404-4409.

MING, Li-June a Jon D. EPPERSON. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2002, **91**(1), 46-58.

MISTOU, Michel-Yves, Iain C. SUTCLIFFE, Nina M. VAN SORGE a Wilbert BITTER. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016, **40**(4), 464-479.

MOHAMMADI, Tamimount, Vincent VAN DAM, Robert SIJBRANDI, et al. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO Journal*. 2011, **30**(8), 1425-1432.

NOVÁKOVÁ, Linda, Silvia BEZOUŠKOVÁ, Petr POMPACH, Petra ŠPIDLOVÁ, Lenka SASKOVÁ, Jaroslav WEISER a Pavel BRANNY. Identification of Multiple Substrates of the StkP Ser/Thr Protein Kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 2010, **192**(14), 3629-3638.

NOVÁKOVÁ, Linda, Lenka SASKOVÁ, Petra PALLOVÁ, et al. Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS Journal*. 2005, **272**(5), 1243-1254.

OLIVIER, Kevin S., Michael S. VAN NIEUWENHZE, A. SEVERIN, et al. Synthetic Studies toward the Mannopeptimycins: Synthesis of Orthogonally Protected  $\beta$ -Hydroxyenduracididines. *Organic Letters*. 2010, **12**(8), 1680-1683.

OSTASH, Bohdan a Suzanne WALKER. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, and biological activity. *Natural Product Reports*. 2010, **27**(11).

PAZOS, Manuel a Katharina PETERS. Peptidoglycan. *Bacterial Cell Walls and Membranes*. Cham: Springer International Publishing, 2019, 127-168. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-3-030-18767-5.

PAZOS, Manuel, Katharina PETERS a Waldemar VOLLMER. Robust peptidoglycan growth by dynamic and variable multi-protein complexes. *Current Opinion in Microbiology*. 2017, **36**, 55-61.

PETKOWSKI, Janusz, William BAINS, Sara SEAGER a Stanislav GOBEC. Natural Products Containing 'Rare' Organophosphorus Functional Groups: L-Lysine Ligase (MurE). *Molecules*. 2019, **24**(5), 127-134.

PROSSER, Gareth A. a Luiz Pedro S. CARVALHO. Kinetic mechanism and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* d-alanine: d-alanine ligase by the antibiotic d-cycloserine. *The FEBS Journal*. 2013, **280**(4), 1150-1166.

RAUSCH, Saskia, Anne HÄNCHEN, Alexander DENISIUK, Marius LÖHKEN, Tanja SCHNEIDER a Roderich D. SÜSSMUTH. Feglymycin is an Inhibitor of the Enzymes MurA and MurC of the Peptidoglycan Biosynthesis Pathway. *ChemBioChem*. 2011, **12**(8), 1171-1173.

REA M. C., R. P. ROSS, P. D. COTTER, C. HILL. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In: Drider D and Rebuffat R. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. 2011, 29-74.

ROHDE, Manfred. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology Spectrum*. 2019, **7**(3).

RUZIN, A., G. SINGH, A. SEVERIN, et al. Mechanism of Action of the Mannopeptimycins, a Novel Class of Glycopeptide Antibiotics Active against Vancomycin-Resistant Gram-Positive Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, **48**(3), 728-738.

SARKAR, Paramita, Venkateswarlu YARLAGADDA, Chandradhish GHOSH a Jayanta HALDAR. A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *MedChemComm*. 2017, **8**(3), 516-533.

SAUVAGE, Eric, Frédéric KERFF, Mohammed TERRAK, Juan A. AYALA a Paulette CHARLIER. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, **32**(2), 234-258.

- SCHNEIDER, T., T. KRUSE, R. WIMMER, et al. Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science*. 2010, **328**(5982), 1168-1172.
- SEWELL, Edward WC a Eric D BROWN. Taking aim at wall teichoic acid synthesis: new biology and new leads for antibiotics. *The Journal of Antibiotics*. 2014, **67**(1), 43-51.
- SHAH, Ishita M., Maria-Halima LAABERKI, David L. POPHAM a Jonathan DWORKIN. A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. *Cell*. 2008, **135**(3), 486-496.
- SHAHID, M., F. SOBIA, A. SINGH, A. MALIK, H. M. KHAN, D. JONAS a P. M. HAWKEY. Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: A comprehensive update. *Critical Reviews in Microbiology*. 2009, **35**(2), 81-108.
- SHAM, L.-T., E. K. BUTLER, M. D. LEBAR, D. KAHNE, T. G. BERNHARDT a N. RUIZ. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science*. 2014, **345**(6193), 220-222.
- SHIRAIISHI, Tsukasa, Shinichi YOKOTA, Satoru FUKIYA a Atsushi YOKOTA. Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2016, **35**(4), 147-161.
- SIEGEL, Sara D, Jun LIU a Hung TON-THAT. Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope. *Current Opinion in Microbiology*. 2016, **34**, 31-37.
- SIMČIČ, Mihael, Izidor SOSIČ, Milan HODOŠČEK, Hélène BARRETEAU, Didier BLANOT, Stanislav GOBEC, Simona Golič GRDADOLNIK a Ramón CAMPOS-OLIVAS. The Binding Mode of Second-Generation Sulfonamide Inhibitors of MurD: Clues for Rational Design of Potent MurD Inhibitors. *PLoS ONE*. 2012, **7**(12).
- SPÍŽEK, Jaroslav. *Boj s rezistencí na antibiotika*. 1. Praha: Středisko společných činností AV ČR, 2016. ISBN 978-80-200-2631-6.
- STOCK, Ann M., Victoria L. ROBINSON a Paul N. GOUDREAU. Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 2000, **69**(1), 183-215.
- STONE K. J., J. L. STROMINGER. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971, **68**(12): 3223–3227.
- ŠTRANCAR, Katja, Audrey BONIFACE, Didier BLANOT a Stanislav GOBEC. Phosphinate Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamate: L-Lysine Ligase (MurE). *Archiv der Pharmazie*. 2007, **340**(3), 127-134.
- STRAUME, Daniel, Gro Anita STAMSÅS, Kari Helene BERG, Zhian SALEHIAN a Leiv Sigve HÅVARSTEIN. Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b). *Molecular Microbiology*. 2017, **103**(1), 99-116.
- STRAUME, Daniel, Katarzyna Wiaroslawa PIECHOWIAK, Silje OLSEN, et al. Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal cell wall. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020, **117**(11), 6129-6138.
- SUPURAN, Claudiu. Special Issue: Sulfonamides. *Molecules*. 2017, **22**(10).

- TIPPER, D. J. a J. L. STROMINGER. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1965, **54**(4), 1133-1141.
- TSANG, Mary-Jane a Thomas G BERNHARDT. Guiding divisome assembly and controlling its activity. *Current Opinion in Microbiology*. 2015, **24**, 60-65.
- VAN DEN BRINK-VAN DER LAAN, E., J.-W. P. BOOTS, R. E. J. SPELBRINK, G. M. KOOL, E. BREUKINK, J. A. KILLIAN a B. DE KRUIJFF. Membrane Interaction of the Glycosyltransferase MurG: a Special Role for Cardiolipin. *Journal of Bacteriology*. 2003, **185**(13), 3773-3779.
- VAN DER ES, Daan, Francesca BERNI, Wouter F. J. HOGENDORF, et al. Streamlined Synthesis and Evaluation of Teichoic Acid Fragments. *Chemistry - A European Journal*. 2018, **24**(16), 4014-4018.
- VERMA, Amit a Shailendra K. SARAF. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008, **43**(5), 897-905.
- VOLLMER, Waldemar, Didier BLANOT a Miguel A. DE PEDRO. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, **32**(2), 149-167.
- VOLLMER, Waldemar. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, **32**(2), 287-306.
- WALSH, A. W., FALK, P., THANASSI, J. A., DISCOTTO, L. F., PUCCI, M. J., & HO, H. T. Comparison of the D-glutamate-adding enzymes from selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 1999, **181**(17), 5395-401.
- YOSHIMURA T., M. ASHIUCHI, N. ESAKI, C. KOBATAKE, S.Y. Choi & K. SODA. Expression of glr (murI, dga) gene encoding glutamate racemase in Escherichia coli. *J Biol Chem*. 1993, **268**(32) 24242-24246.
- ZAPUN, André, Thierry VERNET a Mariana G. PINHO. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, **32**(2), 345-360.
- ZEHL, Martin, Ernst PITTENAUER, Andreas RIZZI a Guenter ALLMAIER. Characterization of moenomycin antibiotic complex by multistage MALDI-IT/RTOF-MS and ESI-IT-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006, **17**(8), 1081-1090.
- ZHAO, Heng, Vaidehi PATEL, John D. HELMANN a Tobias DÖRR. Don't let sleeping dogmas lie: new views of peptidoglycan synthesis and its regulation. *Molecular Microbiology*. 2017, **106**(6), 847-860.
- ZHU, Ziyu, Leonie SCHNELL, Bastian MÜLLER, Martin MÜLLER, Panagiotis PAPATHEODOROU a Holger BARTH. The Antibiotic Bacitracin Protects Human Intestinal Epithelial Cells and Stem Cell-Derived Intestinal Organoids from Clostridium difficile Toxin TcdB. *Stem Cells International*. 2019, 1-8.