

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

GENETICKÁ CHARAKTERIZACE TETRACYKLINOVÉ  
REZISTENCE U VYBRANÝCH PŮDNÍCH IZOLÁTŮ  
BAKTERIÍ

—

GENETIC CHARACTERIZATION OF TETRACYCLINE  
RESISTANCE IN SELECTED SOIL ISOLATES  
OF BACTERIA

Tereza Hucková

PRAHA 2010

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE:

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce, pouze s použitím citované literatury.

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Ireně Liché, CSc. za její vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala v průběhu celé doby vzniku mé diplomové práce.

Děkuji RNDr. Daně Elhottové, PhD. a kolegům z Ústavu půdní biologie v Českých Budějovicích za poskytnutí půdních izolátů, postupů, materiálů a výbornou spolupráci. Můj velký dík patří i Mgr. Jaroslavu Nunvářovi za jeho odborné rady, připomínky a velmi příjemnou společnost po celou dobu studia a psaní této práce.

Děkuji celému kolektivu laboratoře 101 za přátelskou pracovní atmosféru a naší laborantce Lucii za vytvoření skvělého zázemí a stále dobré nálady.

Děkuji Ing. Miroslavu Petříčkovi, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR za rady a zapůjčení pulzní elektroforézy.

Děkuji RNDr. Martinu Pospíškovi, CSc. a kolektivu laboratoře biochemie RNA za možnost využívat PCR cyclery.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a sestře za všestrannou podporu během studia a svému manželovi za trpělivost, pochopení a láskyplnou podporu během mého studia i psaní této práce.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2007-2010 a byla financována z Centra environmentální mikrobiologie LC06066 MŠMT ČR.

# GENETICKÁ CHARAKTERIZACE TETRACYKLINOVÉ REZISTENCE U VYBRANÝCH PŮDNÍCH IZOLÁTŮ BAKTERIÍ

## Abstrakt

Rezistence k antibiotikům se stále více rozšiřuje mezi bakteriálními mikroorganismy. Abychom byli schopní na tuto situaci reagovat, je nutné podrobně porozumět všem mechanismům rezistence a možnosti rozšiřování genů rezistence v prostředí.

V této práci jsme se pokusili identifikovat determinantu rezistence k tetracyklinu u vybraných půdních izolátů grampozitivních i gramnegativních bakterií. Tyto izoláty pocházejí z půdy nehnojené a půdy, která byla hnojena mrvou kontaminovanou tetracyklinem.

U izolátů jsme testovali přítomnost dvaceti třech vybraných determinant rezistence k tetracyklinu a přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu v knihovně DNA. U izolátů rodu *Staphylococcus* jsme identifikovali determinantu rezistence *tet(K)*. U izolátu rodu *Arthrobacter* byl amplifikován fragment DNA primery pro *tet(M)* determinantu, její přítomnost však nebyla potvrzena sekvenčně. U izolátů rodů *Chryseobacterium* a *Stenotrophomonas* nebyla přítomna žádná z testovaných determinant rezistence k tetracyklinu. Podařilo se však prokázat probíhající horizontální přenos genů mezi rody *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* a u rodu *Chryseobacterium* byly identifikovány geny kódující hybridní protein a efluxní pumpu *SmeW*, oba specifické pro rod *Stenotrophomonas*. Spojení hybridního proteinu a rezistence k tetracyklinu nebylo v této studii prokázáno. Gen hybridního proteinu je pravděpodobně součástí mobilního elementu, jehož přenos byl prokázán konjugativní reakcí v laboratorních podmínkách.

## Klíčová slova:

tetracyklin, rezistence, MDR pumpy, horizontální přenos genů, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus* sp., *Chryseobacterium* sp., *Arthrobacter* sp.

## GENETIC CHARACTERIZATION OF TETRACYCLINE RESISTANCE IN SELECTED SOIL ISOLATES OF BACTERIA

### Abstract

Antibiotic resistance is becoming increasingly widespread among bacterial organisms. To respond to the situation it is necessary to understand in detail all the mechanisms of resistance as well as expansion possibilities of resistance genes in the environment. In this study we attempted to identify tetracycline resistance determinants in selected soil gram-positive and gram-negative isolates. The isolates originate from unfertilized soil and from soil fertilized with tetracycline-contaminated manure. We tested the soil isolates for the presence of twenty three selected tetracycline resistance determinants and presence of tetracycline resistance determinants in DNA libraries.

We identified one of the tetracycline resistance determinants *tet(K)* in *Staphylococcus* sp. A DNA fragment was amplified with primers for *tet(M)* determinant in *Arthrobacter* sp., but its presence was not confirmed by the sequence analysis. None of the tested tetracycline resistance determinants were present in the genera *Chryseobacterium* and *Stenotrophomonas*. However, we managed to prove the ongoing horizontal gene transfer between the genus *Stenotrophomonas* and the genus *Chryseobacterium*. The transferred sequences encoded hybrid protein and efflux pump SmeW, both of them specific for genus *Stenotrophomonas*. Association of hybrid protein with resistance to tetracycline was not demonstrated in this study. The gene encoded hybrid protein is probably a component of a mobile element, whose transfer was confirmed by conjugation reaction under laboratory conditions.

### Keywords:

tetracycline, resistance, MDR pumps, horizontal gene transfer, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus* sp., *Chryseobacterium* sp., *Arthrobacter* sp.

# OBSAH

## SEZNAM ZKRATEK

<b>1. ÚVOD</b> .....	12
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	13
<b>2.1 Tetracyklin</b> .....	13
2.1.1 Mechanismus účinku .....	14
2.1.1.1 Struktura tetracyklinu.....	14
2.1.1.2 Vstup do cytoplazmy .....	15
2.1.1.3 Interakce s ribozomem.....	15
2.1.2 Mechanismus rezistence .....	16
2.1.2.1 Snížení intracelulární koncentrace tetracyklinu.....	17
2.1.2.2 Ochrana ribozomů.....	18
2.1.2.3 Enzymatická inaktivace .....	21
2.1.2.4 Mutace 16S rRNA.....	21
<b>2.2 Antibiotika a rezistence v půdních ekosystémech</b> .....	22
2.2.1 Vývoj a rozšiřování rezistence k antibiotikům.....	22
2.2.1.1 Rozšiřování determinant rezistence HGT .....	24
2.2.2 Transportní proteiny.....	24
2.2.2.1 Transportéry nadrodiny ABC.....	25
2.2.2.2 Transportéry nadrodiny MF .....	27
2.2.2.1.1 Rodina s 12 TMS .....	28
2.2.2.1.2 Rodina se 14 TMS.....	28
2.2.2.3 Transportéry rodiny RND .....	29
2.2.2.3.1 Podrodina Hae1 .....	31
2.2.2.3.2 Podrodina Hae2.....	32
2.2.2.4 Transportéry rodiny SMR .....	32
2.2.2.5 Transportéry rodiny MATE .....	33
<b>2.3 Rezistence k antibiotikům u gramnegativních bakterií</b> .....	35
2.3.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	35
2.3.1.1 Rezistence u <i>S. maltophilia</i> .....	36
2.3.1.1.1 SmeDEF .....	37
2.3.1.1.2 SmeABC .....	38
2.3.1.1.3 SmeK, SmeZ, SmeJ .....	38
2.3.2 <i>Chryseobacterium</i> sp.....	39

2.3.2.1	Rezistence u <i>Chryseobacterium</i> sp.	39
<b>2.4</b>	<b>Rezistence k antibiotikům u grampozitivních bakterií</b>	<b>40</b>
2.4.1	<i>Arthrobacter</i> sp.	40
2.4.1.1	Rezistence u <i>Arthrobacter</i> sp.	40
2.4.2	<i>Staphylococcus</i> sp.	41
2.4.2.1	Rezistence u <i>Staphylococcus</i> sp.	41
2.4.2.1.1	QacA a QacB	42
2.4.2.1.2	NorA	42
2.4.2.1.3	Tet(K) a Tet(L)	42
2.4.2.1.4	Tet(38)	43
<b>3.</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiál</b>	<b>44</b>
3.1.1	Bakteriální kmeny	44
3.1.2	Plazmidy	46
3.1.3	Primery pro PCR	47
3.1.4	Enzymy a protilátky	50
3.1.5	Standardy molekulových hmotností DNA	50
3.1.6	Komerční sady	51
3.1.7	Antibiotika	51
3.1.8	Chemikálie	52
3.1.9	Kultivační media	53
3.1.9.1	Komplexní media	54
3.1.10	Roztoky	54
3.1.10.1	Te pufr	54
3.1.10.2	Roztoky pro horizontální gelovou elektroforézu	55
3.1.10.3	Roztoky pro pulzní elektroforézu	55
3.1.10.4	Roztoky pro izolaci plazmidové DNA	56
3.1.10.5	Roztoky pro Southern blotting	56
3.1.10.6	Roztoky pro hybridizaci	57
3.1.10.7	Roztoky pro chromogenní detekci	58
3.1.10.8	Roztok sephadex pro gelovou filtraci	59
3.1.11	Internetové databáze a programy	59
3.1.12	Přístroje a laboratorní vybavení	60
<b>3.2</b>	<b>Metodika</b>	<b>61</b>
3.2.1	Práce s bakteriální kulturou	61
3.2.1.1	Kultivace na pevném mediu	61



3.2.1.2 Kultivace v tekutém mediu .....	61
3.2.1.3 Uchovávání bakteriálních kmenů.....	61
3.2.1.4 Razítkování kolonií.....	61
3.2.1.5 E-test (AB bioMérieux) .....	62
3.2.1.6 Agarová diluční metoda.....	62
3.2.1.7 Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> .....	62
3.2.1.8 Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> .....	63
3.2.2 Práce s bakteriální DNA .....	63
3.2.2.1 Izolace DNA .....	63
3.2.2.2 Vytváření lyzátů z bakteriálních buněk.....	64
3.2.2.3 Izolace plazmidové DNA.....	64
3.2.2.4 Čištění vzorku DNA gelovou filtrací.....	64
3.2.2.5 Precipitace DNA chloridem lithným a ethanolem .....	65
3.2.2.6 Horizontální agarózová elektroforéza.....	65
3.2.2.7 Pulzní elektroforéza .....	65
3.2.2.8 Konjugace na pevném médiu.....	66
3.2.2.9 Štěpení DNA restrikčními enzymy .....	67
3.2.2.10 Ligace.....	67
3.2.2.11 Knihovna DNA .....	68
3.2.2.12 Southern blotting.....	68
3.2.2.13 Neradioaktivní značení DNA sondy .....	69
3.2.2.13.1 Random primed.....	69
3.2.2.13.2 Značení DNA sondy pomocí polymerázové řetězové reakce .....	70
3.2.2.14 Kvantitativní vyhodnocení značení DNA .....	71
3.2.2.15 Hybridizace .....	71
3.2.2.16 Chromogenní detekce .....	72
3.2.2.17 Odstranění navázané sondy z membrány .....	72
3.2.2.18 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	73
3.2.2.19 Sekvenování .....	74
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>75</b>
4.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace tetracyklinu u půdních izolátů.....	75
4.1.1 E-test .....	75
4.1.2 Agarová diluční metoda.....	76
4.2 Stanovení citlivosti půdních izolátů k dalším antibiotikům.....	77
4.3 Identifikace determinant rezistence k tetracyklinu .....	82
4.3.1 Izolace plazmidové DNA.....	82

4.3.2 Analýza přítomnosti determinanty rezistence metodou PCR .....	83
4.3.2.1 Přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu u rodů <i>Stenotrophomonas</i> a <i>Chryseobacterium</i> .....	86
4.3.2.2 Přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu u rodu <i>Staphylococcus</i> .....	89
4.3.2.3 Přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu u rodu <i>Arthrobacter</i> .....	91
4.4 Identifikace determinanty rezistence k tetracyklinu v knihovně DNA .....	92
4.5 Lokalizace a počet kopií hybridní kinázy v genomu půdních izolátů.....	94
4.6 Specifikace identifikované hybridní kinázy .....	98
4.7 Horizontální přenos determinanty rezistence k tetracyklinu .....	102
4.8 Přítomnost známých efluxních pump rodu <i>Stenotrophomonas</i> u půdních izolátů .....	104
4.9 Typizace <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	107
<b>5. DISKUZE</b> .....	109
<b>6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b> .....	122

## SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BSA	hovězí sérový albumin
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté kationty
CMT	chemicky modifikovaný tetracyklin
CSLI	Clinical Laboratory Standards Institute
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
Dig	digoxigenin
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifostáty
EF-G	elongační faktor G
EF-Tu	elongační faktor Tu
GTP	guanosin trifosfát
HCl	kyselina chlorovodíková
HGT	horizontální přenos genů
HS	hmotnostní standard
kDa	kilodalton
LiCl	chlorid lithný
MATE	multidrug and toxic compound extrusion
MDR	multidrug resistant
MF	major facilitator
Mg <sup>2+</sup>	hořečnaté kationty
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NBT	2,2-bis(4-nitrophenyl)-5,5-diphenyl-3,3-(3,3-dimethoxy-4,4-diphenylene) ditetrazolium chloride
OmpF, OmpC	outer membrane protein F, C
PCR	polymerázová řetězová reakce
pH	vodíkový exponent
RND	resistance nodulation division
RPP	ribozomální ochranný protein
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SMR	small multidrug resistance
SSSS	sodium/solut symporters superfamily
Tc	tetracyklin
TMS	transmembránový úsek
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

# 1. ÚVOD

Antibiotika jsou v léčbě některých onemocnění nenahraditelná, proto je rezistence k antibiotikům závažným problémem. V současnosti existuje stále snaha vytvářet nové deriváty antibiotik, které by byly schopné obcházet rozšířené mechanismy rezistence. Je tedy velmi důležité těmto mechanismům porozumět a studovat možnosti rozšiřování genů rezistence v různých ekosystémech a mezi různými druhy bakterií.

Tetracykliny patří i dnes mezi velmi důležitá antibiotika. Jejich využívání v hospodářských chovech vede k jejich zanášení do půdy a vytváření selekčního tlaku na mikroorganismy. To má za následek šíření determinant rezistence a vzhledem k provázanosti s dalšími ekosystémy i rozšiřování těchto determinant až do klinického prostředí.

V této práci se snažíme identifikovat genetické determinanty rezistence k tetracyklinu u půdních bakterií izolovaných z hnojené a nehnojené luční půdy ze stejné lokality v České Republice, z nichž některé patří k oportunním patogenům člověka. Tato práce je první genetickou charakterizací bakteriální rezistence půdních izolátů k tetracyklinu v České republice.

Hlavními cíly této diplomové práce jsou:

1. Skenovat půdní izoláty z hnojené a nehnojené půdy na přítomnost známých determinant rezistence k tetracyklinu.
2. Vysledovat případné šíření determinant rezistence mezi jednotlivými bakteriálními druhy.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 TETRACYKLIN

Tetracykliny (Tc) jsou širokospektrá antibiotika objevená v roce 1948 jako fermentační produkt *Streptomyces aureofaciens* (STEPHENS *et al.* 1954). Vzhledem k tomu, že tato antibiotika mají málo vedlejších nežádoucích účinků, jejich výroba je levná a nenáročná, začaly se terapeuticky využívat již na začátku padesátých let. Účinkují proti grampozitivním i gramnegativní bakteriím, intracelulárním a protozoálním parazitům i neinfekčním onemocněním (CHOPRA a ROBERTS 2001). V současnosti je diskutována schopnost tetracyklinů inhibovat matrixové metaloproteinázy, tj. skupinu proteolytických enzymů, a angiogenezi (NIP *et al.* 1993). Tyto účinky by mohly být využity při léčbě rakovinového bujení (DUIVENVOORDEN *et al.* 1997, SAPADIN a FLEISCHMAJER 2006). Dále byla prokázána interakce tetracyklinů s priony a jejich následná degradace proteázami. Tato schopnost by mohla být využita při léčbě neurodegenerativních onemocněních (FORLONI *et al.* 2002).

Tetracykliny lze rozdělit do třech základních skupin. První skupinu tvoří původní tetracykliny, kam se řadí tetracyklin, chlortetracyklin, který byl purifikován a chemicky definován jako první v roce 1948 Duggarem, a oxytetracyklin, objevený v roce 1950 (FINLAY *et al.* 1950, STEPHENS *et al.* 1954, NELSON 1998). Druhou skupinou jsou semisyntetické tetracykliny, upravené tetracykliny první skupiny, kam se řadí doxycyklin, minocyklin a metacyklin. Doxycyklin a minocyklin se v současnosti využívají při léčbě akné (HAIDER a SHAW 2004). V porovnání s tetracykliny první skupiny jsou až pětikrát více lipofilní. Třetí skupinou jsou chemicky modifikované tetracykliny (CMT, chemically modified tetracyclines), které nevykazují antimikrobiální účinky (STEPHENS *et al.* 1954, GOLUB *et al.* 1992, GOLUB *et al.* 1998). Do této skupiny patří například CMT-3, u kterého byla prokázána schopnost inhibice vzniku tumorů a metastáz pomocí již zmíněné inhibice matrixové metaloproteinázy (LOKESHWAR *et al.* 2002, ZAKERI a WRIGHT 2008).

### 2.1.1 MECHANIZMUS ÚČINKU

Podle mechanismu účinku lze tetracykliny rozdělit na typické a atypické.

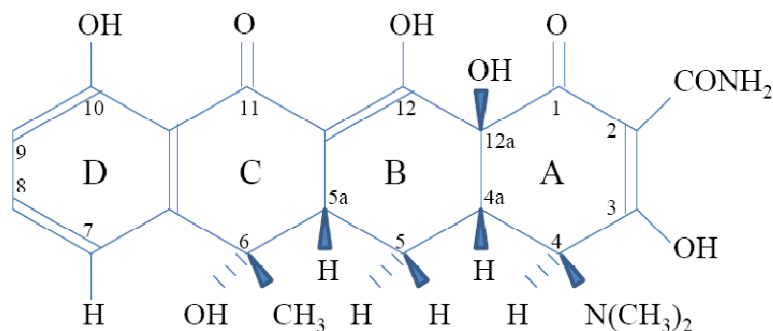
Účinek typických tetracyklinů, například tetracyklinu, minocyklinu a chlortetracyklinu, spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na 30S podjednotku ribozomu (CHOPRA 1985, RASMUSSEN *et al.* 1991).

Atypické tetracykliny, kam lze zařadit chelokardin, anhydrotetracyklin, 6-thiatetracyklin, anhydrochlortetracyklin a 4-epi-anhydrochlortetracyklin, se vyznačují baktericidním účinkem (OLIVA *et al.* 1992, CHOPRA 1994). Tento účinek je pravděpodobně spojený s rozrušením cytoplazmatické membrány a lyzí buňky (RASMUSSEN *et al.* 1991, OLIVA *et al.* 1992). Při studiu jejich vlivu na proteosyntézu bylo naznačeno, že se pravděpodobně nevážou na vazebná místa na 30S podjednotce typická pro tetracyklin (RASMUSSEN *et al.* 1991). Z hlediska terapeutického využití je u atypických tetracyklinů problémem výskyt závažných vedlejších účinků, které jsou spojené s možnou interakcí s membránou savčích buněk (CHOPRA 1994).

#### 2.1.1.1 Struktura tetracyklinu

Tetracykliny patří mezi polyketidy. Jsou tvořeny tetracyklem – DCBA kruhem – s různými funkčními skupinami a substituenty a unikátní 3D strukturou. Tetracykliny lze na různých pozicích chemicky modifikovat. Tato možnost je využívána při vytváření nových derivátů. Substituce se mohou vyskytovat na pozici od C4 směrem k C7, a na pozici C4 může docházet k reverzibilní epimerizaci. Dimethylaminová skupina na pozici C4 je také důležitou skupinou pro bioaktivitu. Pozice C1 a C10-C12 jsou na substituce velmi citlivé. (NELSON 1998, HALLING-SORENSEN *et al.* 2002, THAKER *et al.* 2010) (**Obr. 1**). V extracelulárním prostoru se na různé pozice molekuly tetracyklinu vážou kationty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (pozice C11, C12), zatímco v intracelulárním prostoru převažuje vazba  $\text{Mg}^{2+}$  (OHYAMA a COWAN 1995).

Tetracykliny jsou amfoterní molekuly, které se vyskytují ve dvou formách, jako lipofilní nebo hydrofilní. Lipofilní forma je důležitá při přechodu do buňky, zatímco hydrofilní forma je nutná pro vazbu na ribozom (HUGHES *et al.* 1979, RASMUSSEN *et al.* 1991, NOVAK-PEKLI *et al.* 1996).



**Obr. 1: Chemická struktura tetracyklinu.** Podle (HALLING-SORENSEN *et al.* 2002).

### 2.1.1.2 Vstup do cytoplazmy

Aby mohlo dojít k interakci tetracyklinu s ribozomem, musí tetracyklin u grampozitivních i gramnegativních bakterií překonat membránu. Jak bylo zjištěno, tetracyklin se v médiu vyskytuje převážně v nabitě formě – v komplexu s  $Mg^{2+}$  (Tc- $Mg^{2+}$ ) respektive  $Ca^{2+}$ . V této formě může proniknout přes vnější membránu porinovými kanály (např. OmpF a OmpC u enterobakterií), které preferují kationty, a dochází k jeho akumulaci v periplazmě. Průchodu poriny napomáhá Donnanův potenciál, který vzniká u membrán propustných pouze pro určité ionty. V periplazmě dochází k disociaci komplexu Tc- $Mg^{2+}$ , a lipofilní molekula tetracyklinu poháněná protonmotivní silou difunduje přes vnitřní membránu do cytoplazmy (CHOPRA *et al.* 1992, NIKAIDO a THANASSI 1993, THANASSI *et al.* 1995, NIKAIDO 2003). V cytoplazmě následně dochází, díky vyššímu pH a vyšší koncentraci  $Mg^{2+}$  v porovnání s extracelulárním prostorem, znovu k vytvoření komplexu s  $Mg^{2+}$ , jehož přítomnost je nutná pro interakci s ribozomem (SCHNAPPINGER a HILLEN 1996).

U grampozitivních bakterií tetracyklin pravděpodobně v nenabitě lipofilní formě prostupuje membránou procesem, který je závislý na energii (NIKAIIDO a THANASSI 1993, SCHNAPPINGER a HILLEN 1996).

### 2.1.1.3 Interakce s ribozomem

Tetracyklin se po vstupu do buňky váže reverzibilně na 30S podjednotku ribozomu a dochází k inhibici translace. Tento proces a identifikace vazebných míst byl studován několika skupinami rentgenovou strukturní analýzou. BRODERSEN *et al.* (2000)

u *Thermus thermophilus* identifikovali dvě vazebná místa, primární a sekundární, na 30S podjednotce ve funkčně důležitých místech. Z jejich modelu vyplývá, že tetracyklin nebrání vazbě ternárního komplexu, ale následně dochází ke srážce aminoacylované tRNA s tetracyklinem v A místě. V další studii *T. thermophilus* PIOLETTI *et al.* (2001) identifikovali 6 možných vazebných míst, Tet-1 vazebné místo v podobné pozici jako BRODERSEN *et al.* (2000) jako místo primární a Tet-5 jako místo sekundární. Na základě tohoto modelu byla vyslovena hypotéza, že všechna tato vazebná místa působí součinně a podílejí se na inhibici translace (PIOLETTI *et al.* 2001). Tato možnost byla v roce 2008 ověřena simulací molekulární dynamiky 30S podjednotky

a porovnáním primárního (Tet-1) a sekundárního (Tet-5) vazebné místo z hlediska volné vazebné energie. Z těchto výsledků vyplývá, že Tet-1 je dominantní vazebné místo pro tetracyklin a alosterické spřažení mezi vazebnými místy není pro funkci tetracyklinu důležité (ALEKSANDROV a SIMONSON 2008). V dominantním místě Tet-1 dochází k interakci tetracyklinu s regionem H31 a H34 16S rRNA. Region H34 se zároveň podílí na vazbě aminoacylované molekuly tRNA. Molekula tetracyklinu je stabilizována dvěma  $Mg^{2+}$  kationty a třemi fosfátovými skupinami (BRODERSEN *et al.* 2000, ALEKSANDROV *et al.* 2008).

### 2.1.2 MECHANIZMUS REZISTENCE

Tetracykliny (Tc) se staly často využívanými antibiotiky nejen při léčbě infekčních onemocnění člověka, ale také ve veterinární praxi a zemědělství. Krátce po zavedení tetracyklinů do praxe se objevil první rezistentní mikroorganismus – *Shigella dysenteriae* v roce 1953 (AKIBA *et al.* 1960, ROBERTS 2003).

Rezistence k tetracyklinům má od 50. let stoupající tendenci, ale vzhledem k jejich široké možnosti použití a nízké toxicitě stále existuje snaha vytvářet nové deriváty, které by obcházely mechanismy rezistence. Výchozím tetracyklinem k přípravě derivátů byl zvolen minocyklin. Posléze byly na jeho základě připraveny glycylykliny, které byly účinné i u bakteriálních druhů rezistentních k původním tetracyklinům (TESTA *et al.* 1993). V roce 2005 se začal terapeuticky využívat první člen této třídy – tigeicyklin (LIVERMORE 2005). Glycylykliny, podobně jako tetracykliny, inhibují syntézu proteinů vazbou na ribozomální podjednotku. Efektivita vazby je ale u glycylyklinů pětikrát vyšší (BERGERON *et al.* 1996).



V současnosti jsou známy čtyři mechanismy rezistence k tetracyklinům: 1) snížení intracelulární koncentrace tetracyklinu jeho aktivním vypuzováním z buňky, 2) zabránění vazby tetracyklinu k ribozomální podjednotce pomocí ochranných proteinů, 3) enzymatická inaktivace tetracyklinu specifickou monohydroxylací a 4) změna cílového místa mutací 16S rRNA (BALL *et al.* 1980, BURDETT 1991, ROSS *et al.* 1998, YANG *et al.* 2004).

### 2.1.2.1 Snížení intracelulární koncentrace tetracyklinu

Snížení intracelulární koncentrace tetracyklinu jeho pumpováním z buňky specifickými efluxními proteiny je nejběžnějším mechanismem rezistence rozšířeným u gram pozitivních i gram negativních bakterií (LEVY 1992, HIRATA *et al.* 2004).

V současnosti bylo popsáno 27 tříd efluxních *tet* genů, jejichž produkty jsou transmembránové proteiny, které vážou tetracyklin v komplexu s hořčíkem (Tc-Mg<sup>+</sup>) a aktivně ho vypuzují do periplazmy výměnou za proton (MCMURRY *et al.* 1982, THANASSI *et al.* 1995, ROBERTS 2010b).

SIGLER *et al.* (2000) ve své studii určili rychlost difuze tetracyklinu do buňky *E. coli*. Jími zjištěná hodnota difusního koeficientu ukázala, že rychlost průniku tetracyklinu je nízká a vysvětluje, jak lze účinně snižovat intracelulární koncentraci tetracyklinu jeho vypuzením efluxními pumpami pouze do periplazmy. Pokud fungují jako transportéry tetracyklinu endogenní pumpy, které překlenují u gram negativních bakterií periplazmu i vnější membránu, vypuzují tetracyklin přímo do media (THANASSI *et al.* 1995).

Většina efluxních Tet proteinů patří do rodiny transportérů "major facilitator" (MF), ale některé pumpy rodiny "resistance nodulation division" (RND) rozeznávají jako svůj substrát tigeicyklin a pumpují ho z buňky (LOMOVSKAYA a WATKINS 2001, HIRATA *et al.* 2004). Efluxní Tet proteiny byly rozděleny do 9 skupin na základě jejich podobnosti na aminokyselinové úrovni (**Tab. 1**). Nejpočetnější je první skupina zahrnující 14 tříd *tet* genů, které jsou pod kontrolou represoru TetR, a zahrnuje determinanty identifikované u gram negativních (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(V)*, *tet(Y)*, *tet(30)*, *tet(31)*), i gram pozitivních (*tet(Z)*, *tet(33)*) bakterií (CHOPRA a ROBERTS 2001, ROBERTS 2010b). Do této skupiny mimo jiné patří nejrozšířenější efluxní determinanta rezistence *tet(B)*, která byla identifikována do dnešní doby u 29 rodů gram negativních bakterií (ROBERTS 2010c).

Efluxní Tet proteiny obvykle rozpoznávají a exportují tetracyklin, chlortetracyklin a oxytetracyklin. Jedinými známými transportéry tetracyklinu i minocyklinu jsou Tet(B) a Tet(L) (BUTAYE *et al.* 2003).

#### **Efluxní *tet* geny**

<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(J), tet(V), tet(Y), tet(Z), tet(30), tet(31), tet(33)</i>
<i>tet(35)</i>
<i>tet(39), tet(41)</i>
<i>tet(K), tet(L), tet(38)</i>
<i>tetA(P), tet(40)</i>
<i>otr(B), otr(C)</i>
<i>tcr</i>
<i>tet(42)</i>
<i>tet(43)</i>

**Tab. 1: Identifikované efluxní geny rezistence k tetracyklinu rozdělené podle vzájemné podobnosti jimi kódovaných proteinů. Podle (ROBERTS 2010b).**

#### **2.1.2.2 Ochrana ribozomů**

Ochrana ribozomů před vazbou tetracyklinu je zprostředkována ochrannými cytoplazmatickými proteiny (RPP, ribosomal protection proteins). Tyto proteiny jsou pravděpodobně odvozené od elongačních faktorů EF-Tu (elongation factor thermo unstable) a EF-G (elongation factor G), u kterých po ztrátě původní funkce došlo k adaptaci na úlohu RPP. K diverzifikaci RPP došlo ještě před tím, než člověk začal antibiotika intenzivně používat (TAYLOR a CHAU 1996, AMINOV *et al.* 2001, CONNELL *et al.* 2003a). Tato funkce byla dosud popsána u produktů dvanácti *tet* determinant, které jsou rozšířené u gram pozitivních i gram negativních bakterií (**Tab. 2**) (ROBERTS 2010b).

Mezi nejvíce studované RPP patří Tet(M) a Tet(O), které sdílí sekvenční identitu s EF-G, a to zejména v oblasti podílející se na vazbě a hydrolyze GTP. Tetracyklin po vazbě na ribozom, která je pravděpodobně provázena konformační změnou, blokuje A místo pro vstup aminoacylované tRNA, který je kontrolovaný EF-Tu. Tetracyklin

nebrání vzniku ternárního komplexu a je možné, že opakovaně dochází k jeho vytváření a hydrolýze GTP, aniž by docházelo k obsazení A místa. Tento neproduktivní cyklus by byl pro buňku energeticky velmi náročný. Po rozeznání prázdného A místa RPP proteinem, dochází v přítomnosti GTP k jeho vazbě na ribozom, do stejného vazebného místa jako elongační faktory, a vytvoření stabilního komplexu. V případě Tet(O) tato interakce zeslabí vazbu tetracyklinu a dochází k jeho uvolnění z ribozomu. Toto oslabení vazby je pravděpodobně způsobeno lokální konformační změnou v oblasti H34, která nebrání pokračování elongačního cyklu translace. Je předpokládáno, že změna konformace přetrvává i po disociaci Tet(O) a ribozom je dále imunní k působení tetracyklinu (**Obr. 2**) (BURDETT 1991, BURDETT 1996, DANTLEY *et al.* 1998, NOAH *et al.* 1999, BRODERSEN *et al.* 2000, SPAHN *et al.* 2001, CONNELL *et al.* 2003b).

Zvláštní skupinou determinant jsou mozaikové deriváty známých genů rezistence k tetracyklinu kódujících RPP. Tyto deriváty sdílejí svou částí vysokou sekvenční identitu (80%) s jednou determinantou a druhou částí s jinou známou nebo novou determinantou. Příkladem mohou být *tet(O/W/O)* nebo *tet(O/32/O)* (MELVILLE *et al.* 2001, STANTON *et al.* 2004).

### RPP geny

---

*tet(M), tet(O), tet(S), tet(W), tet(32), tet(Q), tet(T), tet(36)*

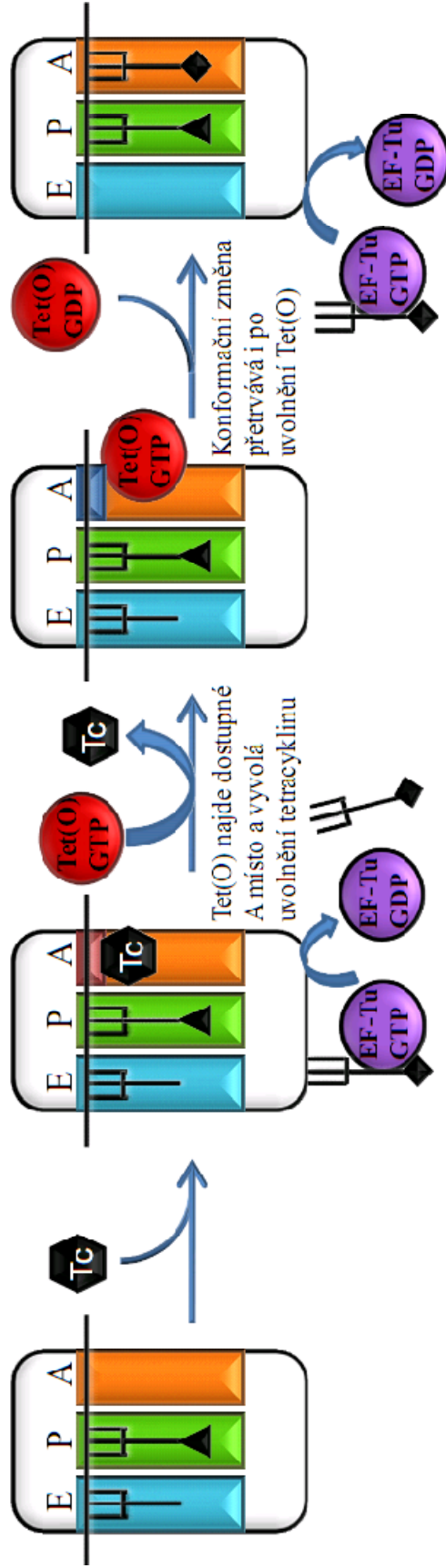
---

*otr(A), tetB(P)b, tet*

---

*tet(44)*

**Tab. 2: Identifikované RPP geny rezistence k tetracyklinu rozdělené podle vzájemné sekvenční podobnosti jimi kódovaných proteinů. Podle (ROBERTS 2010b).**



Po vazbě tetracyklinu dochází ke konformační změně A místa a zabránění vazbě aminoacylované tRNA

Obr. 2: Pravděpodobný mechanismus působení Tet(O) proteinu. Podle (CONNELL *et al.* 2003b).

### 2.1.2.3 Enzymatická inaktivace

Inaktivace nebo modifikace antibiotika je u některých tříd antibiotik rozšířeným mechanismem rezistence. U tetracyklinu byly do dnešní doby popsány 3 geny, jejichž produkty se podílejí na inaktivaci tetracyklinu – *tet(X)*, *tet(37)* a *tet(34)* (SPEER a SALYERS 1988, NONAKA a SUZUKI 2002, ROBERTS 2010b, THAKER *et al.* 2010).

Protein Tet(X) byl charakterizován jako flavin (FAD) závislá monooxidáza, která hydrolyzuje tetracyklin. Tato místně specifická hydrolyza (oblast mezi C11 a C12) probíhá za přítomnosti kyslíku a NADPH za vzniku FAD-4a-hydroperoxidu. Tato reakce má pravděpodobně vliv na vazbu  $Mg^{2+}$ , jehož přítomnost je nutná k interakci s ribozomem (YANG *et al.* 2004).

Protein Tet(37) vykazuje podobné vlastnosti jako Tet(X), i když mezi nimi nebyla prokázána významná sekvenční identita (DIAZ-TORRES *et al.* 2003).

Protein Tet(34) byl identifikován u *Vibrio* sp. a sekvenčně odpovídá xantin-guanin fosforibosiltransferáze *V. cholerae* (NONAKA a SUZUKI 2002).

### 2.1.2.4 Mutace 16S rRNA

Mutace cílového místa pro antibiotikum je známým mechanismem rezistence. V případě tetracyklinu byla tato možnost, jak snížit citlivost buňky k antibiotiku, popsána pouze u několika organizmů.

Vazebné místo tetracyklinu na ribozomu zahrnuje 16S rRNA, region H34 a H31, a další ribozomální proteiny. Při studiu *Propionibacterium acnes* rezistentního k tetracyklinu byl objeven mechanismus, který zahrnuje záměnu bází v oblasti H34 16S rRNA (ROSS *et al.* 1998, BRODERSEN *et al.* 2000). Mutace v jiném regionu 16S rRNA, v regionu H31, byla popsána i u *Helicobacter pylori*. V případě *H. pylori* bylo prokázáno, že mutace v této oblasti snižuje schopnost tetracyklinu vázat se na ribozom (TRIEBER a TAYLOR 2002, NONAKA *et al.* 2005). Nedávno bylo popsáno obdobné snížení citlivosti k tetracyklinu díky mutaci 16S rRNA u *Mycobacterium pneumoniae* a *Mycobacterium hominis* a k doxycyklinu u *Brachyspira hyodysenteriae* (PRINGLE *et al.* 2007, DEGRANGE *et al.* 2008).

## 2.2 ANTIBIOTIKA A REZISTENCE V PŮDNÍCH EKOSYSTÉMECH

Hlavní cestou, jak se dostávají antibiotika do prostředí, je jejich využívání při léčbě zvířat, profylaxi nebo jako růstových stimulátorů. Kromě aplikace antibiotik ve zvířecích chovech jsou využívána i v zemědělství, například oxytetracyklin byl od 50. let využíván jako pesticid při pěstování ovoce a zeleniny (D'COSTA *et al.* 2007). Nedávno byl popsán vliv tetracyklinu na půdní mikroorganismy. Při jeho využívání na podporu růstu v hospodářských chovech se přidává do krmiva subterapeutická koncentrace. Tetracykliny jsou následně vylučovány v moči a fekáliích a dostávají se do mrvy a vody. Tato mrva je tedy kontaminovaná antibiotiky a pravděpodobně i rezistentními fekálními mikroorganismy, které jsou selektovány v gastrointestinálním traktu zvířat. Pokud se tato mrva dále používá k hnojení, může to vést ke vzniku rezistentních bakterií v prostředí a následnému rozšiřování determinant rezistence do dalších ekosystémů i potencionálních patogenů člověka (CHEE-SANFORD *et al.* 2001). Při rozšíření determinant rezistence do původních půdních mikroorganismů, které jsou dobře adaptované na přežití v půdě, může vzniknout rezervoár genů rezistence. Tento rezervoár může v půdě dlouho přetrvávat, a to i po odstranění selekčního tlaku. Při tomto procesu pravděpodobně dochází i k selekci determinant rezistence k dalším antibiotikům. (GHOSH a LAPARA 2007). O perzistenci genů rezistence k tetracyklinu svědčí i výsledky metagenomické studie fekálních bakterií u prasat z ekologického chovu, u kterých nebyly žádným způsobem použity antibiotika. I u těchto bakterií byly identifikovány geny rezistence k tetracyklinu, které se mohly rozšířit z přírodního prostředí, a přetrvávají v gastrointestinálním traktu prasat i bez jakéhokoliv selekčního tlaku antibiotik (KAZIMIERCZAK *et al.* 2009).

Jaký mají antibiotika v půdě dopad na původní mikroorganismy, jakým způsobem je poháněn přenos determinant a jejich perzistence v prostředí, by mělo být předmětem intenzivního zkoumání.

### 2.2.1 VÝVOJ A ROZŠÍŘOVÁNÍ REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM

Přes 80% antibiotik, původních nebo semisyntetických, která jsou využívána k léčbě v lékařství, pochází z půdních bakterií. U producentů antibiotik se vyvinuly mechanismy ochrany před jimi produkoványi antibiotiky. Přítomnost těchto antibiotik

v půdě pak vytváří selekční tlak na ostatní mikroorganismy ve stejné nise, a u těchto mikroorganismů se může jako odpověď vyvinout rezistence. Ta může vzniknout buď mutací, nebo být získána horizontálním přenosem genů (HGT, horizontal gene transfer), pro který mohou být zdrojem producenti antibiotik (BENVENISTE a DAVIES 1973, D'COSTA *et al.* 2007). Rozšiřování rezistence k antibiotikům lze pak vysvětlit jako evoluční proces poháněný selekčním tlakem. Takto se pravděpodobně původně rozšířily geny pro specifické efluxní pumpy rezistence k tetracyklinu (DAIRI *et al.* 1995).

Mimo nemocniční prostředí, v přírodních habitatech, nemusí být tak silný selekční tlak působením antibiotik. U oportunních patogenů, které mají původ v tomto prostředí, došlo ke vzniku přirozené rezistence pravděpodobně během jejich vývoje v původních habitatech dlouho předtím, než lidé objevili antibiotika (MARTINEZ 2009). Naopak získaná rezistence u nemocničních patogenů je nedávná událost a výsledek selekčního tlaku působeného vyžíváním antibiotik člověkem (ALEKSHUN a LEVY 2007, SALMOND a WELCH 2008).

V ekosystémech, kde se vyskytují producenti antibiotik, je tedy funkční role determinant rezistence ochrana před těmito antibiotiky. U přirozeně rezistentních bakterií, původem z přírodních habitatů, kde se producenti antibiotik nevyskytují, není funkce determinant rezistence tak jasná. Je pravděpodobné, že u těchto determinant není rezistence jejich hlavní funkční rolí a před využíváním antibiotik měly jinou metabolickou funkci. Příkladem jsou pumpy podílející se na rezistenci k mnoha antimikrobiálním látkám (MDR, multidrug resistance) mikroorganismů, které byly izolovány ještě před vytvořením syntetických fluorochinolonů, a které jsou přesto schopné je rozeznávat a pumpovat z buňky (ALONSO *et al.* 1999, AMINOV a MACKIE 2007, FAJARDO *et al.* 2008). Tuto myšlenku podporuje i fakt, že některé determinanty na úrovni proteinové struktury a funkce sdílejí vlastnosti s proteiny, jejichž funkcí není rezistence. Je možné, že determinanty rezistence vznikly z prekurzorů, které byly citlivé na přítomnost antibiotik nebo k nim měly malou afinitu (WRIGHT 2007).

### 2.2.1.1 Rozšiřování determinant rezistence HGT

Bakterie může získat exogenní DNA transformací, konjugací nebo transdukcí. Mobilními elementy, kterými je horizontální přenos zprostředkován, mohou být plazmidy, transpozony nebo integrony. Na těchto elementech může docházet k akumulaci genů rezistence, které dovolují vznik kmenů rezistentních k mnoha antibiotikům. Rozšiřování determinant rezistence HGT je podporováno využíváním antibiotik a jejich uvolňování do prostředí (D'COSTA *et al.* 2007).

Transpozice některých transpozonů může být podporována subinhibiční koncentrací antibiotik. Příkladem je stimulační efekt tetracyklinu na konjugativní transpozony Tn916 (nesoucí *tetM*), Nbu1 nebo CTnDOT (nesoucí *tetQ*) (SHOWSH a ANDREWS 1992, SONG *et al.* 2009). Častější událost konjugace může být vysvětlena zvýšením selekčního tlaku na získání rezistence nebo častějším zahájením přenosu, případně kombinací obou (BAHL *et al.* 2004). Nízká koncentrace tetracyklinu může tedy zvyšovat pravděpodobnost horizontálního transferu mobilních elementů (SONG *et al.* 2009).

U gramnegativních bakterií se na rozšiřování rezistence podílí přítomnost integronů I. třídy. Jejich přítomnost byla ověřena i u grampozitivních bakterií. S těmito integrony byla spojena i přítomnost genů rezistence k tetracyklinu (MARTIN *et al.* 1990, FLUIT a SCHMITZ 1999, WHITE *et al.* 2001).

### 2.2.2 TRANSPORTNÍ PROTEINY

Transportní proteiny (efluxní pumpy) jsou velmi důležitou součástí v systému akumulace a efluxu antibakteriálních látek (VAN BAMBEKE *et al.* 2000). Mechanismus efluxu, jako možnost rezistence k antibiotikům, byl prvně popsán v roce 1980 (MCMURRY *et al.* 1980). Molekula antibiotika je vypuzována z bakteriální buňky aktivním procesem, který je poháněný energií. Transportní proteiny lze podle rozeznávaných substrátů – antibiotik – rozdělit na specifické a nespecifické (MDR) pumpy.

Jak bylo naznačeno, geny rezistence k antibiotikům mají původ v organizmech, která produkují antibiotika. MDR pumpy se však pravděpodobně vyvinuly z přirozených transportních systémů pro toxické zplodiny metabolismu a nejsou



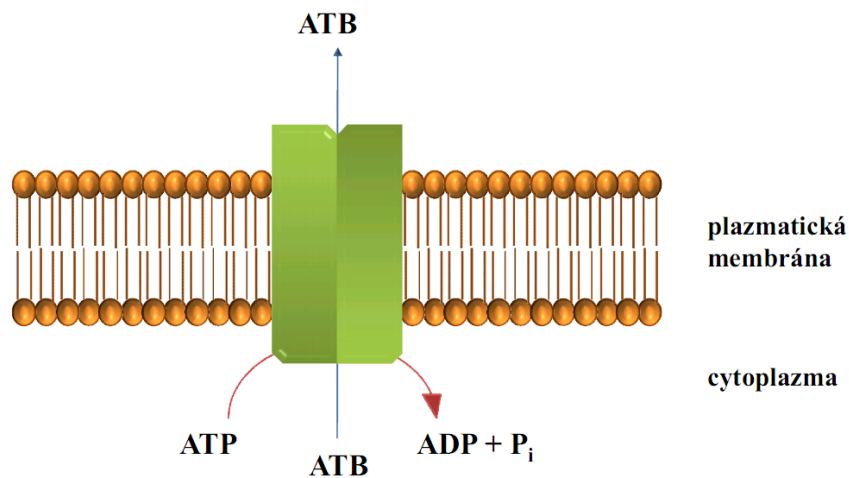
omezeny pouze na producenty antibiotik. Mnoho analyzovaných MDR pump je kódováno chromozomálně a jejich exprese je přísně regulovaná (BENVENISTE a DAVIES 1973, GRKOVIC *et al.* 2002, BUTAYE *et al.* 2003). V půdě jsou často nalézány organizmy, které kódují mnoho MDR pump (KONSTANTINIDIS a TIEDJE 2004). Toto množství lze vysvětlit právě tak, že tyto pumpy mají mnoho různých fyziologických funkcí a podílejí se na adaptivitě bakterií (MARTINEZ *et al.* 2009). MDR pumpy patří do různých nadrodin a rodin transportérů – ABC, MF, RND, SMR a MATE (zkratky viz **Kap. 2.2.2.1**, **Kap. 2.2.2.2**, **Kap. 2.2.2.3**, **Kap. 2.2.2.4** a **Kap. 2.2.2.5**) (SAIER *et al.* 1994, CHUNG a SAIER JR 2001, PAULSEN *et al.* 2001, MORIYAMA *et al.* 2008).

### 2.2.2.1 Transportéry nadrodiny ABC

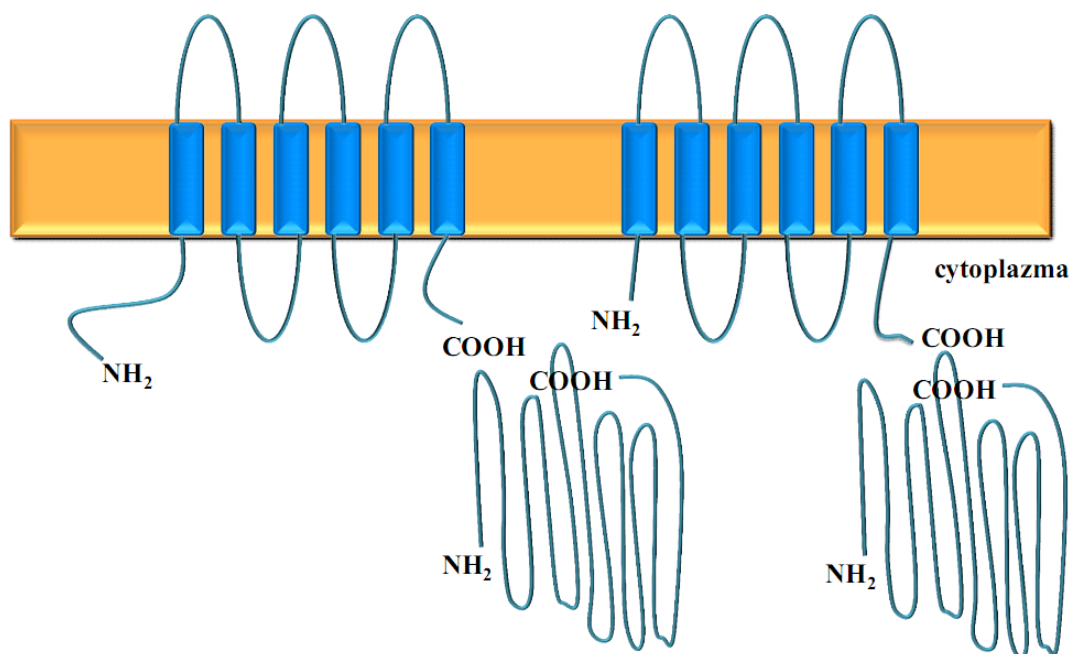
Transportéry patřící do nadrodiny ABC (ATP-binding cassette) se vyskytují u bakterií, archeí i eukaryot. Transport substrátů je poháněn hydrolyzou ATP (**Obr. 3**) a proteiny v této nadrodině lze rozdělit do více než 30 rodin. Tyto transportéry se skládají ze čtyř proteinových domén - dvou integrálních membránových domén se šesti transmembránovými úseky (TMS, transmembrane segment) a vazebným místem pro substrát a dvou cytoplazmatických domén se šesti vlásenkami a vazebným místem pro nukleotid (**Obr. 4**). Zde dochází k hydrolyze ATP a tato ATPázová doména je vysoce konzervovaná. Proteinové domény mohou tvořit homodimery nebo heterodimery, u kterých jedna transmembránová doména fúzuje s jednou doménou vázající nukleotid. Přítomnost všech čtyř domén je nutná k vytvoření funkčního transportéru (FATH a KOLTER 1993, SAIER *et al.* 1998, SCHNEIDER a HUNKE 1998, LUBELSKI *et al.* 2007). Funkce pump nadrodiny ABC jako MDR pump je dobře popsána u grampozitivních bakterií. Naopak u gramnegativních bakterií je ABC pump MDR typu identifikováno dosud velmi málo.

Prvním popsaným MDR transportérem v ABC nadrodině byl LmrA u *Lactococcus lactis*. Tento protein má dvě vazebná místa pro substrát a při jeho expresi v *E. coli* byla pozorována rezistence k tetracyklinům, aminoglykosidům, chloramfenikolu, chinolonům a dalším antibiotikům (VAN VEEN *et al.* 1996, VAN VEEN *et al.* 2000, LUBELSKI *et al.* 2007). Dalšími zástupci z této nadrodiny, které se mohou podílet na rezistenci k antibiotikům, jsou MacAB a LolCDE z *E. coli*, MsrA z *S. epidermis*,

Car(A), Tlr(C) a Smr(B) ze streptomycét nebo Vcam z *Vibrio cholerae*, u kterého byla při expresi v *E. coli* pozorována rezistence k tetracyklinu (DAVIDSON *et al.* 2008).



**Obr. 3:** Schéma efluxní pumpy nadrodiny ABC. Transport substrátu je poháněn hydrolyzou ATP. Podle (HUDA *et al.* 2003, KUMAR a SCHWEIZER 2005).



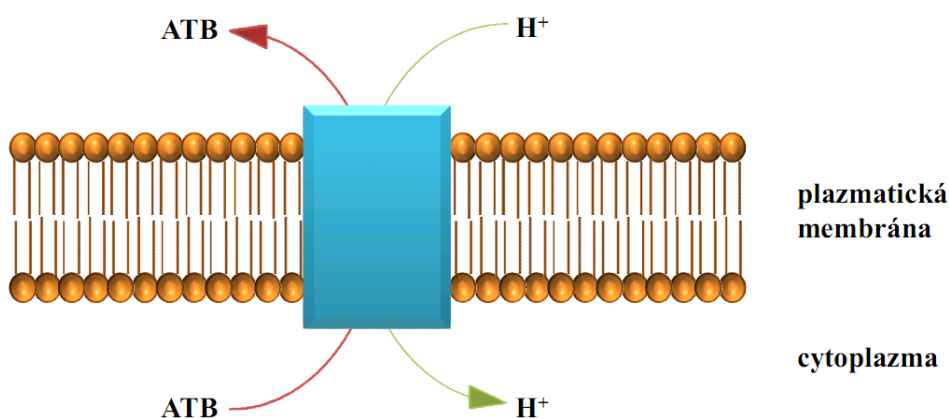
**Obr. 4:** Strukturní model efluxní pumpy nadrodiny ABC. ABC transportéry jsou složeny ze čtyř domén - dvou transmembránových a dvou cytoplazmatických domén, které vážou nukleotid. Mohou tvořit homodimery nebo heterodimery. Podle (SAIER *et al.* 1998).

### 2.2.2.2 Transportéry nadrodiny MF

MF (major facilitator) je velká nadrodina dobře charakterizovaných transportérů, které se vyskytují u prokaryot i eukaryot. Mechanizmy transportu mohou být symport (substrát/kation), antiport (substrát/substrát) nebo uniport různých substrátů (GRIFFITH *et al.* 1992, SAIDIJAM *et al.* 2006) (**Obr. 5**). Tuto nadrodinu lze rozdělit do 58 rodin (LAW *et al.* 2008).

Struktura všech transportérů není prozkoumána a je známa pouze u některých zástupců. Tyto proteiny mají 12, 14 nebo 24 transmembránových úseků a vyvinuly se pravděpodobně z prekursoru se třemi TMS dvojitou duplikací nebo fúzí (PAULSEN *et al.* 1996a, HVORUP a SAIER JR 2002, SAIDIJAM *et al.* 2006). Většina z transportérů MF nadrodiny má pravděpodobně 12 TMS, které jsou spojené hydrofilními vlásenkami, a N- a C- konec proteinu se nachází v cytoplazmě (SAIER *et al.* 1999, SAIER 2003).

Pro studium rezistence k antibiotikům je relevantní druhá a třetí rodina transportních proteinů, které jsou odlišeny na základě membránové topologie – s 14 a 12 transmembránovými úseky. Mezi prvními 200 aminokyselinami efluxních proteinů z 12 TMS a 14 TMS rodiny jsou velké podobnosti (GUILLAUME *et al.* 2004). Rodina proteinů se 14 TMS zahrnuje 30 členů, rodina proteinů s 12 TMS 46 členů, mezi které patří proteiny specifické pro dané antibiotikum i proteiny se širším množstvím substrátů (MDR) (PAULSEN *et al.* 1996a, SAIER 2003). U těchto rodin byly také identifikovány specifické motivy, jejichž konzervace hraje funkční i strukturní roli (PAULSEN a SKURRAY 1993, PAULSEN *et al.* 1996a).

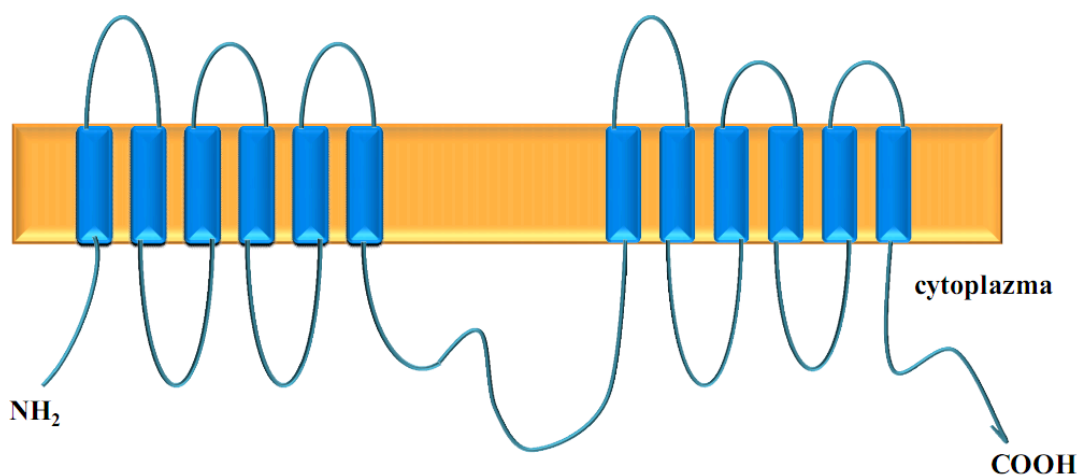


**Obr. 5:** Schéma antiportéru nadrodiny MF. Podle (KUMAR a SCHWEIZER 2005).

### 2.2.2.1.1 Rodina s 12 TMS

Rodina s 12 TMS (**Obr. 6**) zahrnuje proteiny, jejichž substrátem jsou antibiotika. Tyto proteiny se pravděpodobně vyvinuly z proteinů se šesti transmembránovými úseky duplikací (SAIER 2003). Proteiny s 12 TMS se vyskytují v rámci organismů častěji než proteiny s 14 TMS (PAULSEN *et al.* 1996a, PAO *et al.* 1998, SAIER *et al.* 1998).

Do této rodiny patří transportéry Bmr, Blt a NorA, které vykazují funkční podobnost. Proteiny Bmr a Blt, identifikované u *Bacillus subtilis*, se podílí na rezistenci k chloramfenikolu, fluorochinolonom a dalším antibakteriálním látkám. Protein NorA je efluxní pumpa identifikovaná u *Staphylococcus aureus*. Mezi další členy patří Bcr a EmrD z *E. coli* nebo transportéry tetracyklinu první skupiny Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(J), Tet(Z), Tet(30), Tet(31) a Tet(33) (GUILLAUME *et al.* 2004).



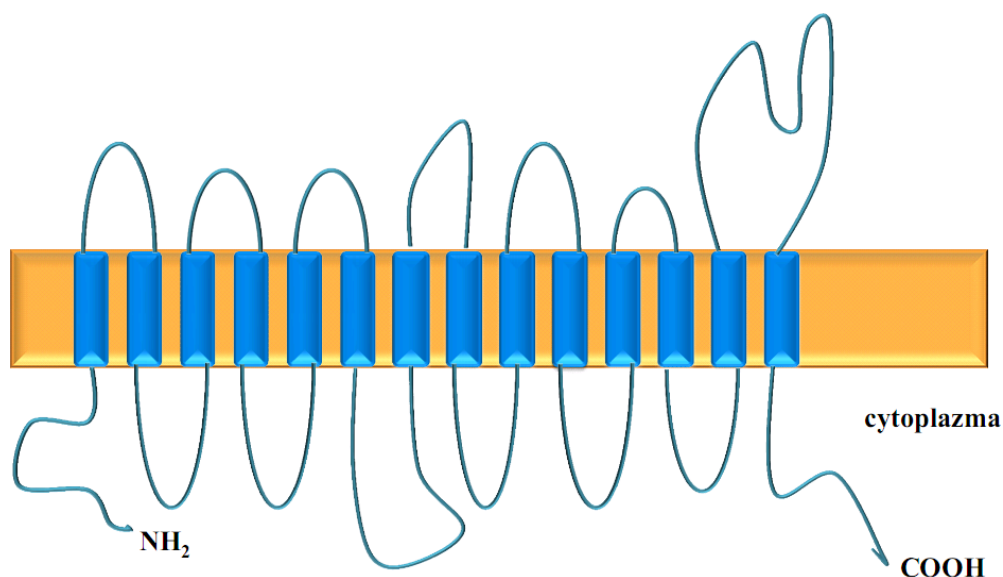
**Obr. 6:** Strukturální model efluxní pumpy superrodiny MF s 12 TMS. Podle (SAIER *et al.* 1998).

### 2.2.2.1.2 Rodina se 14 TMS

Transportéry se 14 TMS se pravděpodobně vyvinuly nezávisle z transportérů s 12 TMS přidáním centrální cytoplazmatické vlásenky do membrány (PAULSEN *et al.* 1996a, SAIER 2003).

Jedním ze zástupců této rodiny je EmrB, kódovaný *emrRAB* operonem. Exprese *emrAB* je stimulována přítomností substrátu, například nalidixové kyseliny, a pod kontrolou regulátoru EmrR. Dále tato rodina se 14 TMS (**Obr. 7**) zahrnuje protein QacA

identifikovaný u *S. aureus*, transportéry tetracyklinu Tet(K), Tet(L), Tcr, OtrB a další efluxní pumpy (GUILLAUME *et al.* 2004).



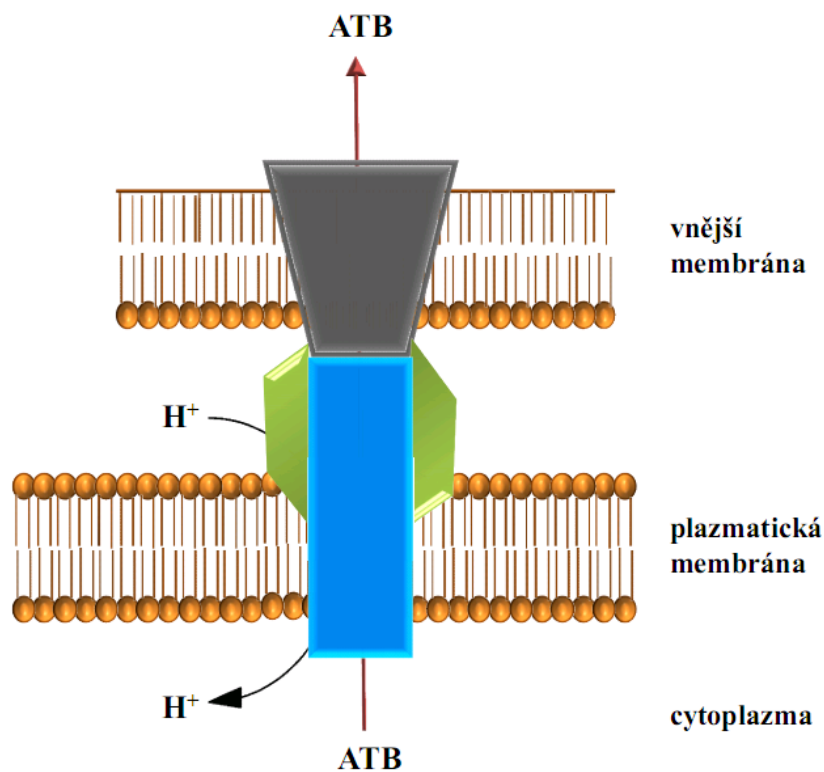
**Obr. 7:** Strukturální model efluxní pumpy superrodiny MF se 14 TMS. Podle (SAIER *et al.* 1998).

### 2.2.2.3 Transportéry rodiny RND

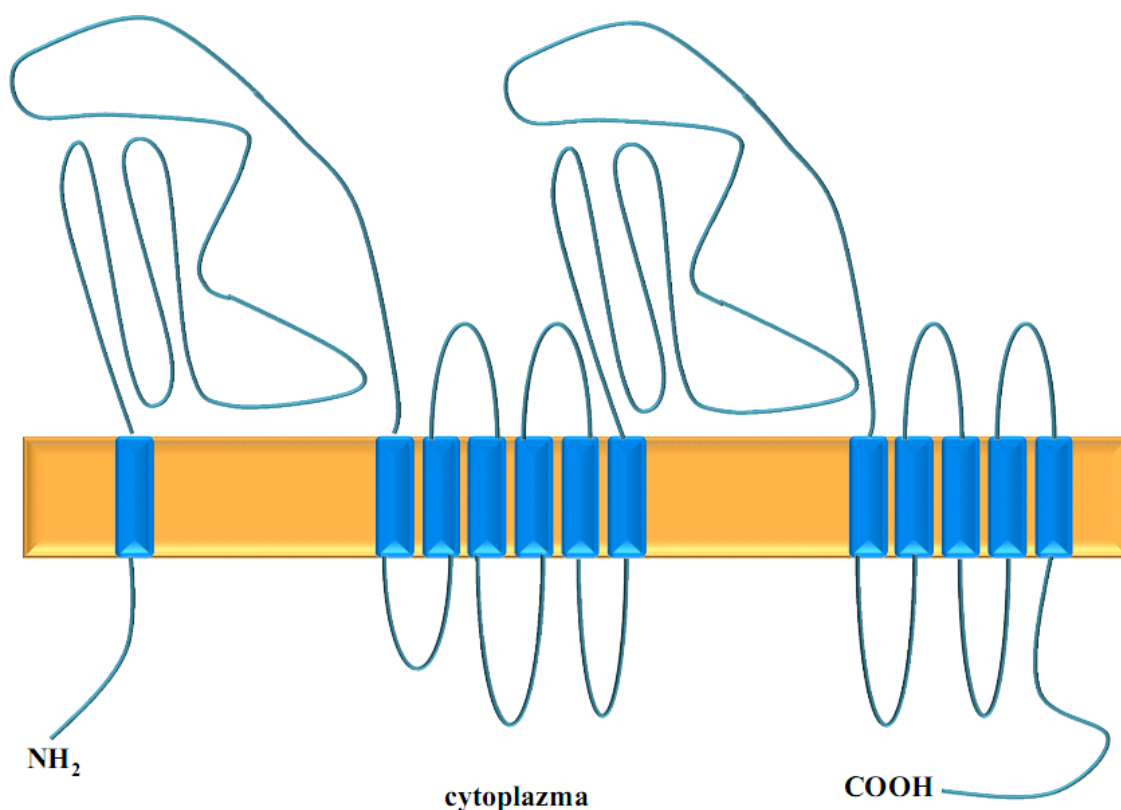
Transportéry RND (resistance nodulation division) rodiny se vyskytují u bakterií, archeí i eukaryot. Většinou fungují jako antiportery substrátu a protonu (**Obr. 8**). Tuto rodinu lze rozdělit do 7 podrodin, první tři zahrnují proteiny gramnegativních bakterií. Proteiny v těchto třech podrodinách sdílejí substrátovou specifitu, na exportu antibiotik se podílí druhá podrodina proteinů. Pátá podrodina zahrnuje proteiny grampozitivních proteinů (SAIER a PAULSEN 2001).

Transportéry RND rodiny se skládají ze tří složek: vnitřního membránového proteinu (IMP, outer membrane protein), vnějšího membránového proteinu (OMF, outer membrane factor) a adaptérového proteinu (membrane fusion protein, MFP). IMP je nutný k dodávání energie pro efluxní systém a je pumpou RND systému. OMF je v přímém kontaktu s IMP a zajišťuje pokračování kanálu k transportu antibiotika do media. MFP přímo interaguje s oběma proteiny, celý komplex stabilizuje a podílí se na jeho skládání. Všechny komponenty jsou pro funkci transportéru esenciální (SAIER *et al.* 1994, MISRA a BAVRO 2009).

Efluxní pumpy (IMP) RND systému mají většinou 12 TMS a dvě extracytoplazmatické domény. První polovina proteinu je homologní druhé polovině proteinu a pravděpodobně vznikly intragenovou tandemovou duplikací (**Obr. 9.**) (SAIER *et al.* 1994, SAIER a PAULSEN 2001).



**Obr. 8:** Schéma transportéru rodiny RND. Modře znázorněn IMP, zeleně adaptérový protein MFP, černě OMF. Podle (KUMAR a SCHWEIZER 2005).



**Obr. 9: Strukturní model IMP proteinu (pumpy) rodiny RND.** Vnitřní membránový protein transportéru RND nadčeleďi se skládá z jednoho TMS úseku na N-konci, následuje extracytoplazmatická doména, šest dalších TMS úseků, druhá extracytoplazmatická doména a pět koncových TMS úseků na C- konci. Podle (SAIER *et al.* 1998).

#### 2.2.2.3.1 Podrodina HaeI

Do této podrodiny patří efluxní systémy gramnegativních bakterií. Mezi zástupce HaeI (hydrophobe/amphiphile efflux-1) rodiny patří efluxní systémy Mex z *Pseudomonas aeruginosa*, Acr z *Escherichia coli* nebo AdeABC z *Acinetobacter baumannii* (TSENG *et al.* 1999).

Hlavní MDR pumpou *E. coli* je transportní systém AcrAB-TolC. Mezi substráty tohoto systému patří erytromycin, minocyklin a další antibakteriální látky. Antiporter AcrB interaguje přes periplazmatický AcrA protein s kanálem TolC ve vnější membráně a dochází k transportu antibiotik přímo do extracelulárního media (MA *et al.* 1993, TIKHONOVA a ZGURSKAYA 2004).

Sedm známých Mex systémů *P. aeruginosa* se odlišují svojí substrátovou specifitou. MexAB-OprM je nejrozšířenější efluxní systém, který je exprimován konstitutivně

a podílí se na přirozené rezistenci *P. aeruginosa* k antimikrobiálním látkám. MexA je u tohoto systému MFP, který interaguje s ostatními složkami systému – MexB (IMP, pumpa) a OprM (OMP) (LI *et al.* 1995, LI *et al.* 2000).

Transportéry MexCD-OprJ a MexEF-OprN jsou exprimované pouze u některých kmenů *P. aeruginosa* a jsou schopné kompenzovat ztrátu MexAB-OprM systému. Při zvýšené expresi efluxních systému MexCD-OprJ nebo MexEF-OprN dochází u mutantů k projevu rezistence k tetracyklinu, chloramfenikolu a chinolonům (LI *et al.* 1994, LI *et al.* 2000).

Efluxní systém MexXY je exprimován inducibilně při přítomnosti substrátu a jeho součástí není vlastní OMP. Tento systém využívá OprM, OMP systému MexAB-OprM. Delece *mexXY* operonu zvýšila citlivost bakterií k tetracyklinu, aminoglykosidům a erytromycinu. Substrátová specifita efluxního systému MexJK je omezena pouze na tetracyklin, erytromycin a triklosan, antimikrobiální látku využívanou v domácnostech. Nedávno identifikovaný efluxní systém MexVW rozeznává fluorochinolony, tetracykliny, chloramfenikol a erytromycin. Posledním známý efluxní systém RND rodiny u *P. aeruginosa* je MexGHI-OpmD, jehož součástí je malý integrální protein MexG s neznámou funkcí (LI *et al.* 1995, LI *et al.* 2000, AIRES *et al.* 2002).

#### 2.2.2.3.2 Podrodina Hae2

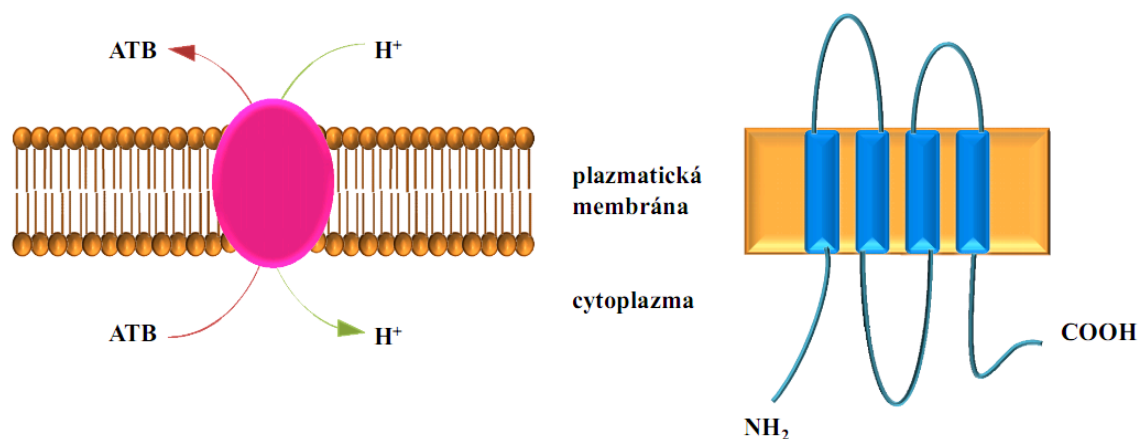
Podrodina transportních proteinů Hae2 (hydrophobe/amphiphile efflux-2) zahrnuje efluxní pumpy grampozitivních bakterií. Jedním ze členů je efluxní pumpa ActII3 identifikována u *Streptomyces coelicolor*, která by se pravděpodobně mohla podílet na rezistenci k antibakteriálním látkám (TSENG *et al.* 1999).

#### 2.2.2.4 Transportéry rodiny SMR

Do rodiny SMR (small multidrug resistance) transportérů patří malé homo-oligomerní proteiny, které mají pravděpodobně 4 TMS. Vzhledem k jejich malé velikosti (kolem 110 aminokyselin) se předpokládá, že v membráně tvoří homotrimery. Transportéry rodiny SMR byly rozděleny do dvou podrodin. Do první podrodiny se řadí MDR pumpy. Proces efluxu probíhá mechanismem antiportu antimikrobiální látky a H<sup>+</sup>



(PAULSEN *et al.* 1996b, SAIER *et al.* 1998) (**Obr. 10**). Jedním ze zástupců první podrodiny je transportér Smr kódovaný *S. aureus* a dalšími stafylokoky, který se vyskytuje na konjugativních i nekonjugativních plasmidech. Efluxní pumpa Smr se podílí na rezistenci k antiseptickým látkám (LITTLEJOHN *et al.* 1991). Dalším členem je EmrE, efluxní pumpa *E. coli*, která se podílí na rezistenci k tetracyklinu nebo erytromycinu (YERUSHALMI *et al.* 1995).



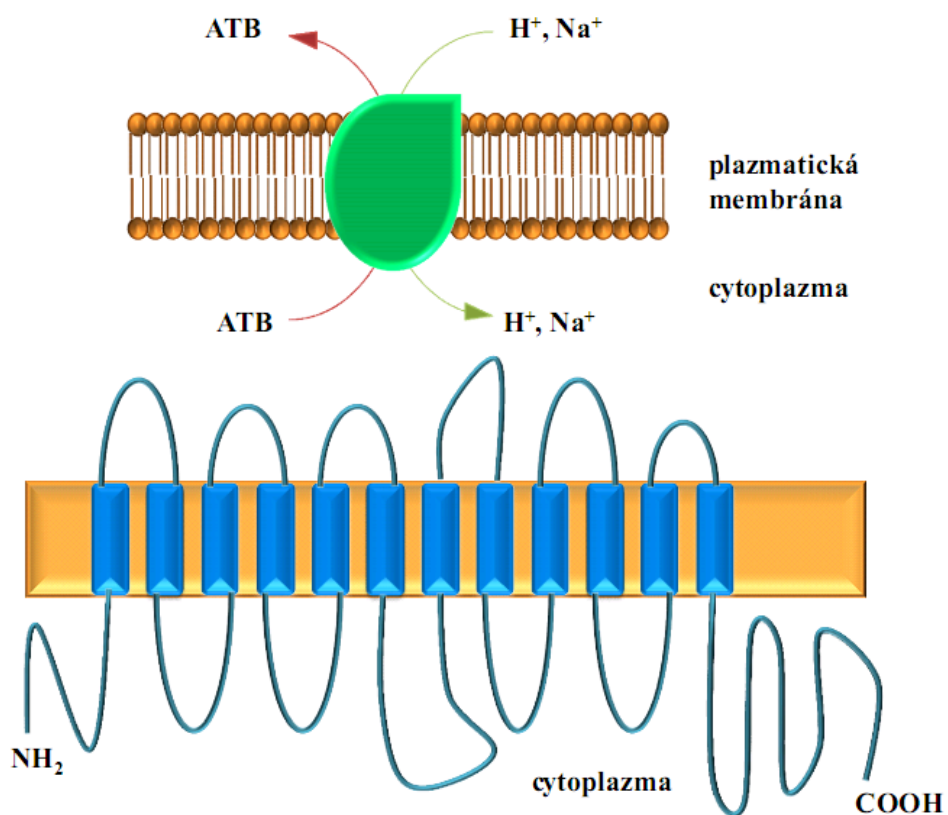
**Obr. 10: Schéma a strukturní model efluxní pumpy rodiny SMR.** Transportéry patřící do rodiny SMR mají 4 TMS úseky a transportují antimikrobiální látku výměnou za proton. Podle (KUMAR a SCHWEIZER 2005).

### 2.2.2.5 Transportéry rodiny MATE

Transportéry rodiny MATE (multidrug and toxic compound extrusion) byly identifikovány u prokaryot, archeí i eukaryot a rozděleny do tří podrodin. Membránové transportéry prokaryot byly zařazeny do první a třetí podrodiny.

Většina členů rodiny MATE má 12 TMS, sdílí mezi sebou asi 40% sekvenční identitu a dosud u nich nebyl nalezen žádný charakteristický sekvenční konsenzus. Proteiny MATE rodiny působí jako antiportery toxických kationtů a protonů nebo sodíkových kationtů, a mohou fungovat jako MDR pumpy (BROWN *et al.* 1999, OMOTE *et al.* 2006) (**Obr. 11**). Prvním identifikovaným členem této rodiny byl protein NorM u *Vibrio parahaemolyticus*, který se může podílet na rezistenci k streptomycinu, daunomycinu a dalším antibakteriálním látkám. Mezi další identifikované zástupce patří MepA u *S. aureus*, který je spojován s rezistencí k tigecyklinu, PmpM u *P. aeruginosa*,

YdhE u *E. coli* nebo AbeM u *A. baumannii* (MORITA *et al.* 1998, HE *et al.* 2004, KAATZ *et al.* 2005, SU *et al.* 2005, OMOTE *et al.* 2006).



**Obr. 11: Schéma a strukturní model efluxní pumpy rodiny MATE.** *Transport efluxními proteiny MATE rodiny probíhá výměnou za proton nebo sodíkový kation. Proteiny mají 12 TMS. Podle (KUMAR a SCHWEIZER 2005).*

## 2.3 REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

Rezistence k tetracyklinu je u gramnegativních bakterií poměrně rozšířená, zejména díky přirozené rezistenci a možnosti horizontálního přenosu genů. Rezistence k několika různým třídám antibiotik zároveň je často spojena s přítomností MDR pump a může vést až ke vzniku panrezistentních bakterií. V případě gramnegativních bakterií efluxní pumpy většinou překlenují vnitřní i vnější membránu, která vytváří bariéru pro hydrofilní i hydrofobní antibiotika, a patří do rodiny RND transportérů. To dovoluje vypuzení substrátu až do extracelulárního media (ZGURSKAYA a NIKAIDO 2000). Vnější membrána gramnegativních bakterií přitom představuje pro hydrofilní i hydrofobní antibiotika účinnou bariéru.

Izoláty gramnegativních bakterií, které jsou využity v této studii, patří mezi nefermentující, aerobní bakterie.

### 2.3.1 *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

*Stenotrophomonas maltophilia* (dříve *Pseudomonas maltophilia*, poté *Xanthomonas maltophilia*) patří mezi nefermentující, obligátně aerobní, nesporulující gramnegativní bakterie a oportunní patogeny. Taxonomicky se řadí do kmene *Proteobacteria*, třídy *Gammaproteobacteria*, a často je izolována z půdy, vody a povrchů na jejich rozhraní v různých geografických oblastech. V současné době se řadí vedle *Acinetobacter sp.* a *Pseudomonas aeruginosa* mezi důležité nosokomiální patogeny způsobující závažné infekce hlavně u imunokompromitovaných osob (PALLERONI a BRADBURY 1993, DENTON a KERR 1998). Léčba těchto infekcí je, zejména díky genotypové a fenotypové variabilitě, přirozené i získané rezistenci a snížené permeabilitě membrány, velmi problematická (BERG *et al.* 1999).

*S. maltophilia* je častou součástí rhizosféry. Rhizosféra je nikou velmi bohatou na živiny a dochází zde k vysoké kompetici mezi mikroorganismy. Mikroorganismy rhizosféry jsou často producenty antibakteriálních látek, dochází zde k častému horizontálnímu přenosu genů a rozšiřování genů rezistence. U *S. maltophilia* byla identifikována produkce antibiotika – maltophilinu, který je pravděpodobně odvozen od polyketidů. V rhizosféře dochází k vzájemnému působení mezi hostitelskou rostlinou a bakteriemi a mnoho těchto mechanismů je shodných s mechanismy bakteriální

patogeneze. Je možné, že stejné mechanismy jsou využity i při kolonizaci lidského těla a tyto bakterie pak mohou být oportunistickými patogeny (RAHME *et al.* 1995, JAKOBI *et al.* 1996, BERG *et al.* 2005). Při srovnání klinického izolátu *S. maltophilia* K279a a environmentálního izolátu R551-3 bylo zjištěno, že geny nutné k infekci hostitele a/nebo patogenitě jsou u izolátů z různého prostředí konzervované (ROCCO *et al.* 2009).

### 2.3.1.1 Rezistence u *S. maltophilia*

*Stenotrophomonas maltophilia* je rezistentní k různým třídám antibiotik. Klinické izoláty jsou často rezistentní k tetracyklinu,  $\beta$ -laktamům, aminoglykosidům a fluorochinolonům (ZHANG *et al.* 2001, CHANG *et al.* 2004). Tato skutečnost je spojena s identifikováním inducibilních  $\beta$ -laktamáz L1 a L2, acetyltransferázy, MDR pump v genomu *S. maltophilia* a možností horizontálního přenosu genů rezistence. Horizontální přenos může probíhat mezi *Stenotrophomonas* a gramnegativními bakteriemi, ale i grampozitivními bakteriemi. Tato možnost byla popsána u izolátu *S. maltophilia* D457, u kterého byl identifikován klastř genů rezistence k antibiotikům a těžkým kovům pocházející z grampozitivních bakterií.

Při studiu izolátů *S. maltophilia* různého původu bylo zjištěno, že profil rezistence nesouvisí s tím, zda jsou klinického nebo environmentálního původu (WALSH *et al.* 1997, BERG *et al.* 1999, LAMBERT *et al.* 1999, ALONSO a MARTINEZ 2000, ALONSO *et al.* 2000, AVISON *et al.* 2001). Známé MDR pumpy identifikované u *S. maltophilia* patří do rodiny RND. U klinického izolátu K279a bylo identifikováno několik efluxních MDR pump RND typu – SmeABC, SmeDEF, SmeYZ, SmeJKL, SmeGH, SmeMN, SmeVWX a SmeOP. Kromě pump patřících k RND rodině, byly u *S. maltophilia* identifikovány efluxní systémy patřící k MF a ABC nadrodině. U nich dosud nebyl stanoven podíl na rezistenci k antibiotikům (ALONSO a MARTINEZ 2000, LI *et al.* 2002, CROSSMAN *et al.* 2008, SANCHEZ *et al.* 2009).

Integrony nebo plazmidy pravděpodobně nehrají důležitou roli v rezistenci *S. maltophilia*. Geny rezistence identifikované u *S. maltophilia* R551-3 a K279a nebyly spojené s pohyblivými elementy a nebyly tedy v nedávné době získané HGT (CHANG *et al.* 2004, CROSSMAN *et al.* 2008).

Jedinými identifikovanými determinanty rezistence k tetracyklinu byly dosud efluxní pumpy Tet(35) a Tet(39). Determinanta *tet(35)* byla identifikována u izolátu *Stenotrophomonas* z rybí farmy v Chile. Tento gen pro efluxní pumpu byl předtím identifikován u *Vibria* a lze předpokládat, že tato determinanta je typická pro mikroorganismy žijící ve studených vodách. Determinanta *tet(39)* byla identifikována u izolátu *Stenotrophomonas maltophilia* ze znečištěné řeky v Nigérii. Tato determinanta byla pravděpodobně získána horizontálním přenosem mezi rody *Stenotrophomonas* a *Acinetobacter*, u kterého byla původně identifikována v nedávné době. Výskyt těchto determinant byl v obou případech pravděpodobně spojený s přítomností plazmidů a jejich horizontálního přenosu (MIRANDA *et al.* 2003, ADELOWO a FAGADE 2009, ROBERTS 2010c).

#### 2.3.1.1.1 *SmeDEF*

Transportní systém *SmeDEF* byl první objevenou MDR pumpou u rodu *Stenotrophomonas*, která se podobala dalším pumpám popsáných u gramnegativních bakterií. Patří do rodiny RND a je tedy tvořena MFP (*SmeD*), OMF (*SmeE*) a IMP (*SmeF*) (ALONSO a MARTINEZ 2000).

Expresí MDR pump je často regulována represorem a zvýšení jejich exprese obvykle souvisí s mutací v genu pro represor (GRKOVIC *et al.* 2002). Pro *smeDEF* byl identifikován represor *SmeT*, který patří do rodiny TetR represorů (**Obr. 12**). Je pravděpodobné, že *SmeT* reguluje i vlastní expresi a není jediným regulačním systémem *smeDEF*.

*SmeDE* sdílí vysoký stupeň identity s *AcrAB*, MDR pumpou *E. coli* (ALONSO a MARTINEZ 2000, ALONSO a MARTINEZ 2001, SANCHEZ *et al.* 2002, GOULD a AVISON 2006). Při zvýšené expresi *smeDEF* došlo u klinických izolátů ke snížení citlivosti pro různé druhy antibiotik – tetracyklin, chloramfenikol, erytromycin a chinolony (ALONSO a MARTINEZ 2001).



**Obr. 12:** Struktura operonu *smeDEF*. Podle (VILA a MARTINEZ 2008).

### 2.3.1.1.2 *SmeABC*

Transportní systém *SmeABC* byl identifikován na základě aminokyselinové podobnosti s MDR pumpami *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Na základě dalšího studia je předpokládáno, že systém *SmeABC* nefunguje jako MDR pumpa, ale *SmeC* (OMP) je na systému nezávislý a pravděpodobně je součástí jiného MDR systému. Tato možnost byla prokázána schopností *SmeC* zastoupit funkci *OprM*, komponenty efluxního systému *MexAB-OprM* *P. aeruginosa*. Expres *smeABC* je pravděpodobně pod kontrolou identifikovaného dvousložkového systému *SmeS/SmeR* (**Obr. 13**). Při delecí *smeC* došlo ke zvýšení senzitivity mutanta k  $\beta$ -laktamům, zatímco delece *smeAB* neměla vliv na citlivost k antibiotikům (LI *et al.* 2002).



**Obr. 13:** Struktura operonu *smeABC*. Podle (VILA a MARTINEZ 2008).

### 2.3.1.1.3 *SmeK, SmeZ, SmeJ*

*SmeZ* je součástí *SmeYZ* systému, jehož exprese je pravděpodobně pod kontrolou dvousložkového systému *Smlt2199* a *Smlt2200*. Nejvíce podobnosti na proteinové úrovni sdílí s *AdeAB* efluxním systémem *Acinetobacter baumannii*. *SmeZ* pravděpodobně souvisí s rezistencí k aminoglykosidům (CROSSMAN *et al.* 2008, VILA a MARTINEZ 2008).

*SmeK* je součástí *SmeJKL* systému, který se na proteinové úrovni nejvíce podobá *MtdABC* transportéru *E. coli*. Produkty genů *smeJK* nejspíše nejsou schopné fungovat odděleně, a porušení genu *smeJ* a/nebo *smeK*, vede k mírnému zvýšení citlivosti k tetracyklinu (CROSSMAN *et al.* 2008).

### 2.3.2 *CHRYSEOBACTERIUM SP.*

*Chryseobacterium* sp. (původně *Flavobacterium*) patří mezi nefermentativní, aerobní, nesporulující gramnegativní bakterie. Taxonomicky se řadí do kmene *Bacteroidetes*, třídy *Flavobacteria*. *Chryseobacterium* sp. je často izolováno z půdy, vody i potravinářských výrobků jako jsou masné a mléčné výrobky a zelenina (BERNARDET *et al.* 2006).

*Chryseobacterium* sp. se v současnosti stává i důležitým oportunním patogenem, který infikuje převážně novorozence a imunokompromitované osoby (KIRBY *et al.* 2004). Z klinického hlediska mohou být některé kmeny považovány za příčinu meningitid, pneumonií, bakteriemií a kožních onemocnění (BLOCH *et al.* 1997). V současnosti je diskutována také možnost využití některých druhů *Chryseobacterium* při čištění znečištěného prostředí nebo aplikace některých specifických enzymů produkovaných *Chryseobacterium* v biotechnologiích (BERNARDET *et al.* 2006).

#### 2.3.2.1 Rezistence u *Chryseobacterium* sp.

Rezistence k různým antibiotikům je u *Chryseobacterium* sp. poměrně rozšířena, popsána byla přirozená rezistence k aminoglykosidům, chloramfenikolu, většině  $\beta$ -laktamů a polymyxinům. Dále byly popsány kmeny rezistentní ke karbapenemům, tetracyklinům a erytromycinu (CHANG *et al.* 1997, ROSSOLINI *et al.* 1998, ROSSOLINI *et al.* 1999).

Při studii klinických izolátů v roce 2005, bylo 88% izolátů *Chryseobacterium* rezistentních k tetracyklinu (SADER a JONES 2005). Jediná determinanta rezistence k tetracyklinu popsána u rodu *Chryseobacterium* byla efluxní pumpa Tet(A) (ROBERTS 2010c).

## 2.4 REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM U GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ

Vzhledem k rozdílům ve stavbě membrány u grampozitivních a gramnegativních bakterií, hlavně přítomnost/nepřítomnost vnější membrány, je rozdílná i jejich citlivost k antibiotikům. Grampozitivní bakterie jsou citlivější k lipofilním penicilinům, erytromycinu, fluorochinolonům a chinolonům (VAARA 1993). Podobně jako u gramnegativních bakterií je i u grampozitivních bakterií rezistence k více třídám antibiotik spojena s přítomností MDR pump. Tyto pumpy mohou být tvořené pouze jedním proteinem, který je dostačující k efluxní funkci (ZGURSKAYA a NIKAIDO 2000).

Mezi grampozitivní bakterie patří velmi důležitými patogeny, zejména *Staphylococcus aureus*, koaguláza negativní stafylokoky nebo enterokoky, a rezistence k antibiotikům je u nich stále rozšířenější.

### 2.4.1 ARTHROBACTER SP.

*Arthrobacter* sp. je nefermentující, koryneformní bakterie, která je často izolována z půdy, vody a extrémních stanovišť. Vlastností tohoto rodu je vysoký obsah G+C párů a intenzivní sekundární metabolismus. Taxonomicky patří do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*. Rod *Arthrobacter* je asporogenní, netvoří mycelia a jeho zástupci jsou schopni degradovat mnoho různých substrátů (například chlorokatechol, některé herbicidy a pesticidy) a jsou rezistentní k velkému množství těžkých kovů (TIEDJE *et al.* 1969, ROBERTS *et al.* 1987, PIPKE a AMRHEIN 1988, FOGARTY a TUOVINEN 1991, MARGESIN a SCHINNER 1997). V současné době jsou někteří zástupci rodu považováni za oportunní patogeny člověka. V klinickém prostředí byl izolován z krve a moči pacientů, v některých případech endoftalmitidy a poševních zánětů (FUNKE *et al.* 1996, BURTON *et al.* 2003).

#### 2.4.1.1 Rezistence u *Arthrobacter* sp.

Rezistence u rodu *Arthrobacter* není, vzhledem k tomu, že se jedná spíše o půdní mikroorganismus, zcela zmapována. Někteří zástupci rodu *Arthrobacter* se řadí mezi



producenty erytromycinu a k tomuto antibiotiku jsou tedy přirozeně rezistentní. Dále byly izolovány kmeny rezistentní k linkosamidům, nalidixové kyselině, rifampicinu a cefalosporinům (ROBERTS *et al.* 1985, QUIROS *et al.* 1988, ZHANG a XU 1993, FUNKE *et al.* 1998, GUPTA *et al.* 2004).

Při studiu klinických izolátů rodu *Arthrobacter* a jejich rezistenci k tetracyklinu a dalším antibiotikům, byla minimální inhibiční koncentrace (MIC) tetracyklinu u většiny izolátů nižší než hraniční bod stanovený CSLI (Clinical and Laboratory Standard Institute). Pouze u dvou izolátů byla MIC tetracyklinu stanovena na 16 µg/ml (FUNKE *et al.* 1996). Podobně i ve studiích environmentálních izolátů byly identifikovány spíše kmeny senzitivní k tetracyklinům (GUPTA *et al.* 2004, BAFANA *et al.* 2010).

U rodu *Arthrobacter* byl popsán výskyt determinant rezistence k tetracyklinu *tet(M)*, patřící mezi geny pro RPP, a *tet(33)*. Determinanta *tet(33)*, kódující efluxní pumpu, byla identifikována u izolátů z chovu prasat v Dánsku. U těchto izolátů byl přítomen mobilní element s integronem I. třídy a determinantou *tet(33)* (AGERSO a SANDVANG 2005, ROBERTS 2010b).

#### 2.4.2 STAPHYLOCOCCUS SP.

*Staphylococcus* sp. patří mezi fakultativně anaerobní, grampozitivní bakterie s nízkým obsahem G+C párů. Taxonomicky se řadí do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*. Běžně je součástí kožní mikroflóry, někteří zástupci rodu patří mezi oportunní patogeny a mohou způsobovat abscesy, endokarditidy, septikémie, syndrom toxického šoku a pneumonie (DIEKEMA *et al.* 2001).

Tento rod lze rozdělit na koaguláza pozitivní stafylokoky, zástupcem *S. aureus*, a koaguláza negativní stafylokoky, zástupcem *S. epidermidis*.

##### 2.4.2.1 Rezistence u *Staphylococcus* sp.

Zástupci rodu *Staphylococcus* často nesou mobilní elementy, hlavně plazmidy a transpozony, s geny rezistence. Ty mohou být u rodu *Staphylococcus* získávány horizontálním nebo vertikálním přenosem. Častým mechanismem rezistence je snižování intracelulární koncentrace efluxními proteiny – specifickými i MDR

pumpami. U rodu *Staphylococcus* byly popsány pumpy podílející se na rezistenci k antibiotikům z rodiny ABC, MF, MATE a SMR (HASSAN *et al.* 2007).

Velkým problémem jsou v současnosti stafylokokové rezistentní k methicilinu (MR). Jejich výskyt je prokázán u klinických izolátů i izolátů z domácích zvířat. V nemocničním prostředí jsou izoláty MR často rezistentní k dalším třídám antibiotik – aminoglykosidům, tetracyklinům, makrolidům a fluorochinolonům. Podobný profil rezistence mají i izoláty z domácích zvířat (AARESTRUP *et al.* 2000a, MORRIS *et al.* 2006).

U stafylokoků byly identifikovány determinanty rezistence k tetracyklinu *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(U)*, *tet(S)*, *tet(38)*, *tet(42)* (ROBERTS 2010a).

#### 2.4.2.1.1 *QacA* a *QacB*

Determinanta *qacA* kóduje první popsanou MDR pumpu, a společně s *qacB* jsou často nesené na plazmidu. Transportéry *QacA* a *QacB* jsou spojovány s rezistencí k antibiotikům a dalším antimikrobiálním sloučeninám (například k ethidiu, safraninu) (LEELAPORN *et al.* 1994, MITCHELL *et al.* 1998, BROWN a SKURRAY 2001). Tyto determinanty jsou časté u stafylokoků rezistentních k methicilinu (MAYER *et al.* 2001). Exprese *qacA*, *qacB* je pod kontrolou represoru *QacR* patřícího do rodiny TetR represorů (GRKOVIC *et al.* 1998).

#### 2.4.2.1.2 *NorA*

Determinanta *norA* je lokalizována na chromozomu a kóduje transportér, který je spojován s rezistencí k chloramfenikolu, nalidixové kyselině a dalším antibiotikům (UBUKATA *et al.* 1989, NEYFAKH *et al.* 1993).

#### 2.4.2.1.3 *Tet(K)* a *Tet(L)*

Determinanta *tet(K)* (a blíže příbuzná *tet(L)*) kóduje 50, 7 kDa velký protein, jehož funkcí je antiport tetracyklinu v komplexu s dvoumocným kovem a protonu (YAMAGUCHI *et al.* 1995). Tento mechanismus rezistence je podobný mechanismu Tet pump u gramnegativních bakterií, s tím rozdílem, že u *Tet(K)* a *Tet(L)* je antiport

elektrogenní. Lze tedy předpokládat, že množství translokovaných protonů a molekul tetracyklinu není v poměru 1:1. Proteiny Tet(K) a Tet(L) patří do nadrodiny transportérů MF a jsou tedy tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem, který křížuje membránu (YAMAGUCHI *et al.* 1995, PAULSEN *et al.* 1996a, GINN *et al.* 1997). U stafylokoků je determinanta *tet(K)* považována za původní a byla identifikována u klinických izolátů, izolátů koaguláza pozitivních i koaguláza negativních stafylokoků z domácích zvířat a stafylokoků u volně žijících hlodavců a hmyzožravců (SCHWARZ *et al.* 1998, SCHMITZ *et al.* 2001, HAUSCHILD *et al.* 2003).

Expresí genů *tet(K)* a *tet(L)* je pravděpodobně kontrolována atenuací, ale při studiu transkripčního regulonu *mgrA* byl zjištěn vliv na expresi *tet(K)* a tedy další možnost regulace (SCHWARZ *et al.* 1992, LUONG *et al.* 2006).

#### 2.4.2.1.4 Tet(38)

Determinanta *tet(38)* kóduje efluxní pumpu, která je spojována s rezistencí k tetracyklinu. S transportéry tetracyklinu Tet(K) a Tet(L) sdílí 46% respektive 45% sekvenční identitu na aminokyselinové úrovni. Expresí chromozomální determinanty *tet(38)* je pod kontrolou MgrA represoru, který kontroluje i expresi *norA* transportéru (TRUONG-BOLDUC *et al.* 2005).

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 BAKTERIÁLNÍ KMENY

Studované půdní izoláty získané z Ústavu půdní biologie v Českých Budějovicích, Biologické centrum AV ČR, v. v. i.:

- *Arthrobacter sp.*<sup>2</sup> AR
- *Chryseobacterium sp.*<sup>1</sup> CHR1
- *Chryseobacterium sp.*<sup>3</sup> CHR2
- *Chryseobacterium sp.*<sup>3</sup> CHR3
- *Chryseobacterium sp.*<sup>3</sup> CHR4
- *Chryseobacterium sp.*<sup>3</sup> CHR5
- *Chryseobacterium sp.*<sup>3</sup> CHR6
- *Staphylococcus sp.*<sup>3</sup> SP1
- *Staphylococcus sp.*<sup>2</sup> SP2
- *Stenotrophomonas sp.*<sup>1</sup> ST1
- *Stenotrophomonas sp.*<sup>1</sup> ST2
- *Stenotrophomonas sp.*<sup>2</sup> ST3

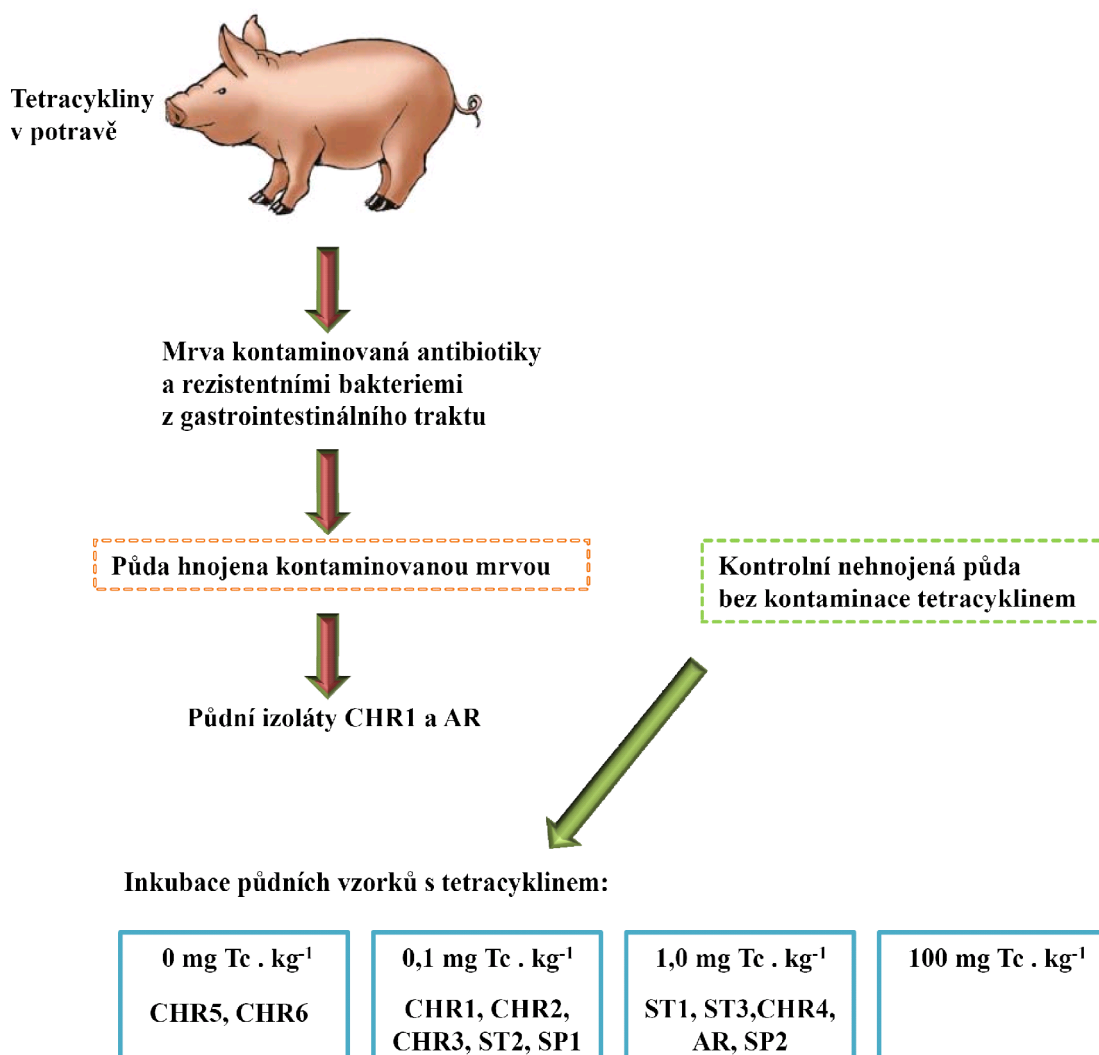
Tyto půdní izoláty pocházejí z cyklicky hnojené luční půdy a kontrolní nehnojené půdy ze stejné lokality (**Obr. 14**). Půda byla hnojena 30 let dvakrát ročně mrvou z velkovýkrmny prasat, kde byly na subterapeutické i terapeutické úrovni využívány chlortetracyklin a doxycyklin. Získané vzorky půdy byly poté inkubovány s různou koncentrací tetracyklinu (0; 0,1; 1,0 a 100 mg Tc . kg<sup>-1</sup> suché půdy) za stabilních kultivačních podmínek po dobu 2, 7 a 14 dní. (ELHOTTOVÁ, osobní sdělení).

<sup>1</sup> Kmeny získané 11/2007

<sup>2</sup> Kmeny získané 11/2009

<sup>3</sup> Kmeny získané 1/2010

Všechny půdní izoláty byly předběžně druhově zařazeny na základě profilu mastných kyselin (MIS Sherlock System) na Ústavu půdní biologie. Toto zařazení bylo poté ověřeno sekvenací 16S rRNA (primery srna, **Kap. 3.1.3**). Podle sekvencí 16S rRNA byly izoláty CHR1-CHR6 určeny jako příslušníci rodu *Chryseobacterium*, informace však byla nedostačující pro přesnou determinaci do druhu. Izoláty ST1 a ST2 byly podle sekvencí určeny jako příslušníci rodu *Stenotrophomonas*, druh *Stenotrophomonas maltophilia*.



**Obr. 14: Původ studovaných půdních izolátů.** Studované půdní izoláty pocházejí z hnojené a nehnojené půdy, která byla při laboratorním pokusu inkubována s různou koncentrací tetracyklinu po různě dlouhou dobu.

(Zdroj obrázku [www.exploringnature.org](http://www.exploringnature.org))

Kompetentní buňky:

- *Escherichia coli* DH5α (*deoR endA1 gyrA96 hsd R17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) *recA1 relA1 supE44 thi-1* (*lac ZYA-arg F*)*U169 φ80lacZ M15 F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup>*) (CLONTECH)
- *Escherichia coli* TransformMax EPI300 *F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL (Str<sup>R</sup>) nupG trfA dhfr* (EPICENTRE)

Další použité kmeny:

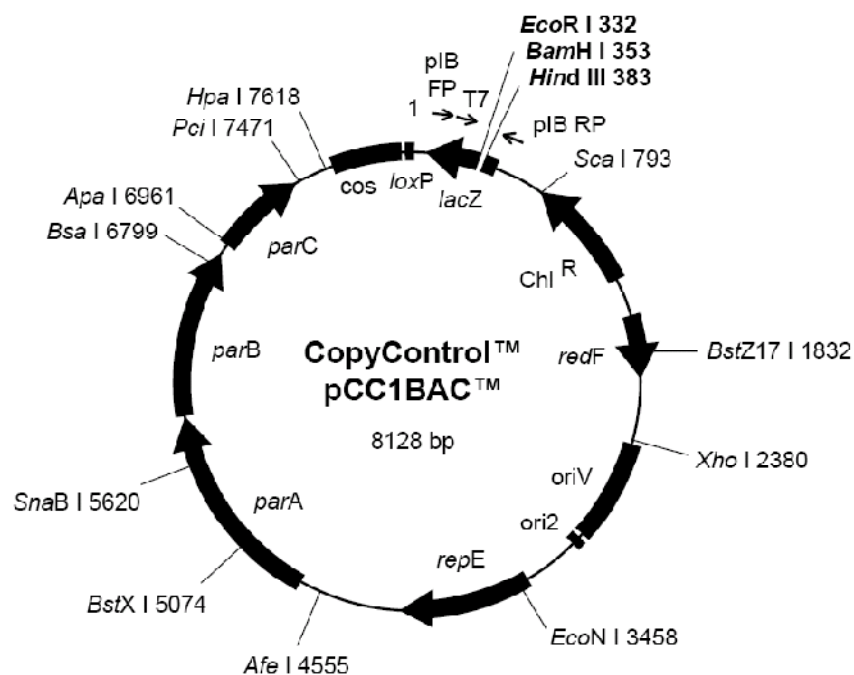
- *Bacillus subtilis* 168 Rif<sup>R</sup> – recipient při konjugaci, rezistentní k rifampicinu (izolován v průběhu diplomové práce)
- *Escherichia coli* K-12 Rif<sup>R</sup>- recipient při konjugaci, rezistentní k rifampicinu (izolován v průběhu diplomové práce)
- *Escherichia coli* 4 – klinický izolát, pozitivní kontrola při amplifikaci tetAC primery (zapůjčen z Ústavu půdní biologie)
- *S. maltophilia* 4 – půdní izolát, REP typizace (zapůjčen z Ústavu půdní biologie AVČR)
- *S. maltophilia* 22 – půdní izolát, REP typizace (zapůjčen z Ústavu půdní biologie AVČR)

### 3.1.2 PLAZMIDY

#### pCC1BAC (EPICENTRE)

Vektor pCC1BAC byl využíván při vytváření DNA knihovny (**Obr. 15**). Tento vektor o velikosti 8128 bp má 2 počátky replikace - vysokokopiový oriV a nízkokopiový ori2 (replikon F-plazmidu). K iniciaci replikace z vysokopiového oriV je vyžadován produkt genu *trfA*. Inducibilní gen *trfA* kódují kompetentní *E. coli* TransformMax EPI300 (**Kap. 3.1.1**).

Tento vektor nese rezistenci k chloramfenikolu jako selekční marker a silný T7 promotor vedle klonovacího místa. Vektor lze štípat Cre rekombinázou v *loxP* místě.



**Obr. 15: Vektor pCC1BAC.**

### 3.1.3 PRIMERY PRO PCR

Název primerů	Sekvence primerů	Tm (°C)	Předpokládaná délka produktu (bp)
700-FW	5'- GTGCTGGCGTTGCCGCTGGCCGA – 3'	66	700
700-RV	5'- GTCGCCCACGTGCACGTGGCCC– 3'	66	
Kin-FW	5'- CATGAAGCTTTGACCTACKCGCC – 3'	57,1-58,8	3500
Kin-RV	5'- TCGTAGATCTCTGCGCKWCGATCC – 3'	59,1-60,8	
OTR-FW	5'- GGCATYCTGGCCCACGT – 3'	51,9-54,3	212
OTR-RV	5'- CCCGGGGTGTCGTASAGG – 3'	57,2	
Pep-FW	5'- CACGCCAAKYTCCTTC – 3'	43,4-48,5	2500
Pep-RV	5'- TGGTGKCTTCAKCGCC – 3'	45,9-51,1	
Smal4	5'- GGTAGTGCCGGCCGCT – 3'	53,6	-
srnaAF	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'	51,8	1500

srnaFR	5'- ACGAGCTGACGACAGCCATG – 3'	55,9	
srnaHR	5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA – 3'	55,9	1000
EP1-FW	5'- GTGCCGCTGTCGCTGGCC – 3'	59,4	250
EP1-RV	5'- GAACACCGCCACCAGCGA – 3'	54,9	
EP3-FW	5'- GCCGCGCTGTAYGARAGCTG – 3'	55,9-60	250
EP3-RV	5'- GAGGTCATCACGATCGGGCGCA – 3'	60,4	
tet30-FW	5'- CATCTTGGTCGAGGTGACTGG – 3'	56,3	210
tet30-RV	5'- ACGAGCACCCAGCCGAGC – 3'	57,2	
tet34-FW	5'- ATGAAAACGAACGCTAATTAACCA – 3'	50,6	205
tet34-RV	5'- ACATAGAGATCGATGCTAGTACTA – 3'	52,3	
tetA-FW	5'- GCGCGATCTGGTTCACTCG – 3'	55,4	164
tetA-RV	5'- AGTCGACAGYRGC GCCGGC – 3'	57,6-61,9	
tetB/P-FW	5'- AAAACTTATTATATTATAGTG – 3'	38,7	169
tetB/P-RV	5'- TGGAGTATCAATAATATTCAC – 3'	41,5	
tetB-FW	5'- TACGTGAATTTATTGCTTCGG – 3'	48,5	206
tetB-RV	5'- ATACAGCATCCAAAGCGCAC – 3'	51,8	
tetC-FW	5'- GCGGGATATCGTCCATTCCG – 3'	55,9	207
tetC-RV	5'- GCGTAGAGGATCCACAGGACG – 3'	58,3	
tetD-FW	5'- GGAATATCTCCCGGAAGCGG – 3'	55,9	187
tetD-RV	5'- CACATTGGACAGTGCCAGCAG – 3'	56,3	
tetE-FW	5'- GTTATTACGGGAGTTTGTGG – 3'	50,5	199
tetE-RV	5'- AATACAACACCCACACTACGC – 3'	52,4	
tetG-FW	5'- GCAGAGCAGGTCGCTGG – 3'	54,3	134
tetG-RV	5'- CCYGCAAGAGAAGCCAGAAG – 3'	53,8-55,9	
tetH-FW	5'- CAGTGAAAATTCACTGGCAAC – 3'	50,5	185
tetH-RV	5'- ATCCAAAGTGTGGTTGAGAAT – 3'	48,5	
tetJ-FW	5'- CGAAAACAGACTCGCCAATC – 3'	51,8	184



tetJ-RV	5'- TCCATAATGAGGTGGGGC – 3'	50,3	
tetK-FW	5'- TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC – 3'	51,8	800
tetK-RV	5'- GCAAACCTCATTCCAGAAGCA – 3'	49,7	
tetL-FW	5'- CATTGGTCTTATTGGATCG – 3'	47,7	456
tetL-RV	5'- ATTACACTTCCGATTCGG – 3'	46,8	
tetM-FW	5'- ACAGAAAGCTTATTATATAAC – 3'	42,6	171
tetM-RV	5'- TGGCGTGTCTATGATGTTTAC – 3'	52,4	
tetO-FW	5'- ACGGARAGTTTATTGTATAACC – 3'	46,5-48,5	171
tetO-RV	5'- TGGCGTATCTATAATGTTGAC – 3'	48,5	
tetQ-FW	5'- AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG – 3'	52,4	169
tetQ-RV	5'- GGAGTGTCAATGATATTGCA – 3'	47,7	
tetS-FW	5'- GAAAGCTTACTATACAGTAGC – 3'	48,5	169
tetS-RV	5'- AGGAGTATCTACAATATTAC – 3'	44,6	
tetT-FW	5'- AAGGTTTATTATATAAAAGTG – 3'	40,7	169
tetT-RV	5'- AGGTGTATCTATGATATTAC – 3'	44,6	
tetW-FW	5'- GAGAGCCTGCTATATGCCAGC – 3'	56,3	168
tetW-RV	5'- GGGCGTATCCACAATGTTAAC – 3'	52,4	
tetX-FW	5'- CAATAATTGGTGGTGGACCC – 3'	51,8	468
tetX-RV	5'- TTCTTACCTTGGACATCCCG – 3'	51,8	
tetY-FW	5'- ATTTGTACCGGCAGAGCAAAC – 3'	52,4	181
tetY-RV	5'- GGCGCTGCCGCCATTATGC – 3'	57,6	
tetZ-FW	5'- CCTTCTCGACCAGGTCGG – 3'	54,9	204
tetZ-RV	5'- ACCCACAGCGTGTCCGTC – 3'	54,9	

### 3.1.4 ENZYMY A PROTILÁTKY

<b>Název</b>	<b>Výrobce</b>
Anti-DIG-AP	ROCHE
BclI	FERMENTAS
BglII	FERMENTAS
Klenow fragment	FERMENTAS
KpnI	FERMENTAS
Proteináza K	SIGMA
PsuI	FERMENTAS
Rnáza	SIGMA
Sall	FERMENTAS
T4 ligáza	FERMENTAS
Taq DNA polymeráza	FERMENTAS
Nhe I	FERMENTAS
Lysozym	FLUKA

### 3.1.5 STANDARDY MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ DNA

<b>Název</b>	<b>Výrobce</b>
Lambda DNA/ <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III Marker	FERMENTAS
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	FERMENTAS
GeneRuler	FERMENTAS

### 3.1.6 KOMERČNÍ SADY

- **MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit (EPICENTRE)**
  - izolace chromozomální DNA
- **Genomic DNA Purification Kit (FERMENTAS)**
  - izolace chromozomální DNA
- **DNA Extraction Kit (FERMENTAS)**
  - izolace DNA z agarózového gelu, přečištění DNA
- **CopyControl BAC Cloning Kit (EPICENTRE)**
  - knihovna DNA

Při používání komerčních sad bylo postupováno podle návodů dodaných výrobcem.

### 3.1.7 ANTIBIOTIKA

Název antibiotika	Použitá zkratka	Zásobní roztok	Výrobce
Rifampicin	Rif	10 mg/ml (methanol)	FLUKA
Spektinomycin	Spc	50 mg/ml	SERVA
Tetracyklin hydrochlorid	Tet	12,5 mg/ml (ethanol)	FLUKA
Chloramfenikol	Cam	34 mg/ml (ethanol)	ROTH
Streptomycin	Str	300 mg/ml	GALENIKA
Nalidixová kyselina	Nal	30 mg/ml (300 mM NaOH)	SIGMA
Ampicilin	Amp	100 mg/ml	SERVA
Kanamycin	Kan	30 mg/ml	SIGMA
Erytromycin	Ery	9 mg/ml	FLUKA

Vodné roztoky byly sterilizovány filtrací. Všechny zásobní roztoky byly uchovávány ve 20°C.

### 3.1.8 CHEMIKÁLIE

Název	Výrobce
Agar	ROTH
Agar	OXOID
Agaróza	SIGMA
Amonium acetát	PENTA
Bacto Tryptic Soy Broth	BD
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát p-toluidinová sůl)	SIGMA
Chlorid draselný	LACHEMA
Chloroform	SIGMA
Citronan sodný	LACHEMA
DMSO	MERCK
dNTP mix	FERMENTAS
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	LACHEMA
Ethanol	LACHEMA
Ethidium bromid	SIGMA
Fikol	SIGMA
Glukosa	MERCK
Glycerol	SIGMA
HCl	LACHEMA
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin – N'-[-ethansulfonová kyselina])	SIGMA
Hydroxid sodný	BDH
IPTG (Izopropyl-β-thiogalaktopyranozid)	SERVA
Izopropanol	LACHEMA
Kasein	FLUKA
Kyselina maleinová	ROTH

Ledová kyselina octová	LACHEMA
LiCl	BDH
NaCl	PENTA
NaOH	BDH
NBT (Nitroblue tetrazolium)	SIGMA
N-laurylsarcosin sodná sůl	SIGMA
Octan sodný	LACHEMA
Polyethylen glykol 8000	SIGMA
Polyvinylpyrrolidon	SIGMA
Sacharóza	PENTA
Salmon sperm DNA	SIGMA
SDS (dodecylsulfát sodný)	SIGMA
Sephadex G-50	PHARMACIA
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	SIGMA
Tween 20	SIGMA
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid)	FERMENTAS
Na <sub>2</sub> EDTA	LACHEMA
Bromfenolová modř	SIGMA
Xylen cyanol	MERCK

### 3.1.9 KULTIVAČNÍ MEDIA

Ke kultivaci bakteriálních kultur byla používána pevná a tekutá média. Média byla sterilizována v autoklávu při 120 °C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa po dobu 20 minut. Před sterilizací byl přidáván agar na konečnou koncentraci 2 % (w/v).

### **3.1.9.1 KOMPLEXNÍ MEDIA**

#### **LB (Luria-Bertani) medium**

10 g tryptonu

5 g kvasničného autolyzátu

10 g NaCl

dH<sub>2</sub>O

Rozpuštěno v destilované vodě.

pH upraveno na 7,0 pomocí 1 M NaOH.

Doplněno na objem 1 litr.

#### **Sojové medium**

7,5 g Bacto Tryptic Soy Broth

5 g agaru

dH<sub>2</sub>O

Rozpuštěno v destilované vodě.

Doplněno na objem 250 ml.

Přidáno příslušné antibiotikum v potřebné koncentraci.

### *3.1.10 ROZTOKY*

#### **3.1.10.1 TE PUFER**

1 M Tris – pH 8

0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA – pH 8

dH<sub>2</sub>O

Sterilizováno v autoklávu.

### 3.1.10.2 ROZTOKY PRO HORIZONTÁLNÍ GELOVOU ELEKTROFORÉZU

#### **50x TAE**

36,3 g Tris

8,57 ml ledové kyseliny octové

Doplněno destilovanou vodou na objem 135 ml.

Smícháno s 15 ml 0,5 M EDTA.

#### **Nanášecí pufr**

0,25 % (w/v) bromfenolová modř

0,25 % (w/v) xylen cyanol

30 % (w/v) glycerol

Uchováváno při 4 °C.

### 3.1.10.3 ROZTOKY PRO PULZNÍ ELEKTROFORÉZU

#### **HE pufr**

10 mM HEPES – pH 8

1 mM EDTA

#### **HES pufr**

25 mM HEPES – pH 8

25 mM EDTA

0,3 M sacharosa

#### **HEPES pufr**

16 mM HEPES – pH 7,5

16 mM octan sodný

0,8 mM EDTA

### **Proteináza K**

100 mM EDTA – pH 8

1 mg/ml proteinázy K

### **3.1.10.4 ROZTOKY PRO IZOLACI PLAZMIDOVÉ DNA**

#### **Roztok I**

50 mM glukosa

10 mM EDTA

10 mM Tris

#### **Roztok II**

0,2 M NaOH

1% SDS

#### **Amonium acetát**

7,5 M amonium acetát

#### **Roztok III**

30 % polyethylen glykol 8000

1,5 M NaCl

### **3.1.10.5 ROZTOKY PRO SOUTHERN BLOTTING**

#### **Denaturační roztok**

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

#### **Neutralizační roztok**

1,5 M NaCl

0,5 M Tris

Upraveno na pH 7.



**HCl**

0,25 M HCl

**20x SSC**

3 M NaCl

0,3 M citronan sodný

dH<sub>2</sub>O

Upraveno na pH 7.

**3.1.10.6 ROZTOKY PRO HYBRIDIZACI****100 x Denhartův roztok**

2% fíkol

2% polyvinylpyrrolidon

dH<sub>2</sub>O

Sterilizace filtrací.

Uchováváno při -20 °C.

**Prehybridizační roztok**

5x SSC

5x Denhartův roztok – přidán před hybridizací

0,1% N-lauroylsarcosin

0,2% SDS

1% BSA

dH<sub>2</sub>O

**Hybridizační roztok**

5x SSC

0,1% N-lauroylsarcosin

0,2% SDS

1% Salmon sperm DNA – přidáno před hybridizací

dH<sub>2</sub>O

### **Nízkostringentní roztok I**

2x SSC

0,1% SDS

dH<sub>2</sub>O

### **Nízkostringentní roztok II**

0,2x SSC

0,1% SDS

dH<sub>2</sub>O

## **3.1.10.7 ROZTOKY PRO CHROMOGENNÍ DETEKCI**

### **Maleinový pufr**

0,1 M kyselina maleinová

0,15 M NaCl

dH<sub>2</sub>O

Upraveno na pH 7,5.

### **Promývací pufr**

0,3% Tween 20

Maleinový pufr

### **Blokační roztok**

1% kasein

Maleinový pufr

### **Roztok protilátky**

1: 5000 Anti-Dig-AP – centrifugace 5 minut

Blokační roztok

### **Detekční pufr**

0,1 M Tris

0,1 M NaCl

dH<sub>2</sub>O

Upraveno na pH 9,5

### **NBT/BCIP**

0,1 ml zásobního roztoku NBT/BCIP

10 ml detekčního pufru

Zásobní roztok:

**BCIP** 9,4 mg/ml rozpuštěno v 67% DMSO

**NBT** 18,75 mg/ml rozpuštěno ve 100% DMSO

## **3.1.10.8 ROZTOK SEPHADEX PRO GELOVOU FILTRACI**

### **Sephadex G-50**

10% (w/v) Sephadex G-50 v TE pufru

Sterilizováno v autoklávu.

Odstraněn přebytečný pufr a přidán čerstvý sterilní TE pufr.

Uchováváno ve 4°C.

### *3.1.11 INTERNETOVÉ DATABÁZE A PROGRAMY*

- **Chromas** (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)
  - vyhodnocování výsledků sekvenační analýzy
- **Melting Temperature Calculator**  
([http://www.biophp.org/minitools/melting\\_temperature/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php))
  - stanovení teplot tání primerů
- **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
  - analýza sekvencí

- **EMBL-EBI** (<http://www.ebi.ac.uk>)
  - analýza sekvencí
- **Antibiotic Resistance Gene Database** (<http://ardb.cccb.umd.edu>)
  - porovnání sekvencí genů rezistence

### *3.1.12 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ VYBAVENÍ*

#### **Kultivační zařízení**

- Termostat (MEMMERT)
- Vzdušná třepačka NB-205 (N-BIOTEK)

#### **Centrifugy**

- MiniSpin (EPPENDORF)
- Mikro 20 (HETTICH)
- Centra CL3R (IEC)
- Mikro 22R (HETTICH)

#### **Ostatní**

- PCR cycler (VWR Doppio)
- PCR cycler MasterCycler (EPPENDORF)
- Elektroporátor Gene Pulser (BIO-RAD)
- Fotoaparát SP-565UZ (OLYMPUS)
- pHmetr Orion 2 Star (THERMO)
- Spektrofotometr DU530 (BECKMAN)

## 3.2 METODIKA

### 3.2.1 PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ KULTUROU

#### 3.2.1.1 KULTIVACE NA PEVNÉM MEDIU

Půdní izoláty byly kultivovány na pevných agarových půdách v Petriho miskách s přídavkem tetracyklinu v termostatu při teplotě 28°C. Kmeny *B. subtilis* a *E. coli* byly kultivovány na pevných agarových půdách v Petriho miskách v termostatu při teplotě 37°C.

#### 3.2.1.2 KULTIVACE V TEKUTÉM MEDIU

Při kultivaci v tekutém mediu byly bakterie kultivovány v Erlenmeyerových baňkách. Objem kultur byl vždy udržován pod hodnotou 1/10 objemu kultivační baňky, aby bylo dosaženo dobré aerace. Kultury byly pěstovány při 37 °C a třepány s frekvencí 210 otáček za minutu (dále uváděno jako standardní podmínky). Při kultivaci byla používána vodní a vzdušná třepací zařízení.

#### 3.2.1.3 UCHOVÁVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

Pro dlouhodobé uchovávání byl k bakteriální kultuře přidáván glycerol na konečnou koncentraci 20% (v/v). Kultura v glycerolu byla 15 minut inkubována na ledu a poté umístěna do -70°C.

#### 3.2.1.4 RAZÍTKOVÁNÍ KOLONIÍ

Na raznici, která má stejný rozměr jako Petriho miska, byla přiložena sterilní sametka a přitlačena miska s bakteriální kulturou. Na tuto sametku byla poté přitlačena nová prázdná miska s pevným mediem a takto byly bakteriální kolonie přeneseny ve shodném uspořádání.

### 3.2.1.5 E-TEST (AB bioMérieux)

Bylo postupováno podle protokolu dodaného výrobcem (AB bioMérieux, Solna, Švédsko).

Proužek E-testu byl aplikován na pevnou agarovou půdu s inokulem tak, aby celou plochou celou plochou přiléhal k médiu. Po 24 hodinové inkubaci v optimální teplotě v termostatu byla odečtena hodnota MIC tetracyklinu.

### 3.2.1.6 AGAROVÁ DILUČNÍ METODA

Do řady Petriho misek byly nality agarové půdy s různou koncentrací tetracyklinu. Na tyto půdy byly naočkovány bakteriální kultury a po inkubaci byl odečítán růst. Pevná agarová půda, kde nebyl pozorován růst ve formě uzavřené kolonie, obsahovala minimální inhibiční koncentraci antibiotika.

### 3.2.1.7 PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK *ESCHERICHIA COLI* NA ELEKTROPORACI

1. *E. coli* DH5 $\alpha$  (**Kap. 3.1.1**) zaočkované do tekutého LB média kultivovány za standardních podmínek přes noc (**Kap. 3.2.1.2**).
2. Noční kulturou zaočkováno 250 ml vytemperovaného tekutého LB média na OD<sub>600</sub> = 0,1.
3. Kultura kultivována za standardních podmínek do doby, než OD<sub>600</sub> kultury dosáhla hodnoty 0,7-0,9 a zchlazena 10-35 minut na ledu.
4. Kultura centrifugována 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
5. Další kroky rovněž prováděny za důsledného chlazení.
6. Pelet důkladně resuspendován v 50 ml ledové deionizované vody s použitím vortexu.
7. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
8. Pelet důkladně resuspendován ve 25 ml ledové deionizované vody s použitím vortexu.
9. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.

10. Pelet důkladně resuspendován v 50 ml ledového 10 % glycerolu ředěného deionizovanou vodou s použitím vortexu.
11. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
12. Pelet důkladně resuspendován ve 20 ml ledového 10 % glycerolu ředěného deionizovanou vodou s použitím vortexu.
13. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
14. Pelet důkladně resuspendován v 2 ml ledového 10 % glycerolu ředěného deionizovanou vodou s použitím vortexu.
15. Suspenze rozdělena do mikrozkušavek po 200 µl a uchovávána v -70 °C.

### **3.2.1.8 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK *ESCHERICHIA COLI***

1. Ve sterilní elektroporační kyvetě (vzdálenost elektrod 2 mm) smícháno 100 µl na ledu rozmražené suspenze kompetentních buněk *E. coli* a 10 µl roztoku DNA.
2. Na elektroporátoru aplikován pulz při kapacitanci 25 µF, napětí 2,5 kV a odporu 200Ω.
3. Ihned po pulzu přidán 1 ml tekutého LB média.
4. Inkubováno 1 hodinu při 37°C.
5. Vyseto na příslušné selekční agarové pevné medium.

### **3.2.2 PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ DNA**

#### **3.2.2.1 IZOLACE DNA**

K izolaci DNA gram pozitivních i gram negativních bakterií byl používán MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit (EPICENTRE) nebo Genomic DNA Purification Kit (FERMENTAS). Při izolaci DNA gram negativních bakterií byl vynecháván krok inkubace s lysozymem. Dále bylo postupováno podle pokynů výrobce.

### **3.2.2.2 VYTVÁŘENÍ LYZÁTŮ Z BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK**

Bakteriální buňky z pevného media byly přeneseny do 500 µl vody a resuspendovány. Tato suspenze byla poté dvakrát zmrazena a rozmrazena, čímž došlo k rozrušení membrány a uvolnění DNA. Při rozmrazování byla suspenze intenzivně vortexována.

### **3.2.2.3 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA**

Izolace plazmidů byla prováděna upravenou metodou alkalické lyze dle (HERINGA *et al.* 2007).

1. Buňky resuspendovány ve 100µl roztoku I.
2. Přidáno 5-10µl RNázy.
3. Přidáno 200µl čerstvého roztoku II a promícháno.
4. Inkubováno 5 minut při pokojové teplotě.
5. Přidáno 150µl 7,5 M amonium acetátu a 150µl chloroformu a promícháno.
6. Inkubováno 10 minut na ledu.
7. Centrifugováno 10 minut při 18500 x g a 4°C.
8. Supernatant převeden do 200µl roztoku III a promícháno.
9. 15 minut inkubováno na ledu.
10. Centrifugováno 10 minut a supernatant odstraněn.
11. Pelet po vysušení rozpuštěn v TE pufru.

### **3.2.2.4 ČIŠTĚNÍ VZORKU DNA GELOVOU FILTRACÍ**

Tento postup byl používán pro pročištění značené sondy DNA určené k hybridizaci.

1. Do stříkačky utěsněné skelným vláknem přidáno 200 µl sterilní suspenze Sephadexu G-50.
2. Stříkačka vložena do sterilní 15 ml zkumavky.
3. Centrifugováno 2 minuty při 5000 x g
4. Stříkačka přenesena do nové sterilní 15 ml zkumavky.
5. Na Sephadex G-50 nanesen vzorek DNA.



6. Centrifugováno 2 minuty při 5000 x g.
7. Promytá DNA přenesena do 1,5 ml mikrokumavky.

### **3.2.2.5 PRECIPITACE DNA CHLORIDEM LITHNÝM A ETHANOLEM**

Tento postup slouží k přečištění DNA od ostatních složek roztoku, zejména iontů solí.

1. Roztok DNA byl naředěn destilovanou vodou na objem 100  $\mu$ l.
2. Přidáno 10  $\mu$ l 5 M LiCl a 200  $\mu$ l ledového etanolu.
3. Promícháno a umístěno na 1 hodinu do -20 °C.
4. Centrifugováno 10 minut při 4 °C a 22000 x g.
5. Pelet vysušen ve vakuovém exsikátoru.
6. Pelet rozpuštěn ve sterilní vodě a uchováván v -20 °C.

### **3.2.2.6 HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA**

Horizontální agarózová elektroforéza byla využívána ke kontrole výsledků izolace DNA, metody PCR, restrikční analýzy DNA, k odhadu koncentrace molekul DNA ve vzorku a izolaci fragmentů DNA. K vizualizaci byl využíván ethidium bromid, přidáván z 1% zásobního roztoku do tekuté agarózy v poměru 1 : 20 000.

Gely byly připravovány s koncentrací agarózy 1% (w/v). K přípravě gelů i naplnění elektroforetické nádoby byl využíván 1x koncentrovaný TAE pufr. Vzorky DNA byly nanášeny ve vzorkovém pufru s pigmentem umožňujícím sledovat průběh elektroforézy. Při přípravě membrány na hybridizaci bylo používáno stejnosměrné napětí o velikosti 3-4 V/cm, při běžných kontrolách a izolacích DNA bylo používáno stejnosměrné napětí o velikosti 6-7 V/cm.

### **3.2.2.7 PULZNÍ ELEKTROFORÉZA**

1. Buňky odebrané z Petriho misky naředěné na 5 ml a  $OD_{600} = 2$ .
2. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g.
3. Promyto HE puftrem a centrifugováno 10 minut při 3200 x g.
4. K buňkám přidán HES pufr na  $OD_{600}=1$ .

5. K buňkám přidáno stejné množství uvařené 1% agarózy.
6. Buňky s agarózou přeneseny do tvořítka vyhrátého na 37°C a uchovávány v lednici do zatuhnutí.
7. Tvořítka rozebrána a vzorky přeneseny do malé Petriho misky.
8. Přidány 4 ml HES pufru s lysozymem (1 mg/ml) a inkubováno 2 hodiny při 37°C.
9. Dvakrát promyto roztokem 100 mM EDTA a 1% SDS.
10. Přidána čerstvá EDTA, SDS, proteináza K a inkubováno 18 hodin při 50°C.
11. Odstranění roztoku proteinázy K.
12. Přidán HES pufr s 1mM PMSF a inkubováno 1 hodinu při 4°C.
13. Tříkrát promyto 1 hodinu v HE pufru při 4°C.
14. Překryto HE pufrem.
15. Připraveno 200 ml 1% agarózového gelu v HEPES pufru.
16. V aparatuře vychlazen HEPES pufr na 4°C.
17. Po ztuhnutí gelu do jamek vloženy vzorky.
18. Nastavení elektroforézy:
  - 170 mA; 0,1 sekundy, 30 minut
  - 170 mA; 30 sekund, 4 hodiny
  - 170 mA; 15 sekund, 13 hodin
18. Gel obarven ethidium bromidem.

### **3.2.2.8 KONJUGACE NA PEVNÉM MÉDIU**

1. Donor a recipient naočkování v poměru 1:1 do 1,5 ml tekutého LB media a 200 µl vyseto na Petriho misku s pevným LB mediem.
2. Inkubace 96 hodin při teplotě 28°C.
3. Přidáno 2 ml LB media, buňky převedeny do suspenze a přeneseny do sterilní mikrozkušavky.
4. 100 µl suspenze vyseto na pevné LB medium s tetracyklinem (15 µg/ml) a rifampicinem (50 µg/ml).
5. Po 48-72 hodinách kontrola a přeočkování narostlých kolonií.

### 3.2.2.9 ŠTĚPENÍ DNA RESTRIKČNÍMI ENZYMY

Restrikce DNA probíhala v mikrozkuvkách s následujícím složením reakční směsi:

Složka	Množství
DNA	0,1 – 1 µg
Pufř	2,5 µl
Enzym	5 jednotek
Destilovaná voda	Doplněno na konečný objem 25 µl

Reakční směs byla inkubována 2 –16 hodin při teplotě uvedené výrobcem.

Po skončení restrikce byla restrikční endonukleáza tepelně deaktivována dle pokynů výrobce.

Nakonec byla štěpená DNA precipitována chloridem lithným (**Kap. 3.2.2.5**).

### 3.2.2.10 LIGACE

Ligace DNA probíhala v mikrozkuvkách s následujícím složením reakční směsi:

Složka	Množství
10 x pufr	2 µl
Vektorový plazmid	0,1 – 0,5 µg
Inzerční DNA	Dvojnásobná molární koncentrace vektorové DNA
Ligáza	3 U
Destilovaná voda	Doplněno na konečný objem 10-30 µl

Inkubace probíhala přes noc v termocycleru s nastavením cyklu:

16 °C	50 minut
20 °C	3 minuty
24 °C	5 minut
37 °C	1 minuta

### 3.2.2.11 KNIHOVNA DNA

1. DNA byla naštípána příslušným restrikčním enzymem.  
Reakční směs: 1  $\mu$ l pCC1BAC  
4  $\mu$ l DNA  
81  $\mu$ l deionizované vody
2. Inkubováno 10 minut při 55°C a zchlazeno na laboratorní teplotu.
3. K reakční směsi přidáno: 10  $\mu$ l 10x pufru  
1  $\mu$ l T4 ligázy
4. Ligace (**Kap. 3.2.2.10**) 4 hodiny.
5. Precipitace chloridem lithným (**Kap. 3.2.2.5**) přes noc.
6. Transformace (**Kap. 3.2.1.8**) kompetentních buněk *Escherichia coli* TransformMax EPI300 (**Kap. 3.1.1**).
7. Vyseto na pevné LB medium s chloramfenikolem, IPTG a X-Gal.
8. Po 24 hodinách přerazítkováno (**Kap. 3.2.1.4**) na pevné LB medium s chloramfenikolem.
9. Po 24 hodinách přerazítkováno na pevné sojové medium s tetracyklinem.
10. Po 24-48 hodinách vyhodnoceno.

### 3.2.2.12 SOUTHERN BLOTTING

1. Gel po elektroforéze opláchnut v destilované vodě na kývačce.
2. Depurinace DNA fragmentů 5 minut 10 objemy 0,25M HCl na kývačce.
3. Opláchnutí v destilované vodě.
4. Denaturace 20 minut v 10 objemech denaturačního roztoku na kývačce.
5. Opláchnutí v destilované vodě.
6. Dvakrát promyto 20 minut v deseti objemech neutralizačního roztoku.
7. Přenos DNA na nylonovou membránu kapilární metodou.

Velikost Whatman papírů, membrány, filtračních papírů a papírových utěrek upravena na velikost gelu. U jednotlivých vrstev odstraňovány vzduchové bubliny.

- Na misku s 20x SSC pufrem položeno sklo.
- Na sklo položen filtrační papír s přesahy do 20x SSC pufru.

- Na filtrační papír umístěny 2 Whatman papíry namočené ve 20x SSC pufru.
  - Na Whatman papíry umístěn gel namočen v 20x SSC pufru.
  - Na gel položena nylonová membrána namočená v 5x SSC pufru. Orientace membrány určena ustřížením levého rohu.
  - Na membránu umístěn Whatman papír namočený v 5x SSC pufru.
  - Na Whatman papír položeno 5 suchých filtračních papírů.
  - Na filtrační papíry položena 5-10 cm vrstva suchých papírových utěrek.
  - Zatíženo sklem a 0,5 kg závažím.
8. Blotováno přes noc.
  9. DNA fixována na membránu 3 minuty pomocí UV záření.
  10. Membrána opláchnuta v 2x SSC pufru.
  11. Membrána vysušena mezi dvěma filtračními papíry a skladována zatavená do folie v -20°C.

### 3.2.2.13 NERADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA SONDY

#### 3.2.2.13.1 *Random primed*

1. Vzorčky DNA (300-600 ng) naředěny sterilní vodou na objem 34  $\mu$ l.
2. Denaturace 50 minut ve vodní lázni.
3. Zchlazení 50 minut na ledu.
4. Přidáno: 5  $\mu$ l pufru
  - 4  $\mu$ l 10mM dNTPS
  - 0,7  $\mu$ l DIG-UTP
  - 1  $\mu$ l Klenow fragmentu (5U)
5. Centrifugováno a inkubováno 2 hodiny při 37°C.
6. Inkubováno přes noc při laboratorní teplotě.
7. Reakce zastavena inkubací 10 minut při 65°C.
8. Přečištěno gelovou filtrací (**Kap. 3.2.2.4**).
9. Skladováno při -20°C.

### 3.2.2.13.2 Značení DNA sondy pomocí polymerázové řetězové reakce

#### 1. Složení reakce:

Složka	Množství
DIG-UTP	10 $\mu$ M DIG-U
dNTP mix (10 mM)	1 $\mu$ l
Přímý primer (0,1 mM)	2 $\mu$ l
Reverzní primer (0,1 mM)	2 $\mu$ l
DNA	200 $\mu$ g – 1 $\mu$ g
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 $\mu$ l
Taq polymeráza	1,5 U
Taq pufr (s (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 $\mu$ l
Destilovaná voda	Doplněno na 50 $\mu$ l

2. Promícháno a krátce centrifugováno.

3. Program termocycleru:

Počáteční denaturace	95°C	2 minuty	} 35x
Denaturace	95°C	1 minuta	
Nasedání primerů	T <sub>m</sub> primerů	30 sekund	
Syntéza DNA	72°C	1 minuta/1 kbp	

4. Výsledek zkontrolován na horizontální agarózové elektroforéze.

### 3.2.2.14 KVANTITATIVNÍ VYHODNOCENÍ ZNAČENÍ DNA

Stanovení bylo provedeno metodou "dot blot" podle protokolu "Evaluation of Probe Labeling Efficiency" (ROCHE).

Na nylonovou membránu napipetováno 10  $\mu$ l sondy naředěné v poměru 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000.

1. Fixováno 3 minuty pod UV světlem.
2. Membrána promyta na kývačce 2 minuty v 15 ml promývacího roztoku.
3. Membrána inkubována na kývačce 30 minut v 15 ml blokačního roztoku.
4. Membrána inkubována na kývačce 30 minut v 5 ml roztoku s protilátkou.
5. Membrána promyta dvakrát 15 minut v 15 ml promývacího roztoku.
6. Membrána inkubována 3 minuty v 5 ml detekčního roztoku.
7. Membrána ponořena do 5 ml detekčního roztoku s NBT a BCIP.
8. Inkubace ve tmě přes noc.
9. Reakce ukončena promytím membrány v TE pufru.

### 3.2.2.15 HYBRIDIZACE

Hybridizace byla provedena podle manuálu "Techniques for Hybridization of DIG-labeled probes to a blot" (ROCHE).

1. Membrána s fixovanou DNA (**Kap. 3.2.2.12**) navlhčena roztokem 6x SSC.
2. Membrána umístěna do hybridizační trubice a inkubována 2 hodiny v prehybridizačním roztoku při hybridizační teplotě 70°C.
1. 300-600 ng značené DNA (**Kap. 3.2.2.13**) denaturováno 5 minut při 90°C.
2. Sonda 5 minut zchlazena na ledu.
3. Do 15 ml hybridizačního roztoku přidána sonda a 76  $\mu$ l Salmon sperm DNA.
4. Odstraněn prehybridizační roztok.
5. Do trubice přidán hybridizační roztok se sondou a Salmon sperm DNA.
6. Hybridizace přes noc při hybridizační teplotě.
7. Sonda slita do centrifugační zkumavky a uchovávána v -20°C.

8. Membrána pět minut inkubována při laboratorní teplotě v nízkostringentním roztoku I.
9. Membrána pět minut inkubována při laboratorní teplotě v nízkostringentním roztoku II.
10. Membrána ihned detekována protilátkou.

Hybridizační teplota byla vypočítána dle vzorce:

$$T_m = 16,6 \log [c \text{ Na}^+] + 0,41 (\%G+C) + 81,5$$

$$T_{\text{hyb}} = T_m - 25^\circ\text{C}$$

$c [\text{Na}^+]$  – molární koncentrace sodných iontů v hybridizačním roztoku

$\%G+C$  – procento G a C bazí v sekvenci próby

$T_{\text{hyb}}$  = optimální teplota hybridizace

### **3.2.2.16 CHROMOGENNÍ DETEKCE**

1. Membrána promyta 2 minuty ve 100 ml promývacího roztoku na kývačce.
2. Membrána inkubována 30 minut ve 100 ml blokačního roztoku na kývačce.
3. Membrána inkubována 30 minut v 15 ml roztoku s protilátkou.
4. Membrána promyta dvakrát 15 minut ve 100 ml promývacího roztoku.
5. Membrána inkubována 3 minuty ve 20 ml detekčního pufru.
6. Membrána inkubována ve tmě ve 20 ml detekčního roztoku s NBT a BCIP přes noc.
7. Reakce ukončena promytím v TE pufru.
8. Detekovaná membrána skladována po vysušení ve tmě v  $-20^\circ\text{C}$ .

### **3.2.2.17 ODSTRANĚNÍ NAVÁZANÉ SONDY Z MEMBRÁNY**

1. Membrána ponořena do vroucího 0,5% SDS na 10 minut bez přístupu vzduchu.
2. Membrána ponechána v 0,5% SDS do vychladnutí.
3. Vysušená membrána skladována ve tmě v  $-20^\circ\text{C}$ .



### 3.2.2.18 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

1. Složení reakce:

Složka	Množství
Taq pufr (s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	5 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	4 $\mu\text{l}$
Taq polymeráza	1,5 U
dNTP mix (10 mM)	1 $\mu\text{l}$
DNA	200 $\mu\text{g}$ – 1 $\mu\text{g}$
Přímý primer (0,1 mM)	2 $\mu\text{l}$
Reverzní primer (0,1 mM)	2 $\mu\text{l}$
Destilovaná voda	Doplněno na 50 $\mu\text{l}$

2. Promícháno a krátce centrifugováno.

3. Program termocycleru:

Počáteční denaturace	95°C	3 minuty	
Denaturace	95°C	1 minuta	} 35x
Nasedání primerů	$T_m$ primerů	30 sekund	
Syntéza DNA	72°C	1 minuta/1 kbp	
Konečné prodloužení	72°C	3 minut	

4. Výsledek zkontrolován na elektroforéze.

### **3.2.2.19 SEKVENOVÁNÍ**

Sekvenační analýza byla prováděna na servisním pracovišti biologické sekce PřFUK. Přečištěný vzorek DNA dodáván ve formě vodného roztoku v požadované koncentraci s relevantním primerem. K vyhodnocení výsledků používán program CHROMAS (**Kap. 3.1.11**).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE TETRACYKLINU U PŮDNÍCH IZOLÁTŮ

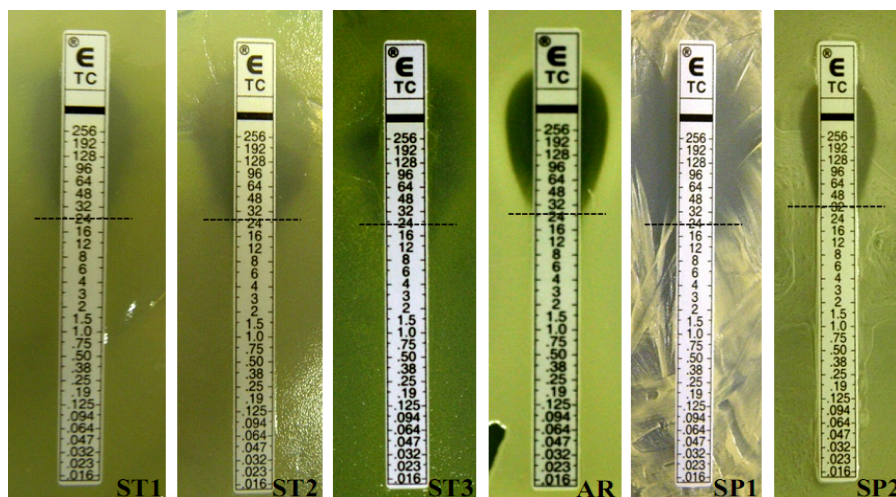
***Cíl: Stanovení míry rezistence k tetracyklinu u grampozitivních a gramnegativních půdních izolátů.***

#### 4.1.1 E-TEST

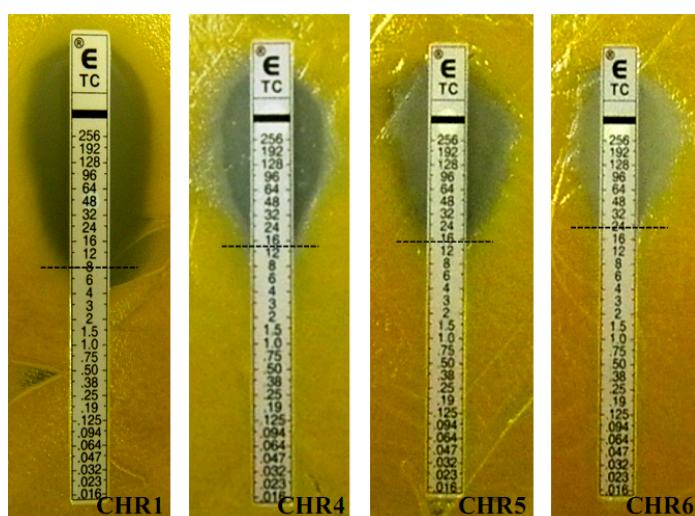
K porovnání míry rezistence k tetracyklinu u jednotlivých izolátů byl využit E-test (AB bioMérieux, **Kap. 3.2.1.5**). Tento test spočívá ve využití gradientu tetracyklinu na nosiči s měřítkem, na kterém lze odečíst hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC). V našem případě je hodnota MIC považována pouze za orientační.

Pro *S. pneumoniae* a *S. aureus* je určena hraniční hodnota MIC (breakpoint) tetracyklinu 16 µg/mL (www.abbiotest.com). U rodů *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas* a *Arthrobacter* hraniční hodnoty MIC tetracyklinu pro E-test nebyly zatím stanoveny CLSI (2005), k vyhodnocení jsme tedy použili hodnoty stanovené pro aerobní organizmy. U aerobních bakterií obecně jsou za rezistentní k tetracyklinu považovány mikroorganizmy, které na E-testu dosahují hodnoty MIC tetracyklinu 16 µg/mL a více (www.abbiotest.com).

Z výsledků je patrná shoda MIC tetracyklinu u rodu *Stenotrophomonas*, kmenů ST1, ST2, ST3 (24 µg/mL), které pocházejí z nehnojené luční půdy. Stejná hodnota MIC (24 µg/mL) byla odečtena i u izolátu rodu *Arthrobacter* (AR), který byl izolován z hnojené půdy. U rodu *Staphylococcus* kmeny SP1 a SP2 vykazují rozdíly ve stanovených MIC tetracyklinu (24 µg/mL respektive 32 µg/mL) (**Obr. 16**). Oba tyto kmeny pocházejí ze stejné oblasti nehnojené půdy. U rodu *Chryseobacterium* nebyl E-test z ekonomických důvodů aplikován u všech šesti izolátů, ale pouze u vybraných kmenů - CHR1, CHR4, CHR5 a CHR6. Hodnota MIC tetracyklinu byla stanovena 8 µg/mL pro kmen CHR1, který byl jako jediný izolován z hnojené půdy, 16 µg/mL pro kmeny CHR2 a CHR5 a 24 µg/mL pro kmen CHR6 z nehnojené půdy (**Obr. 17**). U kmene CHR1 byla odečtena intermediární hodnota MIC (8 µg/mL), přesto je s ním dále pracováno a je považován za kmen rezistentní k tetracyklinu.



Obr. 16: E-test provedený u izolátů rodů *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*.



Obr. 17: E-test provedený u izolátů rodu *Chryseobacterium*.

#### 4.1.2 AGAROVÁ DILUČNÍ METODA

Při agarové diluční metodě (Kap. 3.2.1.6) byla MIC tetracyklinu vyhodnocena na pevné sojové půdě s různou koncentrací tetracyklinu. Tato metoda byla použita u kmene ST1, ST2 a CHR1 a rozmezí koncentrací tetracyklinu bylo zvoleno od 0 až po 80 µg/ml. Výsledky byly odečítány po 24 a 36 hodinách. Pro vyhodnocení růstu bylo zvoleno kritérium vytvoření uzavřené kolonie. Pevné agarové půdy, kde nebyl pozorován růst, obsahovaly minimální inhibiční koncentraci antibiotika.

U rodu *Stenotrophomonas* kmene ST1 a ST2 byla stanovena MIC tetracyklinu 20 µg/ml. U rodu *Chryseobacterium* kmene CHR1 byla stanovena MIC 10 µg/ml.

Hodnoty MIC získané agarovou diluční metodou přibližně odpovídají výsledkům získaných při aplikaci E-testu.

## 4.2 STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮDNÍCH IZOLÁTŮ K DALŠÍM ANTIBIOTIKŮM

**Cíl: Získání profilu rezistence k testovaným antibiotikům u grampozitivních a gramnegativních půdních izolátů.**

U studovaných půdních izolátů byla testována citlivost k osmi antibiotikům – ampicilinu (koncentrace 100 µg/ml, **Obr. 18**), kanamycinu (30 µg/ml, **Obr. 19**), chloramfenikolu (5 µg/ml, **Obr. 20**), erytromycinu (0,3 µg/ml, **Obr. 21**), nalidixové kyselině (20 µg/ml, **Obr. 22**), rifampicinu (50 µg/ml, **Obr. 23**), streptomycinu (340 µg/ml, **Obr. 24**) a spektinomycinu (0,5 µg/ml, **Obr. 25**). Citlivost kmenů k jednotlivým antibiotikům byla posuzována po 24 hodinách inkubace při 28°C v termostatu. Kmeny byly vyhodnoceny jako rezistentní (R), středně rezistentní (R/S), středně citlivé (S/R) a citlivé (S) k antibiotiku, na základě kvantitativního zhodnocení růstu na pevném mediu.

Podle získaných výsledků byly všechny izoláty rodů *Chryseobacterium* a *Stenotrophomonas* vyhodnoceny jako rezistentní k ampicilinu, kanamycinu, erytromycinu a spektinomycinu. Kmen CHR4 rodu *Chryseobacterium*, kmeny ST1, ST2, ST3 rodu *Stenotrophomonas* a kmen SP1 rodu *Staphylococcus* byly vyhodnoceny jako rezistentní k chloramfenikolu. Kmeny SP1 a SP2 rodu *Staphylococcus* byly vyhodnoceny jako rezistentní k nalidixové kyselině, erytromycinu a spektinomycinu. Izolát rodu *Arthrobacter* byl vyhodnocen jako rezistentní k nalidixové kyselině, streptomycinu a spektinomycinu (**Tab. 3**).

Při srovnání grampozitivních a gramnegativních izolátů byl pozorován nejvýraznější rozdíl v citlivosti k ampicilinu, kanamycinu a nalidixové kyselině. V rámci skupiny grampozitivních i gramnegativních izolátů byl pozorován podobný profil rezistence k antibiotikům.

Citlivost izolátů *Stenotrophomonas* k rifampicinu byla poté využita při simulaci konjugativní reakce (**Kap. 4.7**).

	<b>Amp</b>	<b>Kan</b>	<b>Ery</b>	<b>Spc</b>	<b>Rif</b>	<b>Nal</b>	<b>Str</b>	<b>Cam</b>
G- izoláty								
<b>ST1</b>	R	R	R	R	S	S	R	R
<b>ST2</b>	R	R	R	R	S	S	R/S	R
<b>ST3</b>	R	R	R	R	S	S	R	R
<b>CHR1</b>	R	R	R/S	R	S	S	R/S	S/R
<b>CHR2</b>	R	R	R	R	S	S	R	S/R
<b>CHR3</b>	R	R	R	R	S	S	R	S/R
<b>CHR4</b>	R	R	R	R	S	S	R	R
<b>CHR5</b>	R	R	R	R/S	S	S	R	S/R
<b>CHR6</b>	R	R	R	R	S	S	R	S/R
G+ izoláty								
<b>SP1</b>	S	S	R	R/S	S	R	S	S
<b>SP2</b>	S	S	R	R/S	S	R	S	R
<b>AR</b>	S	S/R	S	R	S	R	R	S

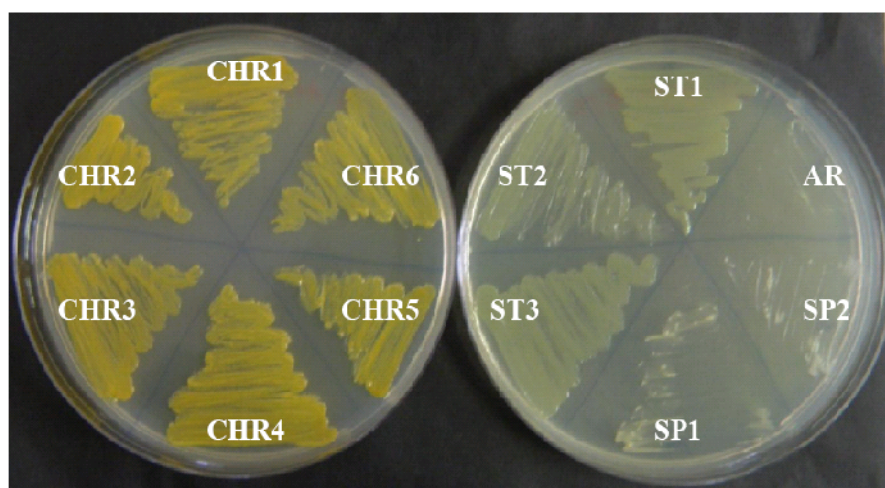
**Tab. 3: Rezistence studovaných půdních izolátů k testovaným antibiotikům.**

vysvětlivky: R – rezistentní

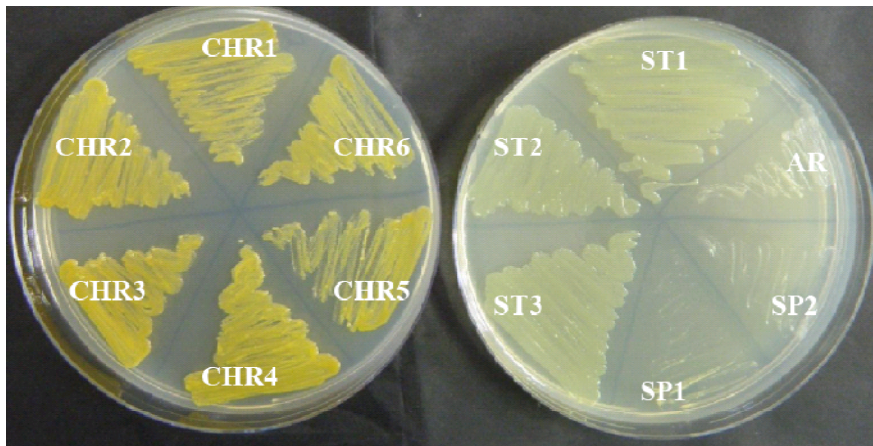
R/S – středně rezistentní

S/R – středně citlivé

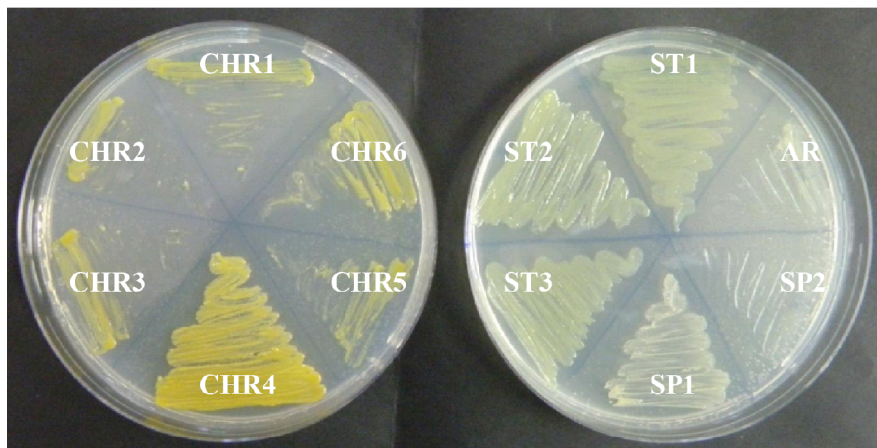
S - citlivé



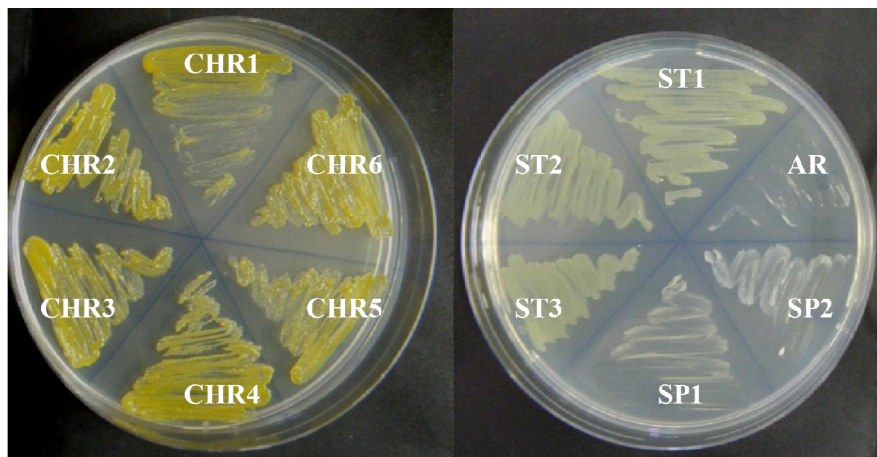
**Obr. 18: Rezistence studovaných půdních izolátů k ampicilinu.**



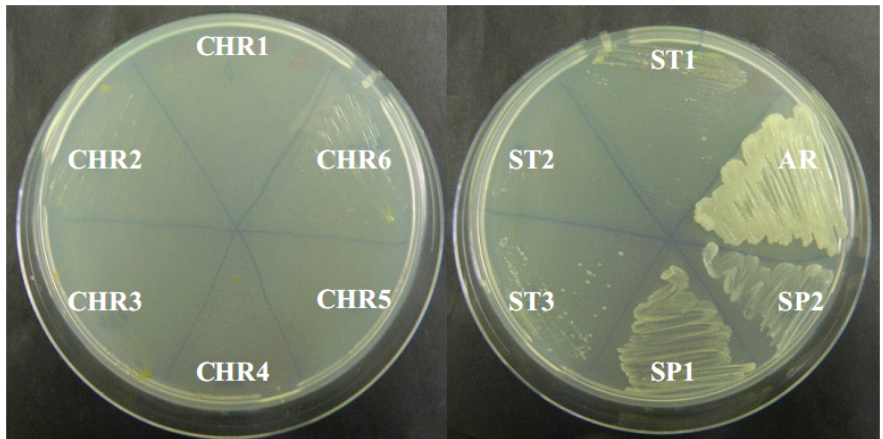
**Obr. 19: Rezistence studovaných půdních izolátů ke kanamycinu.**



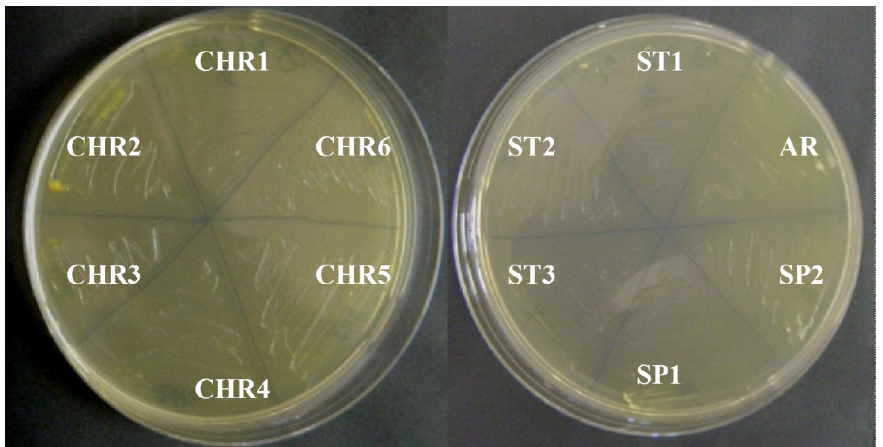
**Obr. 20: Rezistence studovaných půdních izolátů k chloramfenikolu.**



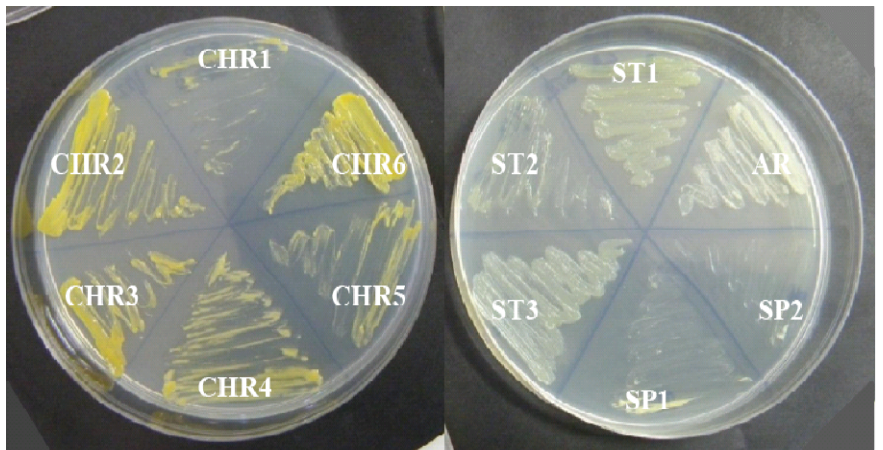
**Obr. 21: Rezistence studovaných půdních izolátů k erytromycinu.**



Obr. 22: Rezistence studovaných půdních izolátů k nalidixové kyselině.

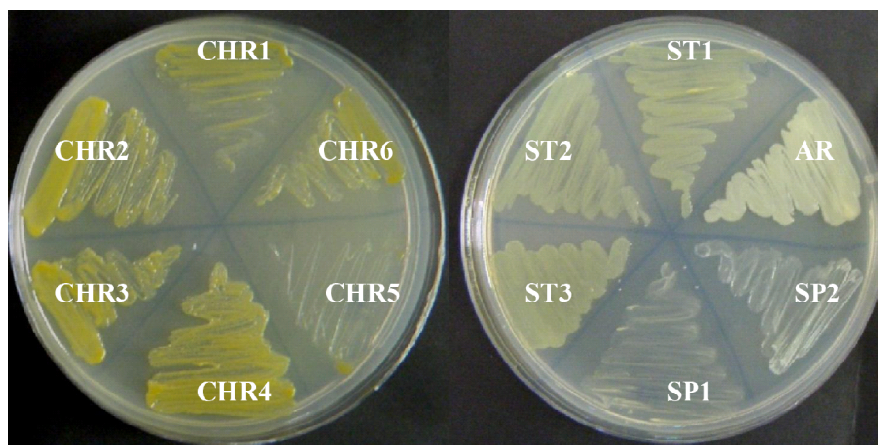


Obr. 23: Rezistence studovaných půdních izolátů k rifampicinu.



Obr. 24: Rezistence studovaných půdních izolátů k streptomycinu.





Obr. 25: Rezistence studovaných půdních izolátů k spektinomycinu.

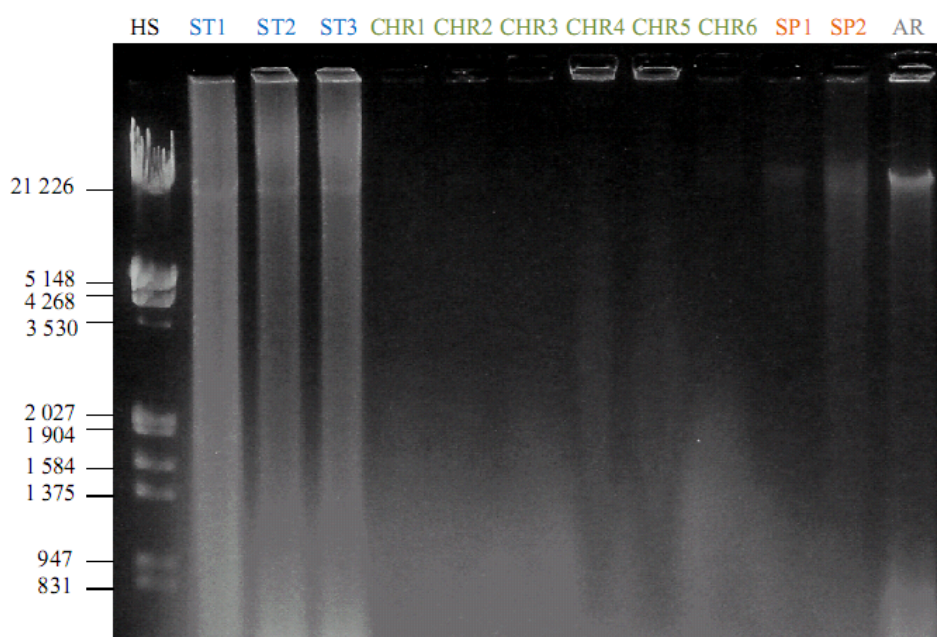
### 4.3 IDENTIFIKACE DETERMINANT REZISTENCE K TETRACYKLINU

#### 4.3.1 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

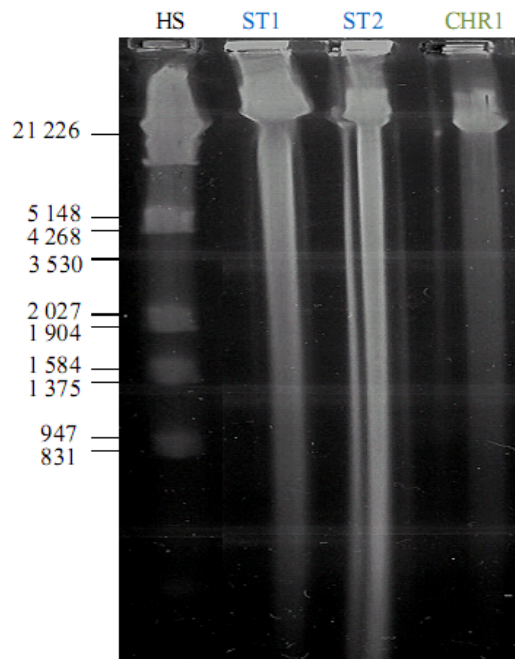
##### **Cíl: Určení přítomnosti mimochromozomální DNA**

Aby bylo možné identifikovat determinantu rezistence k tetracyklinu, bylo nutné nejprve ověřit možnou přítomnost plazmidů. Za tímto účelem byla využita modifikovaná metoda alkalické lyze (**Kap. 3.2.2.4**) a pulzní elektroforéza (**Kap. 3.2.2.7**). Vzhledem ke špatné dostupnosti zařízení a k časové náročnosti pulzní elektroforézy byla použita ke kontrole výsledků alkalické lyze pouze u kmenů získaných v roce 2007 (kmeny ST1, ST2 a CHR1). U kmenů, které byly získány v roce 2009 (ST3, CHR2, CHR3, CHR4, CHR5, CHR6, AR, SP1, SP2) byla použita pouze metoda alkalické lyze.

Žádnou z metod se nepodařilo zjistit přítomnost plazmidů u studovaných půdních izolátů (**Obr. 26, Obr. 27**) a nadále bylo pracováno pouze s chromozomální DNA. Viditelné proužky na gelu jsou pouze pozůstatky chromozomální DNA.



**Obr. 26: Vyhodnocení přítomnosti plazmidové DNA metodou alkalické lyze.**



**Obr. 27: Vyhodnocení přítomnosti plazmidové DNA metodou pulzní elektroforézy.**

#### 4.3.2 ANALÝZA PŘÍTOMNOSTI DETERMINANTY REZISTENCE METODOU PCR

**Cíl: Identifikace determinant rezistence k tetracyklinu u studovaných půdních izolátů metodou PCR.**

Pro kvalitativní identifikaci determinant rezistence k tetracyklinu byla zvolena metoda PCR (**Kap. 3.2.2.18**). K tomuto účelu byly vybrány geny rezistence k tetracyklinu s vysokou četností výskytu, patřící do různých skupin mechanismů rezistence. K identifikaci determinant byly použity primery (**Kap. 3.1.3**) převzaté z několika environmentálních studií, ve kterých byla ověřena jejich funkčnost u půdních izolátů (AARESTRUP *et al.* 2000b, NG *et al.* 2001, AMINOV *et al.* 2002, MIRANDA *et al.* 2003, YU *et al.* 2005). Specifita těchto primerů byla poté ověřena i v databázi genů rezistence a některé byly otestovány u klinických izolátů kolegou z Ústavu půdní biologie.

Ze skupiny genů efluxních pump byly analyzována přítomnost *tet(A)*, *tet(AC)*<sup>1</sup>, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(K)*, *tet(L)*.

<sup>1</sup> Primery zapůjčené z Institutu půdní biologie AVČR v Českých Budějovicích

Ze skupiny genů ribozomální ochrany byla analyzována přítomnost genů *tetB(P)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*<sup>1</sup>, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)*<sup>1</sup> a *otr(A)*. Dále byla analyzována přítomnost genů *tet(X)* a *tet(34)* ze skupiny genů rezistence, jejichž produkty enzymaticky inaktivují tetracyklin (**Tab. 4**). Celkem bylo do skupiny analyzovaných determinantů zařazeno 23 genů rezistence k tetracyklinu.

Jako templát byla při PCR reakcích používána izolovaná chromozomální DNA (**Kap. 3.2.2.1**) nebo zlyzované bakteriální buňky – lyzát (**Kap. 3.2.2.2**). Při reakcích byla použita optimální teplota tání příslušných primerů (**Kap. 3.1.3**) získaná výpočtem podle zastoupení G+C párů (**Kap. 3.1.12**). Pokud bylo reakcí PCR amplifikováno příliš mnoho nespecifických produktů, byla teplota tání zvýšena o 2-3°C. V případě amplifikování specifického produktu o jakékoliv velikosti, byla reakce za stejných podmínek ještě jednou opakována, a poté byl produkt izolován z agarózového gelu, přečištěn (DNA Extraction Kit, FERMENTAS) a sekvenován (**Kap. 3.2.2.19**).

U gramnegativních izolátů byla analyzována přítomnost všech dvaceti třech determinantů rezistence, které byly v této studii zastoupené. U grampozitivních izolátů byla ze zastoupených determinantů analyzována přítomnost všech determinantů RPP, u efluxních pump byly k testování vybrány pouze determinanty, které jsou u grampozitivních bakterií rozšířené.

	ST1	ST2	ST3	CHR1	CHR2	CHR3	CHR4	CHR5	CHR6	SP1	SP2	AR
<i>otr(A)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>tet(30)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(34)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(A)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(AC)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tetB(P)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(C)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(D)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>tet(E)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(G)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(H)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(J)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(K)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>tet(L)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(M)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>tet(O)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>tet(Q)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>tet(S)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(T)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(W)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>tet(X)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(Y)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>tet(Z)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tab. 4: Výsledky analýzy přítomnosti jednotlivých *tet* genů u půdních izolátů stanovené metodou PCR.**

- ..... PCR reakcí nebyl amplifikován fragment;
- + ..... PCR reakcí byl amplifikován fragment;
- ND .... amplifikace nebyla prováděna

#### 4.3.2.1 Přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu u rodů

##### *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*

U rodu *Stenotrophomonas* byl dosud popsán výskyt determinant *tet(35)* a *tet(39)*, které kódují efluxní pumpu. Tyto determinanty nebyly do námi analyzované skupiny zahrnuty. Výskyt determinanty *tet(35)* byl prokázán pouze u izolátů rodu *Stenotrophomonas* z rybích farem v Chile, determinanta *tet(39)* byla identifikována u *Stenotrophomonas maltophilia* izolované ze znečištěné řeky v Nigérii (MIRANDA *et al.* 2003, ADELOWO a FAGADE 2009, ROBERTS 2010c).

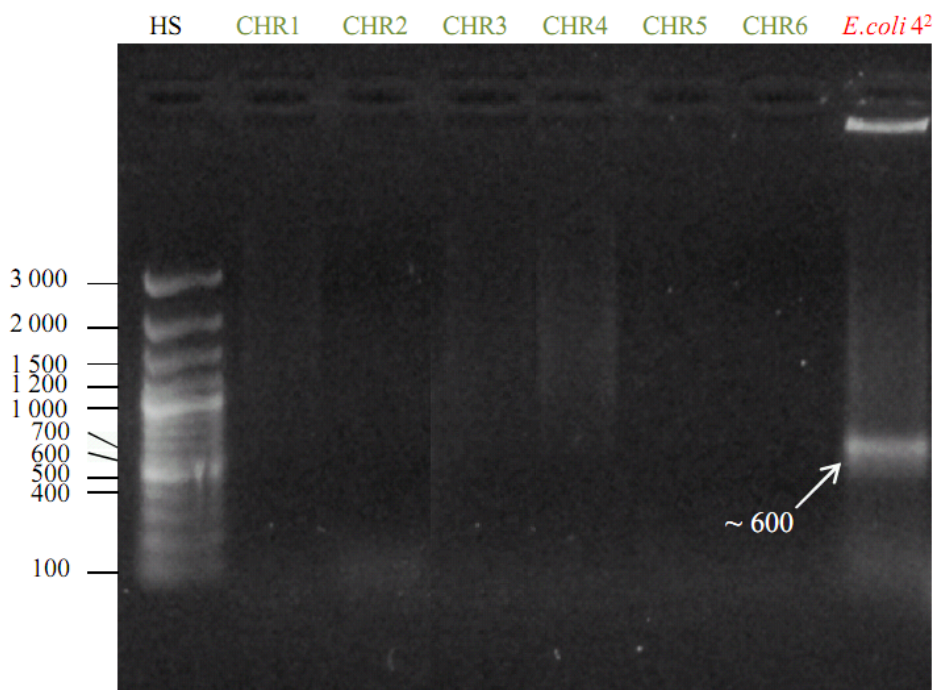
U rodu *Chryseobacterium* byl popsán výskyt determinanty *tet(A)*, která kóduje efluxní pumpu (ROBERTS 2010c). Za účelem zjištění, zda se u studovaných izolátů vyskytuje determinanta *tet(A)* byly použity primery *tetAC*<sup>1</sup>, které jsou specifické pro třídu *tet* genů *tet(A)* a *tet(C)*, a jako pozitivní kontrola klinický izolát *E. coli* 4<sup>2</sup> (**Tab. 5**) Těmito degenerovanými primery lze amplifikovat i dosud neidentifikované členy příslušné třídy genů *tet(A)* nebo *tet(C)* (YU *et al.* 2005). Přítomnost determinanty rezistence patřící do třídy *tet(A)* nebo *tet(C)* nebyla u studovaných půdních izolátů rodu *Chryseobacterium* prokázána (**Obr. 28**).

U půdních izolátů rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* byla dále testována přítomnost determinanty *tet(30)*, *tet(34)*, *tet(A)*, *tet(B)*, *tetB(P)*, *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tet(X)*, *tet(Y)*, *tet(Z)* a *otr(A)*. Amplifikací nebyl potvrzen výskyt žádné z těchto determinant u izolátů rodů *Chryseobacterium* a *Stenotrophomonas*, ale u kmenů ST1, ST2, ST3 a CHR1, CHR2, CHR3, CHR4, CHR5 a CHR6 byl amplifikován PCR produkt z *tetD* primerů (**Obr. 29**). Velikost získaného produktu (~300 bp) však neodpovídala velikosti očekávané (~187 bp). Na základě sekvenační analýzy fragmentu bylo zjištěno, že je součástí 3,5 kbp dlouhého hybridního genu kódujícího Na<sup>+</sup>/solut symportér a histidinovou kinázu, který je specifický pro rod *Stenotrophomonas*. Nukleotidové sekvence 300 bp dlouhého fragmentu u jednotlivých půdních izolátů byly identické. Gen kódující hybridní protein (hybridní kinázu) byl identifikován i u izolátů *S. maltophilia* K279a, *S. maltophilia* R551-3 a *Stenotrophomonas* sp. SKA14 (**Tab. 6**, **Obr. 30**).

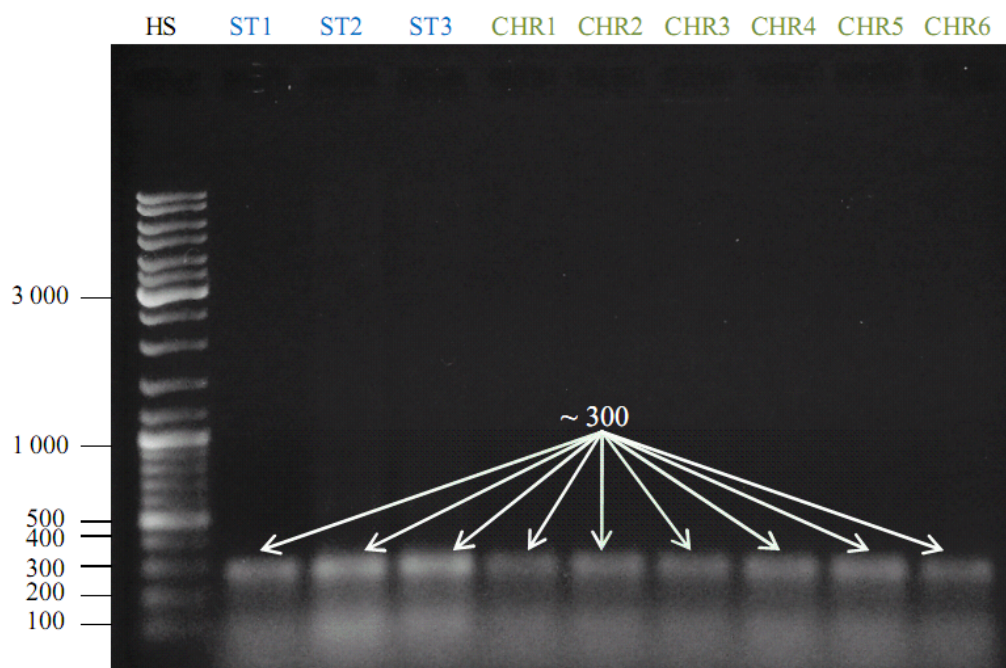
<sup>2</sup> Kmen zapůjčen z Institutu půdní biologie AVČR v Českých Budějovicích

Třída genů rezistence k tetracyklinu	GenBank Acession Number	Hostitelský organizmus (plazmid)
<i>tet(A)</i>	AJ307714	<i>Escherichia coli</i>
	AJ313332	<i>Escherichia coli</i> pTOJO2
	L29404	<i>Escherichia coli</i>
	X00006	<i>Escherichia coli</i> RP1
	Y19119	<i>Salmonella enterica</i> serovar Dublin
	X75761	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> pRP4
	X61367	Transpozon G- bakterií Tn1721
	NC_001621	Birmingham IncP-alfa plazmid
<i>tet(C)</i>	NC_002109	<i>Francisella tularensis</i> pOM1
	NC_002056	<i>Salmonella typhimurium</i>
	AY046176	<i>Salmonella typhimurium</i> pR46
	NC_001389	Plazmid pAA3.7X

Tab. 5: Determinanty rezistence k tetracyklinu třídy *tet(A)* a *tet(C)*, které mohou být amplifikovány primery tetAC<sup>1</sup>. Podle (YU *et al.* 2005).



Obr. 28: Analýza přítomnosti determinanty rezistence k tetracyklinu *tet(A)* a *tet(C)* u studovaných půdních izolátů rodu *Chryseobacterium*.



Obr. 29: Analýza přítomnosti determinanty rezistence k tetracyklinu amplifikované primery tetD u izolátů rodu *Chryseobacterium* a *Stenotrophomonas*.

Izoláty <i>Stenotrophomonas</i> s identifikovanou hybridní kinázou	GenBank Accession Number (lokus) pro hybridní kinázu	Podobnost proteinového produktu fragmentu genu hybridní kinázy
<i>S. maltophilia</i> K279a	AM743169.1	100%
<i>S. maltophilia</i> R551-3	YP_002030360.1	98%
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	YP_002705508.1	100%

Tab. 6: Podobnost proteinového produktu amplifikovaného fragmentu genu hybridní kinázy se známými osekvenovanými hybridními kinázami.



CHR3	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
CHR4	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
CHR2	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
CHR1	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
ST3	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
ST2	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
ST1	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
K279a	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
SKA14	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
R551-3	VLALPLAEGRNALALIAY	GGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRR
	*****	*****
CHR3	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
CHR4	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
CHR2	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
CHR1	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
ST3	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
ST2	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
ST1	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
K279a	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
SKA14	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
R551-3	SGDHQEADVSRVLWIRRLAILLLAL	
	*****	

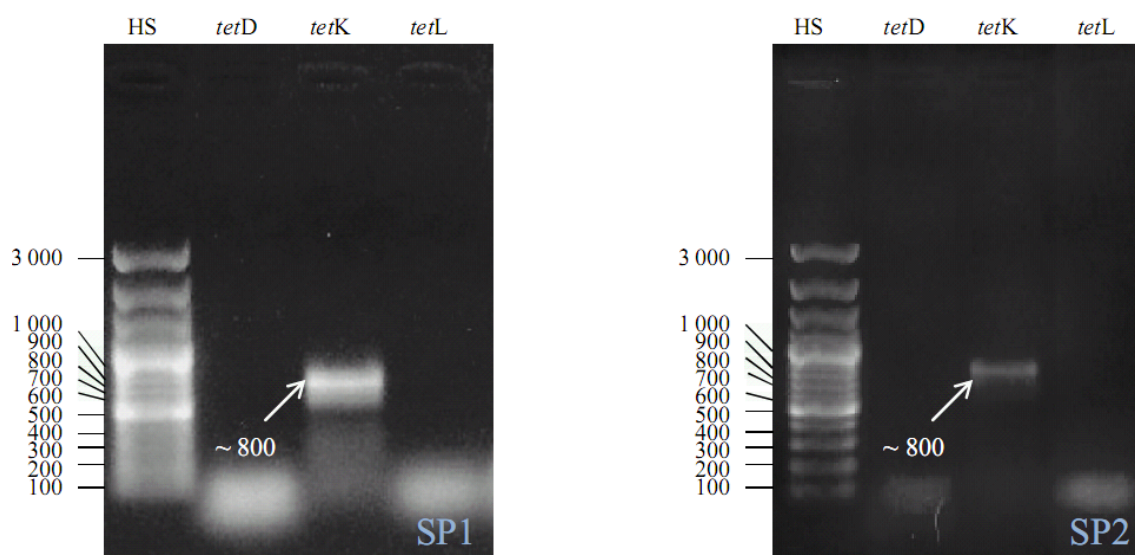
**Obr. 30.: Srovnání aminokyselinové sekvence proteinového produktu amplifikovaného fragmentu genu hybridní kinázy u půdních izolátů s osekvenovanými hybridními kinázami u rodu *Stenotrophomonas*. Červeně znázorněny bodové mutace.**

#### 4.3.2.2 Přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu u rodu *Staphylococcus*

U rodu *Staphylococcus* bylo při výběru testovaných determinant rezistence k tetracyklinu vycházeno z prokázaného výskytu genů *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(U)*, *tet(S)*, *tet(38)* a *tet(42)* (ROBERTS 2010a). V této studii nebyly primery pro determinanty *tet(U)*, *tet(38)*, *tet(42)* k dispozici a dále byla testována možná přítomnost determinant rezistence *tet(X)*, *tet(T)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(34)*, *tet(D)*, *otr(A)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(S)* a *tet(30)*.

Jedinou amplifikovanou a sekvenačně ověřenou determinantou rezistence k tetracyklinu u kmenů SP1 i SP2 byl gen *tet(K)* kódující efluxní pumpu (**Obr. 31, Tab. 7**). Nukleotidové sekvence identifikovaných determinant *tet(K)* byly u kmenů SP1 a SP2 identické.

U studovaných půdních izolátů rodu *Staphylococcus* nebyla zjištěna přítomnost fragmentu genu hybridního proteinu, který byl amplifikován *tetD* primery u izolátů rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*.



Obr. 31: Analýza přítomnosti determinant rezistence k tetracyklinu amplifikovaných primery tetD, tetK, tetL u izolátů rodu *Staphylococcus*, kmenů SP1 a SP2.

Hostitelské organizmy (plazmidy) identifikovaných genů tet(K)	GenBank Accession Number	Podobnost s identifikovaným fragmentem genu tet(K) u kmenů SP1 a SP2 na nukleotidové úrovni
<i>S.aureus</i> plazmid pSTE2	AJ888003	99%
Plazmid pNS1	NC_001391	100%
<i>S. aureus</i> COL plazmid pT118	NC_006629	100%
<i>S. aureus</i> plazmid pUSA02	NC_007791	100%
<i>S. epidermidis</i> plazmid pSE-12228-01	NC_005008	100%
<i>S.aureus</i> plazmid pKH6	NC_001767	100%
<i>S. lentus</i> plazmid pSTE2	NC_006871	100%
<i>S. aureus</i> plazmid pT118	S67449	100%
<i>S. rostri</i> tet(K)	FN435328	100%
<i>Nocardia seriolae</i> tet(K)	AB513133	43%

Tab. 7: Podobnost nukleotidové sekvence amplifikovaného fragmentu genu tet(K) u kmenů SP1 a SP2 se známými osekvenovanými geny tet(K) v databázi.

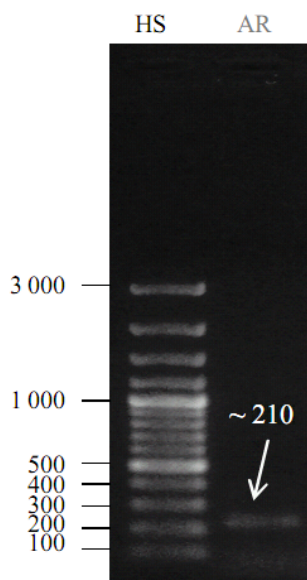
#### 4.3.2.3 Přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu u rodu *Arthrobacter*

U rodu *Arthrobacter* byl popsán výskyt determinant rezistence k tetracyklinu *tet(M)* a *tet(33)*. Determinanta *tet(33)* byla identifikována na mobilním elementu u izolátů z chovu prasat (AGERSO a SANDVANG 2005, ROBERTS 2010a). Její přítomnost nebyla v této studii analyzována.

U izolátu rodu *Arthrobacter* byla testována přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu *tet(30)*, *tet(34)*, *tet(D)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(X)* a *tet(Z)*.

U studovaného izolátu rodu *Arthrobacter* byl amplifikován produkt z primerů pro determinantu *tet(M)* (Obr. 32), který velikostně (210 bp) přibližně odpovídal velikosti předpokládaného PCR produktu (171 bp) (AMINOV *et al.* 2001). Přítomnost determinanty rezistence *tet(M)* se ale nepodařilo prokázat sekvenací. Ani po několika sekvenačních analýzách nebyla získána žádná sekvence amplifikovaného fragmentu.

U studovaného izolátu AR nebyl amplifikován fragment genu hybridní kinázy, který byl amplifikován u izolátů rodu *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* tetD primery.



Obr. 32: Analýza přítomnosti determinanty rezistence k tetracyklinu *tet(M)* u izolátu rodu *Arthrobacter*.

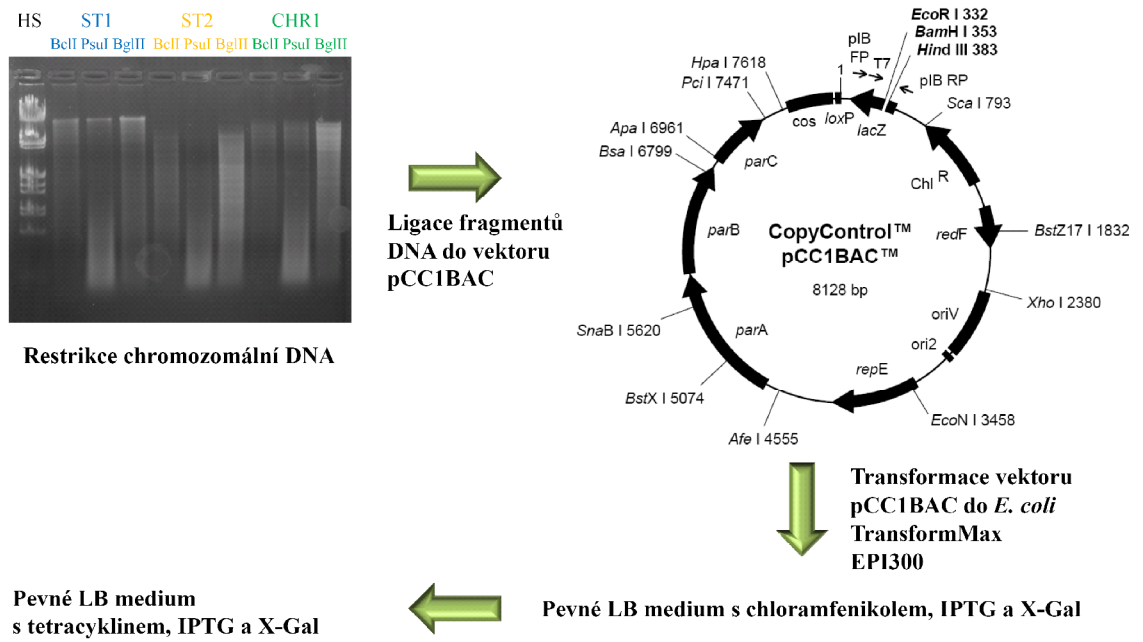
#### 4.4 IDENTIFIKACE DETERMINANTY REZISTENCE K TETRACYKLINU V KNIHOVNĚ DNA

***Cíl: Identifikace přítomných determinant rezistence k tetracyklinu u vybraných půdních izolátů ve vytvořené knihovně DNA.***

V současnosti je známo 43 různých determinant rezistence k tetracyklinu (ROBERTS 2010b). Aby bylo možné identifikovat determinanty rezistence k tetracyklinu, jejichž přítomnost nebyla analyzována amplifikací, objevit nové neznámé determinanty anebo odhalit procesní chyby při identifikaci determinant metodou PCR, využili jsme další experimentální přístup. Ten spočíval ve vytvoření knihovny DNA (**Kap. 3.2.2.11**) z vybraných půdních izolátů. K tvorbě knihovny byl využit linearizovaný a defosforylovaný vektor pCC1BAC (**Kap. 3.1.2**), do kterého byla zaligována (**Kap. 3.2.2.10**) chromozomální DNA naštípaná restrikcími enzymy.

Chromozomální DNA byla izolována z kmenů CHR1, ST1 a ST2 a byla naštípana vždy jedním restrikcími enzymem, a to BclI, BglI nebo PstI (**Kap. 3.2.2.9**). Tyto restrikcími enzymy byly vybrány na základě množství cílových míst v genomu a rozeznávaných sekvencí. Od každého použitého kmene jsme tedy získali tři vzorky chromozomální DNA naštípané jednotlivými enzymy, která byla zaligována do vektoru pCC1BAC vektoru a vektor transformován do kompetentních buněk *E. coli* TransformMax EPI300 (**Kap. 3.1.1**). Získaní transformanti byli poté vyseti na pevné LB medium s chloramfenikolem (12,5 µg/ml), IPTG (0,4 mM) a X-Gal (40 µg/ml). Přídavek IPTG a X-Gal byl nutný k odlišení klonů, které nesly prázdné vektory pCC1BAC, tedy bez fragmentu DNA. Po 24 hodinách byli transformanti přerazítkováni (**Kap. 3.2.1.4**) na pevné LB medium s tetracyklinem (5 a 30 µg/ml), IPTG (0,4 mM) a X-Gal (40 µg/ml) (**Obr. 33**). Medium s tetracyklinem sloužilo k selekci rezistentních klonů a tedy klonů obsahujících hledanou determinantu.

Při tomto experimentu se nám nepodařilo získat žádný klon rezistentní k tetracyklinu, tedy žádný klon s funkční determinantou rezistence, a to ani při opakování pokusu.



**Obr. 33: Schéma postupu při vytváření knihovny DNA.**

#### 4.5 LOKALIZACE A POČET KOPIÍ GENU HYBRIDNÍ KINÁZY V GENOMU PŮDNÍCH IZOLÁTŮ

**Cíl: Lokalizace a zjištění pravděpodobného počtu kopií genu hybridní kinázy v genomu půdních izolátů.**

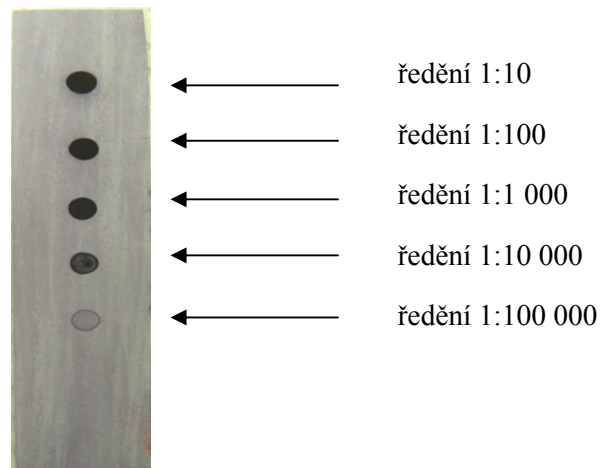
Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo identifikovat známou determinantu rezistence k tetracyklinu metodou PCR ani vytvořením knihovny DNA, pokračovali jsme ve studiu hybridní kinázy. Abychom určili přibližnou lokalizaci a počet kopií genu hybridní kinázy, jehož fragment byl amplifikován u izolátů rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*, použili jsme metodu DNA hybridizace (**Kap. 3.2.2.15**).

Chromozomální DNA půdních izolátů byla jednotlivě naštípána restričními enzymy BclI, BglII, Sall a KpnI (**Kap. 3.2.2.9**) a použita jako templát, který byl blotováním přenesen na nylonovou membránu (**Kap. 3.2.2.12**). K tomuto účelu jsme vybrali izoláty, které byly v tuto dobu k dispozici, a to kmeny ST1, ST2, ST3 a CHR1. Kromě toho byla použita chromozomální DNA kmene SP1 rodu *Staphylococcus* naštípána restričním enzymem SalI, která nám sloužila jako kontrola specifity hybridizace. Jako sonda (**Obr. 34**) byl použit fragment genu hybridní kinázy amplifikovaný primery tetD, který byl neradioaktivně značený DIG-značkou pomocí PCR reakce (**Kap. 3.2.2.13.2**).

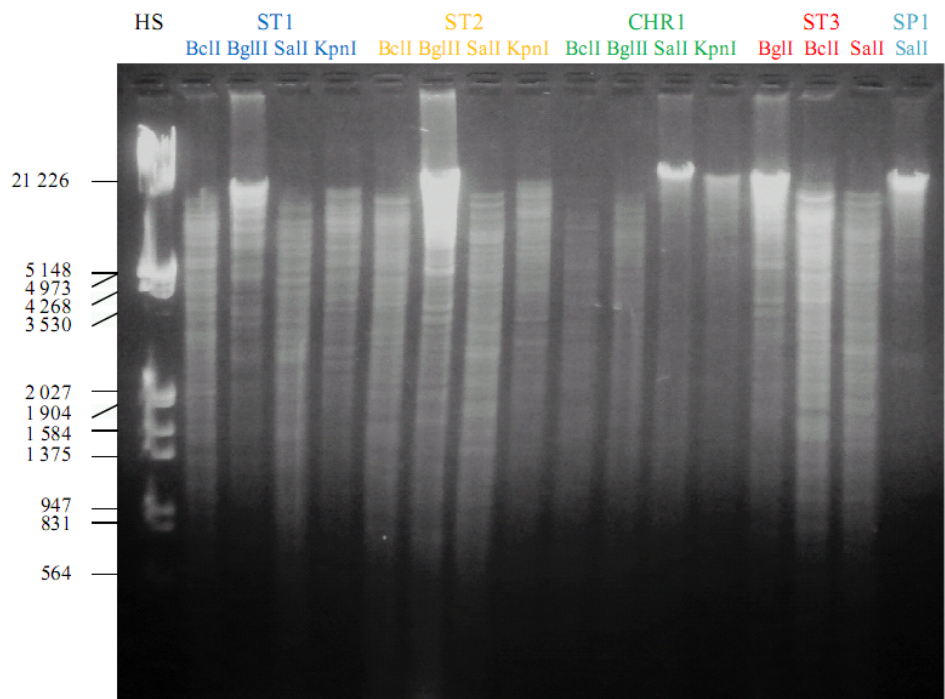
Získaná restriční analýza u izolátů rodu *Stenotrophomonas* dokládá pravděpodobnou genotypovou rozdílnost kmenů ST1 a ST2, a stejně tak pravděpodobnou genotypovou shodu kmenů ST2 a ST3 (**Obr. 35, Obr. 37**). Tato rozdílnost respektive shoda byla dále potvrzena REP typizací (**Kap. 4.9**).

Jak je patrné z obrázku (**Obr. 36**), při přenosu chromozomální DNA na nylonovou membránu metodou Southern blottingu, nedošlo k přenosu chromozomální DNA izolátu rodu *Chryseobacterium*, kmene CHR1. Hybridizace proto v případě tohoto izolátu nebyla úspěšná az tohoto důvodu byla opakována. Chromozomální DNA půdních izolátů ST1, ST2 a CHR1 byla tentokrát naštípána restričními enzymy BclI, BglII a PstI. V tomto případě jsme u kmene CHR1 získali pozitivní hybridizační signál, ale v průběhu hybridizace došlo vlivem vysoké teploty k vysrážení SDS v hybridizačním roztoku a snížení kvality membrány (**Obr. 38**).

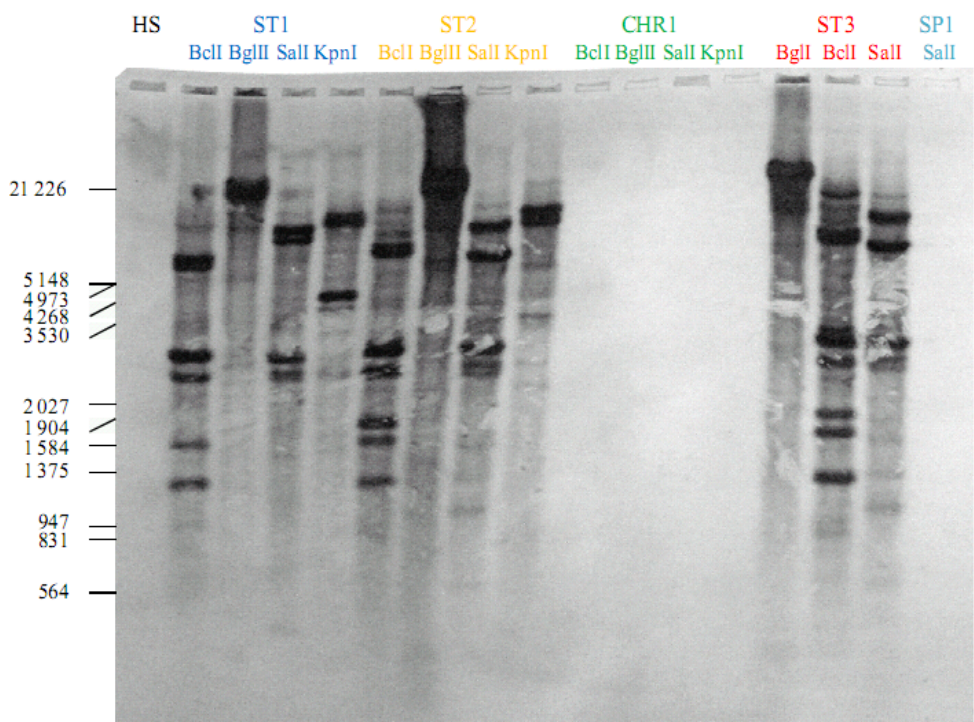
Hybridizací značeného fragmentu genu hybridní kinázy s naštípanou chromozomální DNA jsme získali více hybridizačních signálů u všech restričních profilů půdních izolátů. Vzhledem k jejich počtu a velikosti je pravděpodobné, že se v genomu půdních izolátů rodů *Stenotrophomonas* i *Chryseobacterium* hybridní kináza vyskytuje ve více kopiích a patrně s různým stupněm genetické identity, jak lze soudit dle intenzity hybridizačních signálů.



**Obr. 34: Ověření úspěšnosti neradioaktivního značení sondy použité při hybridizaci.**

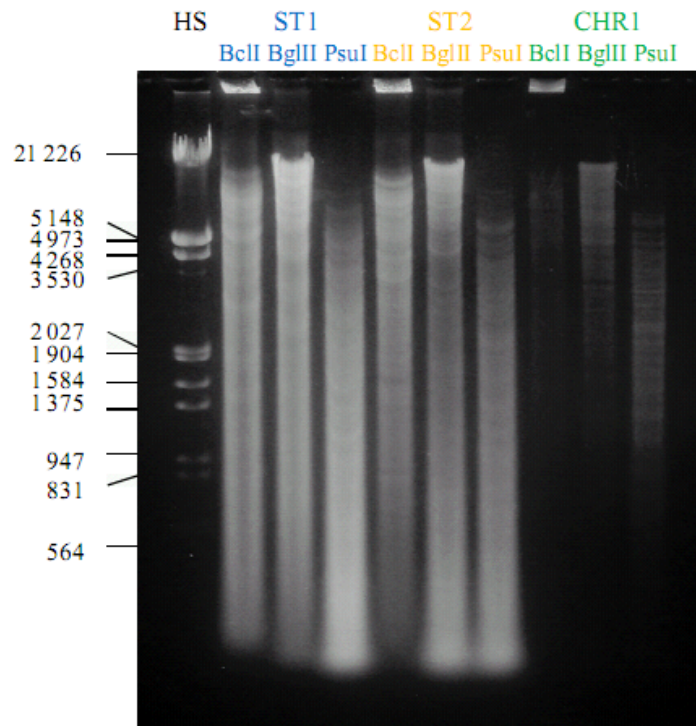


Obr. 35: Restrikce chromozomální DNA izolátů rodu *Stenotrophomonas*, kmenů ST1, ST2, ST3, rodu *Chryseobacterium*, kmene CHR1 a rodu *Staphylococcus*, kmene SP1 enzymy BclI, BglII, Sall a KpnI.

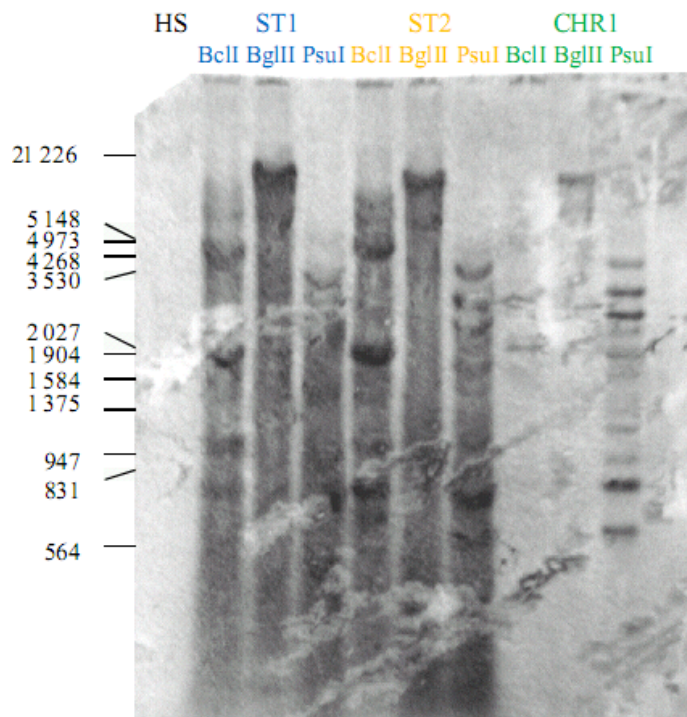


Obr. 36: Hybridizační signály získané po hybridizaci chromozomální DNA a značeného fragmentu genu hybridní kinázy.





Obr. 37: Restrikce chromozomální DNA rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*, kmenů ST1, ST2, CHR1 enzymy BclI, BglII a PstI.



Obr. 38: Hybridizační signály získané po hybridizaci chromozomální DNA a značeného fragmentu genu hybridní kinázy.

## 4.6 SPECIFIKACE IDENTIFIKOVANÉ HYBRIDNÍHO KINÁZY

### *Cíl: Analýza hybridní kinázy.*

Aby bylo možné posoudit možnost podílu hybridní kinázy (hybridního proteinu) na rezistenci k tetracyklinu, analyzovali jsme ji na úrovni aminokyselinové sekvence.

Identifikovaný fragment genu hybridní kinázy u studovaných izolátů má sekvenční podobnost s dalšími hybridními kinázami u osekvenovaných *S. maltophilia* (**Kap. 4.4, Tab. 4**). Tyto hybridní kinázy *S. maltophilia* se skládají ze 4 domén – symportérové domény, histidin kinázy, ATP vazebné domény a regulátoru odpovědi (**Obr. 39**). Histidin kináza a regulátor odpovědi jsou součástí systému signální transdukce. U hybridního proteinu bylo predikováno 12 transmembránových úseků – helixů.

Námi amplifikovaný fragment genu hybridního proteinu je částí Na<sup>+</sup>/solut symportérové domény hybridního proteinu a sekvence tohoto fragmentu odpovídá úseku 4753793...4754037 hybridního proteinu *S. maltophilia* K279a. Na<sup>+</sup>/solut symportéry patří do nadrodiny SSSS (sodium/solut symporter superfamily) transportérů (REIZER *et al.* 1994).

Zatím neznáme celou sekvenci hybridní kinázy identifikované u studovaných půdních izolátů a není nám známa linie půdních izolátů *Stenotrophomonas*. Při analýze okolí genu hybridní kinázy u osekvenovaných *S. maltophilia* K279a a R551-3 bylo zjištěno, že se v sousedství genu kinázy u obou linií vyskytuje gen pro peptidázu S46 respektive S7 (**Obr. 40**). Do této oblasti byly navrženy degenerované primery (Pep, **Kap. 3.1.3**), kterými se nám však gen pro peptidázu u žádného izolátu nepodařilo amplifikovat. Další degenerované primery (Kin, **Kap. 3.1.3**) byly navrženy do známé intergenové oblasti v sousedství genu hybridní kinázy *S. maltophilia* K279a a R551-3. Těmito primery se však nepodařilo amplifikovat gen hybridní kinázy ani u jednoho studovaného izolátu.

U některých izolátů *Chryseobacterium* a *Stenotrophomonas* se tetD primery podařilo amplifikovat slabší 700 bp dlouhý fragment genu hybridní kinázy, který byl osekvenován u kmene ST2 rodu *Stenotrophomonas*. Získaná sekvence v sobě kompletně zahrnovala 300 bp dlouhý fragment (**Obr. 39, Kap. 4.3.2.1**), přičemž se změnila nasedací sekvence jednoho z dvojice primerů. Sekvence 700 bp dlouhému fragmentu odpovídá úseku 4753316...4754029 genu hybridní kinázy v genomu *S.*

*maltophilia* K279a. Na tento osekvenovaný 700 bp dlouhý úsek byly navrženy specifické primery (700, **Kap. 3.1.3**) a půdní izoláty byly porovnány na základě jeho přítomnosti či nepřítomnosti. 700 bp dlouhý úsek genu hybridní kinázy byl amplifikován u kmenů ST2, ST3, CHR2, CHR3, CHR4 a CHR5. Z primerů pro 700 bp dlouhý úsek byl amplifikován také kratší úsek DNA, dlouhý 600 bp. Tento kratší fragment byl amplifikován u izolátů ST1, ST2, ST3, CHR3, CHR4, CHR5, a nebyl sekvenován. U izolátu CHR1 byl amplifikován pouze 300 bp dlouhý fragment genu hybridní kinázy tetD primery (**Obr. 41**).

MVSSWILLVSVAYAALLFGVAWWGDRRPMYPDRPWLRPVVYSLALAVYCSSWTFYGAVGTA  
 VRRNGVGYLPIYIGPLLLLLFGWRIIERLALIARSQNVVSIADFISSRFGRSRRLAALVAIIALIGI  
 IPYLALQYKAVAMSLQVLTGNTGPTGFFSDPALYVALLMALFATLFGTRQVDATEHHHGMMMLAI  
 ALESVIKLVAMVAVGVFAYVWLSDRNEAVVESVHTLFTGLPPVGFISQTLISFLAIIICLPRQFH  
 VAVVECGDVRDVRRARWMMFGGYLVLSAMVLP IATAGVSLFGTGSSVADDSMVLALPLAEGRNA  
LALIAVGGFSAATGMVIVSSIALATMVSNDLVMPVLLRRSGDHQEAADVSRVLWIRRLAILL  
LALMAYSYYRSSNDSTLASYGLMAFAAVAQFAPGLIGGLYWRGASRRGVETGMLLG FATWLYT  
LLL PAMTIAGWMDDGWVQNGPFGIAWLRPQQLFGMTGWDPLTHGTFWSLLVNAATMMLV SARWR  
 PGVDERLRAAPFLDPYAERPSVAGGWPGHVHVGDLLALASRVVGERHARRSFFEQAQSLGRELQ  
 SSAPADRPWVQFTERLLAASIGAASARLLLLTSLLRSGMDLGEVVAVLDEAGQELRFNREILST  
 TLENISAGVSVVDPDMRLTAWNRRYQDMFGYPDGMLYVGRPVADLIRYNAERGELGEGDIEIQI  
 NRRIGYMRAGSPHVFERTSDGKVIEMRGQALPGGGYVTSYNDITDYKHAERALLEANETLEQR  
 VAERSHEAEVAQQSKTRFLAAISHDVLQPLNAARLFASALRDS DHVSDEQKHLAERVDASLRAA  
EELLDGLLDVSRLDAGGLHPVIGFDVSALMRELAQYTPVAAGRGLRLDLFARPAWVRSRRRL  
LRRVLQNFLANALRYTRQGRIVLAVRQRGDEVELQVWDTGPGIPEHMRQIFDEFHRYQQPFDW  
GEQGLGLGLSICQRISRLLDHRLNARSRVGSGSMFSIILPRVAPLPGYTELVTPAQSV AAPVRS  
 DSLAGIRVLCVDNDEEILDGMRAL LGRWQVQVITAA TVDQALEKIAERPQVMLVDYHLHDRMDG  
LDALVALREAAGYALPGALLTADGRDELKRMARERGYRVLT KPIKPASLRAFLGALRDTGSGDA

**Obr. 39: Domény a aminokyselinové složení hybridní kinázy *S.maltophilia* K279a.**

- šedá ..... Na<sup>+</sup>/solut symportér - podtržená část amplifikovaná primery tetD, červené písmo označuje část amplifikovanou primery 700
- fialová ..... Histidin kináza
- červená .... Regulátor odpovědi



**Obr. 40: Okolí genu pro hybridní kinázu v genomu *S. maltophilia* R551-3 a *S. maltophilia* K279a. Přerušovanou čarou znázorněny ortology.**

Nahoře: *S. maltophilia* R551-3

zleva: *Smlt4621* – gen pro předpokládaný protein MF nadrodiny

*Smlt4622* – gen pro hypotetický protein

*acsA* – gen pro acetylCoA syntetázu

*Smlt4624* – gen pro pravděpodobný regulátor odpovědi dvousložkového systému

*Smlt4626* – gen pro pravděpodobný transmembránový systém

*Smlt4627* – gen pro pravděpodobnou hybridní kinázu

*Smlt4628* – gen pro hypotetický protein – peptidázu S46, peptidázu S7

*hscC* – gen pro transmembránový Hsp70 chaperon

Dole: *S. maltophilia* K279a

zleva: *Smal\_3973* – gen pro pravděpodobný sekretovaný protein

*Smal\_3974* – gen pro acetát/CoA ligázu

*Smal\_3975* – gen pro transkripční regulátor LuxR rodiny

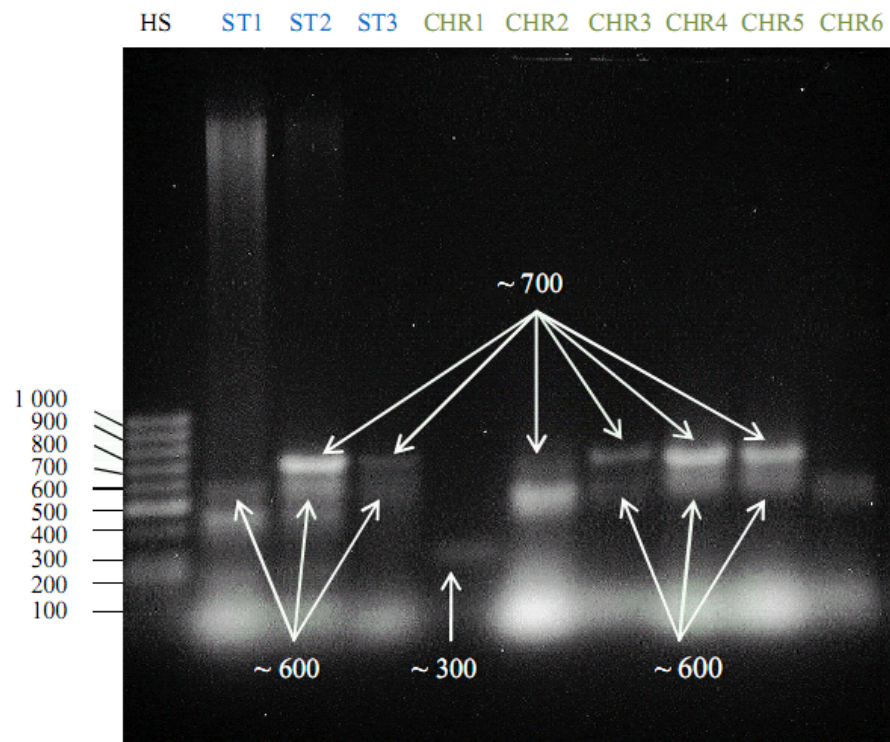
*Smal\_3976* – gen pro protein neznámé funkce DUF1578 – pravděpodobná transponáza

*Smal\_3977* – gen pro protein neznámé funkce DUF204

*Smal\_3978* – gen pro multisenzorovou hybridní histidin kinázu

*Smal\_3979* – gen pro hypotetický protein – peptidázu S46, peptidázu S7

*Smal\_3980* – gen pro protein neznámé funkce DUF490



**Obr. 41: Analýza přítomnosti fragmentu genu hybridní kinázy amplifikovaného primery 700 u půdních izolátů ST1, ST2, ST3 a CHR1-CHR6 a primery tetD u půdního izolátu CHR1.**

## 4.7 HORIZONTÁLNÍ PŘENOS DETERMINANTY REZISTENCE K TETRACYKLINU

### ***Cíl: Prokázání horizontálního přenosu determinanty rezistence do dalších bakteriálních grampozitivních a gramnegativních druhů***

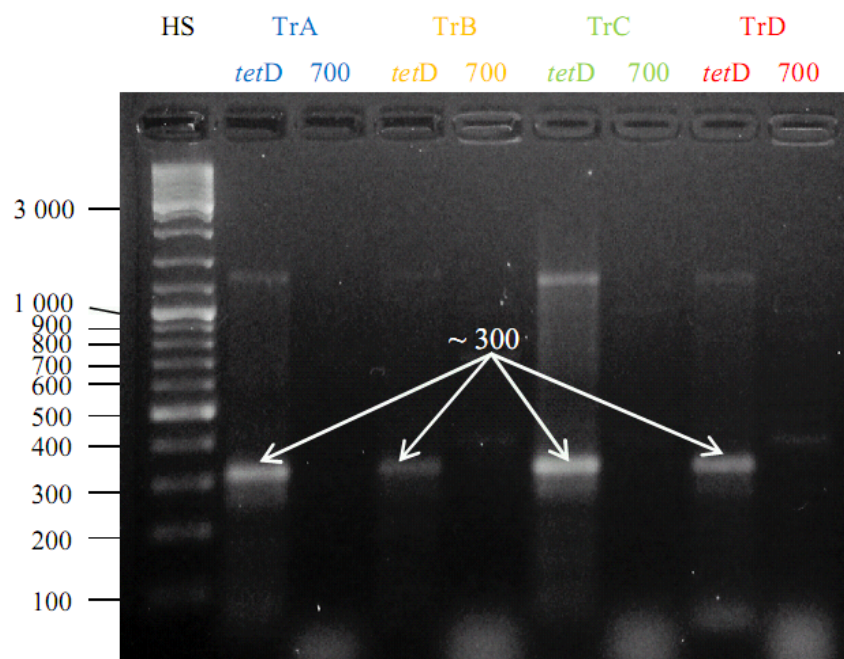
Vzhledem k přítomnosti genu hybridní kinázy specifické pro rod *S. maltophilia* u rodu *Chryseobacterium*, je pravděpodobný její horizontální přenos. Abychom tuto možnost prokázali, provedli jsme konjugativní reakci v laboratorních podmínkách mezi půdním izolátem *Stenotrophomonas* a *Escherichia coli* a mezi půdním izolátem *Stenotrophomonas* a *Bacillus subtilis* (**Kap. 3.2.2.8**). Vzhledem k problémům s pěstováním kultur rodu *S. maltophilia* v tekutém mediu, byla provedena konjugace na pevném agarovém mediu.

Jako donora jsme při konjugativní reakci použili kmen ST2 rodu *Stenotrophomonas* a jako recipienty *E. coli* K-12 Rif<sup>R</sup> a *B. subtilis* 168 Rif<sup>R</sup>, kteří byli izolováni během diplomové práce. Při selekci transkonjugantů bylo využito senzitivity izolátu rodu *Stenotrophomonas* respektive rezistence *E. coli* a *B. subtilis* k rifampicinu (50 µg/ml) (**Kap. 4.2**) a senzitivity *E. coli* a *B. subtilis* k tetracyklinu (15 µg/ml).

Při konjugativní reakci mezi *E. coli* a *S. maltophilia* se nám podařilo získat několik potencionálních transkonjugantů (Tr) *E. coli* rezistentních k tetracyklinu (15 µg/ml). Transkonjuganty označené jako TrB, TrC, TrD byly získány vždy z jedné kolonie, transkonjugant označený jako TrA byl získán setřením nárůstu z pevného media. Že se opravdu jedná o *E. coli* bylo ověřeno porovnáním fenotypů *S. maltophilia* a *E. coli* a genotypově použitím primerů specifických pro *E. coli*. U získaných transkonjugantů byla ověřena metodou PCR (**Kap. 3.2.2.18**) přítomnost fragmentu genu hybridní kinázy (primery tetD a 700, **Kap. 3.1.3**). U všech 4 získaných transkonjugantů se podařilo amplifikovat fragment genu hybridní kinázy o velikosti 300 bp tetD primery. Fragment byl ověřen sekvenčně a shodoval se sekvencí donora ST2. Amplifikace 700 bp fragmentu nebyla přesvědčivá (**Obr. 42, Obr. 43**).

Konjugativní reakcí mezi *S. maltophilia* a *B. subtilis* se nepodařilo získat žádné transkonjuganty rezistentní k tetracyklinu.

Tímto způsobem se podařilo prokázat možnost přenosu hybridní kinázy mezidruhovým horizontálním přenosem.



**Obr. 42: Analýza přítomnosti fragmentu genu hybridní kinázy amplifikovaného primery tetD a 700 u získaných transkonjugantů.**

```

TrA      TGATGGTGCTGGCGTTGCCGCTGGCCGAGGGCCGCAACGCGCTGGCACTGATCGCCTATA 60
ST2     TGATGGTGCTGGCGTTGCCGCTGGCCGAGGGCCGCAACGCGCTGGCACTGATCGCCTATA 60
*****

TrA      TCGGCGGGTTCTCTGCCGCCACCGGCATGGTCATCGTGTCTCGATCGCGTTGGCGACGA 120
ST2     TCGGCGGGTTCTCTGCCGCCACCGGCATGGTCATCGTGTCTCGATCGCGTTGGCGACGA 120
*****

TrA      TGGTCAGCAACGATCTGGTGATGCCGGTGCTGCTGCGTCGCAGTGGCGACCACCAGGAAG 180
ST2     TGGTCAGCAACGATCTGGTGATGCCGGTGCTGCTGCGTCGCAGTGGCGACCACCAGGAAG 180
*****

TrA      CGGCCGATGTCGCCTCGCGGGTGCTGTGGATCCGCCGGCTGGCGATCCTGCTGCTGGCAC 240
ST2     CGGCCGATGTCGCCTCGCGGGTGCTGTGGATCCGCCGGCTGGCGATCCTGCTGCTGGCAC 240
*****

TrA      TGTCCAATGTGA 252
ST2     TGTCCAATGTGA 252
*****

```

**Obr. 43: Srovnání nukleotidových sekvencí fragmentů genu hybridní kinázy amplifikovaných tetD primery u rodu *Stenotrophomonas*, kmene ST2 a transkonjuganta TrA.**

#### 4.8 PŘÍTOMNOST ZNÁMÝCH EFLUXNÍCH PUMP RODU *STENOTROPHOMONAS* U PŮDNÍCH IZOLÁTŮ

**Cíl: Zjištění, zda se v genomech izolátů *Chryseobacterium* sp. nacházejí geny potencionálních transportérů tetracyklinu typických pro *S. maltophilia***

U *S. maltophilia* bylo identifikováno několik MDR efluxních systémů. Při jejich studiu bylo prokázáno, že by se některé z nich mohly podílet na rezistenci klinických izolátů *S. maltophilia* k antibiotikům. Efluxní systémy SmeDEF a SmeJKL jsou spojovány s rezistencí k tetracyklinu (ZHANG *et al.* 2001, CROSSMAN *et al.* 2008).

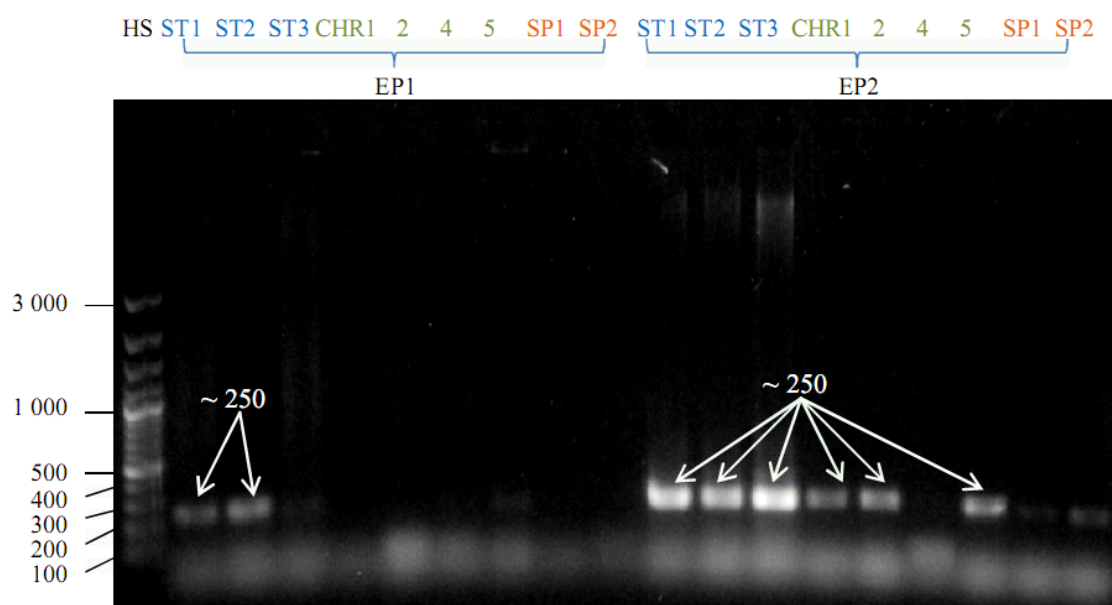
Na efluxní systém SmeJKL, gen *smeL*, byly navrženy specifické primery (EP1, **Kap. 3.1.3**), které byly použity k analýze přítomnosti tohoto efluxního systému u půdních izolátů rodů *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* a *Staphylococcus*. U izolátů rodu *Stenotrophomonas*, kmenů ST1 a ST2, byla amplifikační potvrzena přítomnost části genu *smeL*. Slabé proužky odpovídající velikosti očekávaného produktu byly amplifikovány i u izolátů ST3 a CHR5. (**Obr. 44**).

Dále byly navrženy obecné primery do konzervované oblasti genů dalších efluxních pump rodu *Stenotrophomonas*, a to SmeABC, SmeDEF a SmeVWX (EP3, **Kap. 3.1.3**). Těmito primery byly amplifikovány fragmenty u rodu *Stenotrophomonas*, kmenů ST1, ST2, ST3 a rodu *Chryseobacterium*, kmenů CHR1, CHR2, CHR5 (**Obr. 44**). Fragmenty amplifikované u izolátů rodu *Chryseobacterium* byly osekvenovány. Získané sekvence sdílely vysokou identitu s transportéry RND rodiny identifikovanými u osekvenovaných *S. maltophilia* (**Tab. 8**), a jejich výskyt u *Chryseobacterium* je patrně důsledkem horizontálního přenosu. Nejvyšší identita amplifikovaných fragmentů na aminokyselinové úrovni byla sdílena se SmeW, který je součástí SmeVWX transportního systému u *Stenotrophomonas maltophilia* K279a. Tento protein, je sice v databázích uváděn jako MFP, ale vzhledem k homologii s efluxními pumpami SmeB, SmeE a SmeZ je tento zápis pravděpodobně mylný a SmeW je efluxní pumpou systému SmeVWX. Nukleotidové sekvence amplifikovaných fragmentů u jednotlivých kmenů rodu *Chryseobacterium* mezi sebou sdílely vysokou identitu (98%, **Obr. 45**).

Obecné primery byly použity i u transkonjugantů *E. coli*, a u transkonjugantů TrA, TrB a TrD byly těmito primery amplifikovány fragmenty odpovídající velikosti. Při jejich sekvenaci byl získán smíšený signál, z něž bylo možné vyčíst fragmenty sekvencí genů *acrF* a *acrD* *E. coli* K-12. Tyto geny jsou blízce příbuzné efluxním *sme* genům



ze *Stenotrophomonas*. V mnoha nukleotidových pozicích se objevovalo více peaků, patrně se tedy amplifikovaly i další sekvence. Komplexita signálu však nedovolila jednoznačně určit, zda jsou mezi nimi přítomné i sekvence efluxních genů ze *Stenotrophomonas*.



**Obr. 44:** Analýza přítomnosti fragmentů MDR pump *Stenotrophomonas* u půdních izolátů amplifikovaných primery EP1 a EP2.

Efluxní systémy	GenBank Accession Number	Podobnost s amplifikovaným fragmentem na proteinové úrovni
<i>S. maltophilia</i> K279a – SmeW, rodina RND	YP_001971655	100%
<i>S. maltophilia</i> R551-3 - transportér rodiny Hae-1	YP_002027956.1	97%
<i>X. axonopodis</i> - transportér MexF , rodina RND	NP_641817.1	97%
<i>X. campestris</i> - transportér MexF , rodina RND	YP_001904262.1	97%

**Tab. 8:** Podobnost fragmentů amplifikovaných u *Chryseobacterium* primery EP2 s osekvenovanými transportéry *Stenotrophomonas* na proteinové úrovni.

```

CHR2   GGAGCTGATCGTGCCGATGACCCTGCTGTCCGCGCTGTTGGCGGTGTGGATGACCGGCGG 60
CHR5   GGATCTGATCGTGCCGATGACCCTGCTGTCCGCGCTGTTGGCGGTGTGGATGACCGGCGG 60
CHR1   GGATCTGATCGTGCCGATGACCCTGCTGTCCGCGCTGTTGGCGGTGTGGATGACCGGCGG 60
      *** *****

CHR2   CGACAACAACGTGTTTCGTGCAGGTCGGCCTGGTGGTGTGCTGATGGGCCTGGCGGGCAAGAA 120
CHR5   CGACAACAACGTGTTTCGTGCAGGTCGGCCTGGTGGTGTGCTGATGGGCCTGGCGGGCAAGAA 120
CHR1   CGACAACAACGTGTTTCGTGCAGGTCGGCCTGGTGGTGTGCTGATGGGCCTGGCGGGCAAGAA 120
      *****

CHR2   CGCGATCCTGATCGTCGAGTTCGCCAGAGAGCTGGAAATGGGCGGCAAGGGCATCGTCGA 180
CHR5   CGCGATCCTGATCGTCGAGTTCGCCAGAGAGCTGGAAATGGGCGGCAAGGGCATCGTCGA 180
CHR1   CGCGATCCTGATCGTCGAGTTCGCCAGAGAGCTGGAAATGGGCGGCAAGGGCATCGTCGA 180
      *****

CHR2   AGCGGCACTGGAAGCCTGCCGCCTGCGTCTGCGCCCGATCGTGATGACCTCA 232
CHR5   AGCGGCACTGGAAGCCTGCCGCCTGCGTCTGCGCCCGATCGTGATGACCTCA 232
CHR1   AGCGGCACTGGAAGCCTGCCGCCTGCGTCTGCGCCCGATCGTGATGACCTCA 232
      *****

```

**Obr. 45: Srovnání nukleotidových sekvencí fragmentů amplifikovaných primery EP2 u rodu *Chryseobacterium*. Červeně znázorněny bodové mutace.**

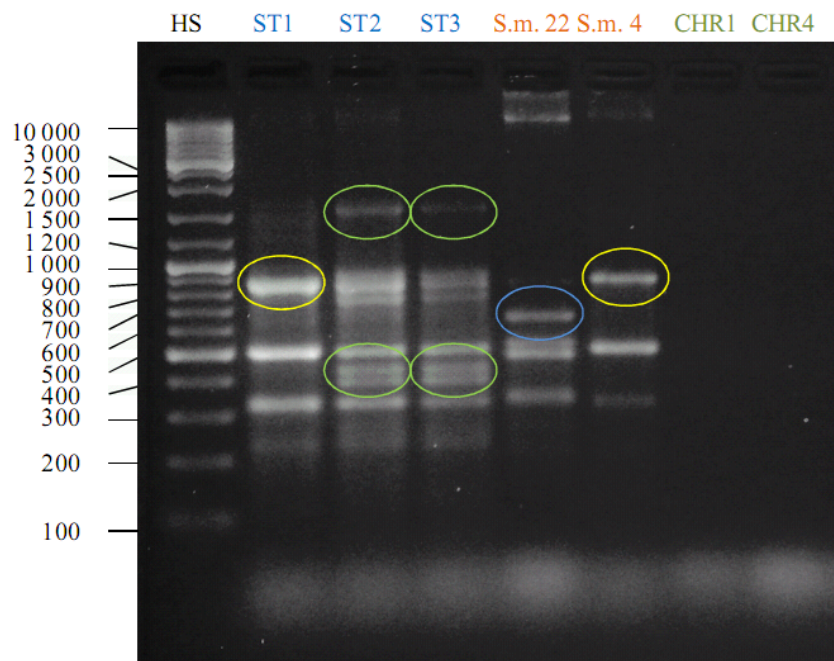
#### 4.9 TYPIZACE *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

##### ***Cíl: Rozlišení izolátů *Stenotrophomonas maltophilia****

K rozlišení jednotlivých izolátů *Stenotrophomonas* byla využita přítomnost REP sekvencí v genomu. Tyto vysoce repetitivní sekvence a jejich rozmístění v genomech *Stenotrophomonas* jsou specifické pro jednotlivé linie (NUNVAR *et al.* 2010). K typizaci jednotlivých linií byly použity specifické primery Smal4 (**Kap. 3.1.3**) komplementární k části sekvence REP elementu Smal4 (NUNVAR *et al.* 2010). Tyto primery byly použity u půdních izolátů rodu *Stenotrophomonas*, kmene ST1, ST2, ST3 a izolátů *S. maltophilia* 4 a *S. maltophilia* 22, které byly zapůjčeny z Ústavu půdní biologie v Českých Budějovicích.

Podle získaných REP profilů *Stenotrophomonas* můžeme rozlišit 3 různé linie *S. maltophilia* – ST1, ST2 a *S. maltophilia* 22. Izoláty ST2 a ST3 respektive ST1 a *S. maltophilia* 4 lze pravděpodobně považovat za klonálně příbuzné (**Obr. 46**).

Vzhledem k prokázanému přenosu chromozomální DNA ze *Stenotrophomonas* do *Chryseobacterium* existuje možnost, že se v přeneseném úseku DNA budou vyskytovat REP elementy. U izolátů CHR1 ani CHR4 však nebyla prokázána přítomnost sekvencí amplifikovatelných s použitím primerů odvozených od REP elementů.



**Obr. 46: Porovnání REP profilů u izolátů *S. maltophilia*, které byly získány amplifikací s využitím Smal4 primerů.**

vysvětlivky – žlutá: společný znak kmene ST1 a *S. maltophilia* (S.m.) 4

zelená: společný znak kmenů ST2 a ST3

modrá: unikátní znak *S. maltophilia* (S.m.) 22

## 5. DISKUZE

Frekvence rezistence k antibiotikům má u bakterií stále stoupající tendenci a některé bakteriální kmeny jsou dnes již rezistentní ke všem používaným antibiotikům. Abychom byli schopní na tuto situaci reagovat a nemuseli se vrátit do preantibiotické doby, je nutné porozumět všem mechanismům rezistence a způsobům, jak se mohou determinanty rezistence mezi bakteriemi rozšiřovat.

Cílem této práce bylo identifikovat determinanty rezistence k tetracyklinu u půdních izolátů grampozitivních a gramnegativních bakterií, které pocházejí z nehnojené půdy a z půdy hnojené mrvou kontaminovanou tímto antibiotikem.

Velká část této práce spočívala v identifikaci determinanty rezistence k tetracyklinu metodou PCR. Tento postup byl zvolen po zjištění, že u půdních izolátů nejsou přítomné mimochromozomální elementy (**Kap. 4.3.1**).

V současnosti je známo 43 různých determinant rezistence k tetracyklinu, které jsou nalézány u různých mikroorganismů s různou četností (ROBERTS 2010b, ROBERTS 2010a, ROBERTS 2010c). V této práci jsme vybrali dvacet tři determinant rezistence k tetracyklinu, které jsou v prostředí a u různých izolátů rozšířené (**Kap. 4.3.2**).

U izolátů grampozitivních bakterií jsme analyzovali přítomnost všech determinant zahrnutých do studie, které patří do skupiny RPP a část determinant efluxních pump, u kterých byla prokázána možnost výskytu u grampozitivních bakterií. U obou izolátů rodu *Staphylococcus* byla metodou PCR a poté sekvenací prokázána přítomnost determinanty rezistence k tetracyklinu *tet(K)*, která kóduje specifickou efluxní pumpu. Její výskyt u rodu *Staphylococcus* není překvapivý, tato determinanta rezistence k tetracyklinu byla identifikována u izolátů rodu *Staphylococcus* z různých prostředí a zdrojů a je považována u tohoto rodu za původní (**Kap. 4.3.2.2**) (SCHWARZ *et al.* 1998, SCHMITZ *et al.* 2001, HAUSCHILD *et al.* 2003). U izolátu rodu *Arthrobacter* byla vyloučena přítomnost determinant rezistence k tetracyklinu *tet(30)*, *tet(34)*, *tet(D)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(X)* a *tet(Z)*. U tohoto izolátu se podařilo amplifikovat determinantu *tet(M)*, ale tento výsledek se nepodařilo ověřit sekvenační analýzou (**Kap. 4.3.2.3**). Determinanta *tet(M)* byla u rodu *Arthrobacter* již dříve identifikována (ROBERTS 2010a). U tohoto izolátu je dále nutné analyzovat

přítomnost determinanty *tet(33)*, jejíž přítomnost byla u rodu *Arthrobacter* nedávno zaznamenána (AGERSO a SANDVANG 2005).

U studovaných izolátů gramnegativních bakterií rodu *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* byla analyzována přítomnost všech dvaceti třech determinant rezistence tetracyklinu zahrnutých do naší studie (**Kap. 4.3.2**). U všech kmenů izolátů *S. maltophilia* i *Chryseobacterium sp.* byla vyloučena přítomnost determinant *tet(30)*, *tet(34)*, *tet(B)*, *tetB(P)*, *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tet(X)*, *tet(Y)*, *tet(Z)* a *otr(A)*. Primery *tetD*, které jsou specifické pro determinantu *tet(D)* identifikované dosud u jedenácti bakteriálních druhů, jsme však amplifikovali fragment o velikosti 300 bp, který se svou velikostí liší od předpokládané. Po jeho osekvenování bylo zjištěno, že se jedná o část hybridního genu kódujícího Na<sup>+</sup>/solut symportér a histidinovou kinázu specifického pro *S. maltophilia*, který dosud nebyl dáván do souvislosti s rezistencí k antibiotikům (**Kap. 4.3.2.1**).

Přítomnost genu hybridního proteinu (hybridní kinázy) u izolátů *Chryseobacterium sp.* je s nejvyšší pravděpodobností důsledkem horizontálního přenosu, který může být stimulován nízkou koncentrací antibiotika v prostředí. V nehnojené půdě by mohla být takto nízká hladina antibiotika udržována přítomností producentů antibiotik, v případě tetracyklinu tedy streptomycét, kteří by vytvářeli selekční tlak na organizmy ve stejné nioce (BENVENISTE a DAVIES 1973, D'COSTA *et al.* 2007, SONG *et al.* 2009). K stimulaci horizontálního přenosu mohlo však dojít i během inkubace půdních vzorků s nízkou koncentrací tetracyklinu při laboratorním experimentu. Gen hybridního proteinu byl ale identifikován i u izolátů CHR5 a CHR6, které pocházejí z hnojené půdy a byly před izolací inkubovány v nulové koncentraci tetracyklinu a tedy bez přímého selekčního tlaku (**Kap. 3.1.1**). V tomto případě lze tedy předpokládat, že horizontální přenos proběhl již v půdním ekosystému.

Vzhledem k tomu, že jsme nezjistili přítomnost plazmidů u žádného ze studovaných půdních izolátů, lze uvažovat o přítomnosti integronu nebo transpozonu. U některých konjugativních transpozonů bylo prokázáno zvýšení pravděpodobnosti horizontálního přenosu v přítomnosti nízké koncentrace tetracyklinu. Geny rezistence k tetracyklinu byly identifikovány na integronech I. třídy (SHOWSH a ANDREWS 1992, WHITE *et al.* 2001, SONG *et al.* 2009). Přenos integronů však bývá spojen s přítomností plazmidů, proto se lze spíše přiklonit k možnosti, že se u studovaných půdních izolátů vyskytují konjugativní transpozony.

Abychom prokázali možnost horizontálního přenosu, pokusili jsme se simulovat konjugativní reakci v laboratorních podmínkách. Konjugací na pevném mediu se nám podařilo získat několik transkonjugantů *E. coli* rezistentních k tetracyklinu. Následně byl u těchto transkonjugantů amplifikován fragment genu hybridního proteinu, který byl sekvenčně identický se sekvencí fragmentu donora (**Kap. 4.7**). Žádné transkonjuganty se nám nepodařilo získat konjugací mezi *Stenotrophomonas maltophilia* a *Bacillus subtilis*. Vzhledem k tomu, že ke konjugaci mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi dochází obecně méně často, nelze z tohoto výsledku vyvozovat žádné závěry. Nižší pravděpodobnost proběhnutí konjugativní reakce je spojena s tloušťkou peptidoglykanové vrstvy u grampozitivních bakterií, která může bránit vytvoření funkčního kontaktu mezi bakteriemi. I když v případě konjugativního transpozonu Tn916 se podařilo prokázat jeho horizontální přenos z gramnegativního donora do grampozitivního recipienta a následně došlo i jeho expresi v recipientní buňce. I v tomto pokusu byl však transpozon vnesen do donorové buňky při konjugaci na mobilním plazmidu a není tedy úplně jasné, zda nedošlo k přenosu díky přítomnosti plazmidu a za použití jeho transferových funkcí (BERTRAM *et al.* 1991). V našem případě se pravděpodobně jedná o horizontální přenos většího úseku DNA, bez přítomnosti plazmidu, a mohlo tedy dojít k destabilizaci kontaktu a přerušení konjugativní reakce před dokončením přenosu nebo tento přenos nebyl vůbec iniciován. Kromě toho existují bariéry v heterologní expresi proteinů z gramnegativních bakterií u grampozitivních bakterií a nelze tedy vyloučit, že po dokončeném přenosu nedošlo k expresi přenesené determinanty rezistence k tetracyklinu v donorové buňce *Bacillus subtilis* (BERTRAM *et al.* 1991, COURVALIN 1994).

Za účelem identifikace determinant rezistence, které nebylo možné zachytit metodou PCR, jsme vytvořili knihovnu DNA za použití vektoru pCC1BAC a kompetentních buněk TransformMax EPI300 (**Kap. 4.4**). Podobný experiment byl proveden KAZIMIERCZAK *et al.* (2009), kteří za použití stejného vektoru identifikovali 3 známé a 2 nové determinanty rezistence k tetracyklinu v metagenomické knihovně. V našem případě se nám ani po opakování experimentu nepodařilo získat žádný klon rezistentní k tetracyklinu. Tento výsledek lze vysvětlit několika způsoby: 1) Funkční determinanta má více složek, jak je tomu například u efluxních pump RND superrodiny (**Kap. 2.2.2.3**). Pokud by se všechny ze složek nevyskytovaly na stejném fragmentu DNA, nedošlo by k vytvoření funkčního komplexu. Většina známých efluxních pump

rezistence k tetracyklinu patří ale do superrodiny MF (**Kap. 2.1.2.1**), které jsou pravděpodobně tvořeny pouze jedním peptidovým řetězcem s různým počtem TMS (SAIER *et al.* 1999, LOMOVSKAYA a WATKINS 2001, SAIDIJAM *et al.* 2006). KAZIMIERCZAK *et al.* (2009) se obdobným experimentem podařilo identifikovat zástupce determinant rezistence k tetracyklinu ze skupiny efluxních pump i RPP. 2) Je možné, že exprese hledané determinanty je složitěji regulována a tento regulátor nebyl v *E. coli* exprimován. Avšak konjugativní reakcí byly získány rezistentní transkonjuganty *E. coli* a hledaná determinanta rezistence k tetracyklinu byla tedy v *E. coli* funkční. 3) Mohlo dojít k restrikci v úseku DNA kódujícím hledanou determinantu. I když při našem experimentu jsme vytvořili tři různé typy knihoven při restrikci chromozomální DNA třemi různými enzymy s různou frekvencí štípání. *PsuI* však generovalo většinu fragmentů o velikosti menší než délka průměrného genu (**Obr. 37**). 4) Při experimentu jsme i po optimalizování podmínek získávali relativně málo klonů s inzertem v plazmidu. Vzhledem k velikosti genomu bakteriálních izolátů a tedy relativně nízké pravděpodobnosti získání klonu s determinantou je možné, že nedošlo k inzerci fragmentu s hledanou determinantou. Z tohoto důvodu jsme experiment opakovali, ale ani při opakování nezískali klon rezistentní k tetracyklinu. Při tomto experimentu nebyl k dispozici izolát rodu *Arthrobacter*. U tohoto izolátu jsme tedy v této studii s určitostí neidentifikovali přítomnou determinantu rezistence.

Vzhledem k tomu, že jsme zaznamenali probíhající horizontální přenos mezi rody *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* a nepodařilo se nám u těchto izolátů identifikovat žádnou známou determinantu rezistence, pokračovali jsme ve studiu genu hybridní kinázy a jeho horizontálního přenosu. U dvou půdních izolátů *Stenotrophomonas* a jednoho izolátu *Chryseobacterium* jsme se pokusili metodou hybridizace určit velikost restrikčního fragmentu a počet kopií genu hybridní kinázy v jejich genomu. Jako sonda byl použit fragment genu hybridní kinázy, který byl amplifikován u všech studovaných izolátů gramnegativních bakterií. Z výsledků provedené hybridizace je patrné, že izoláty rodů *Stenotrophomonas* (kmeny ST1, ST2) a *Chryseobacterium* (kmen CHR1) mají stejný hybridizační profil při restrikci enzymem *PsuI* (**Obr. 38**). Je pravděpodobné, že tyto části DNA u izolátu rodu *Chryseobacterium*, u kterých došlo k hybridizaci se sondou, pocházejí z izolátu rodu *Stenotrophomonas*. Z množství shodných signálů lze usuzovat, že došlo k přenosu většího fragmentu DNA a gen hybridního proteinu se vyskytuje v tomto fragmentu



ve více kopiích (**Kap. 4.5**). Izolát rodu *Chryseobacterium* CHR1 jako jediný z rodu *Chryseobacterium* pocházel z hnojené půdy, ze které nepochází žádný studovaný izolát *Stenotrophomonas*.

Při porovnání hybridizačních profilů u DNA naštípané restrikčními enzymy PstI, BclI i BglII se zdá, že by donorem při horizontálním přenosu do *Chryseobacterium* mohl být izolát rodu *Stenotrophomonas* ST2. Vzhledem k tomu, že mikroorganismy rodu *Stenotrophomonas* jsou v prostředí velmi rozšířené, je možné, že linie ST2 se vyskytuje v hnojené i nehnojené půdě a tato linie byla donorem při horizontálním přenosu. U ostatních izolátů rodu *Chryseobacterium* nebyla hybridizace prováděna a nelze tedy určit, zda byl donor při horizontálním přenosu shodný nebo rozdílný než u CHR1.

Zůstává otázkou, zda by mohl tento hybridní protein plnit roli efluxního proteinu rezistence k tetracyklinu. Pokud vezmeme v úvahu teorii, že determinanty rezistence mohly vzniknout z prekursorů, které byly citlivé na přítomnost antibiotik nebo k nim měly malou afinitu a původně plnily jinou funkci, nelze vyloučit, že by se tento hybridní protein na rezistenci *Stenotrophomonas maltophilia* k tetracyklinu podílet mohl (AMINOV a MACKIE 2007, WRIGHT 2007).

Identifikovaný hybridní protein není klasickou efluxní pumpou, ale jedna z jeho domén je Na<sup>+</sup>/solut symportér, u kterého bylo predikováno 10 TMS úseků a u kterého není známa substrátová specifita. Z hlediska zařazení do rodiny transportérů tvoří Na<sup>+</sup>/solut symportéry zvláštní nadrodinu (SSSS), jejichž mechanismus kotransportu se neliší od nadrodiny H<sup>+</sup>/symportérů (tedy MF nadrodiny, **Kap. 2.2.2.2**) (GRIFFITH *et al.* 1992, REIZER *et al.* 1994). Při porovnání aminokyselinové sekvence Na<sup>+</sup>/solut symportérové domény hybridního proteinu s MDR pumpami patřícími do rodiny MF, není patrna příliš vysoká identita (14% identita s proteinem NorA *S. aureus*, 15% identita s proteinem QacA *S. aureus*). O něco vyšší identita byla zjištěna při porovnání se specifickými transportéry tetracyklinu MF nadrodiny na aminokyselinové úrovni (20,6% identita s proteinem Tet(A) *E. coli*, 20,1% s proteinem Tet(B) *Pseudomonas* sp., 22% identita s proteinem Tet(D) *Salmonella* sp.).

Dále jsme porovnali symportérovou doménu hybridního proteinu na aminokyselinové úrovni se známými IMP, které jsou součástí MDR efluxních pump RND rodiny *S. maltophilia* (**Kap. 2.3.1.1**). Někteří ze zástupců těchto efluxních systémů jsou spojováni s rezistencí k tetracyklinu. Ani v tomto případě nebyla zjištěná identita na aminokyselinové úrovni příliš vysoká (8,1% identita s proteinem SmeE, 3,2%

identita s proteinem SmeB, 9,7% identita s proteinem SmeZ *S. maltophilia* K279a). Identita symportérové domény hybridního proteinu s transportními systémy, které rozeznávají antibiotika, tedy není dostatečně vysoká, aby jednoznačně vypovídala o sekvenční homologii.

Na základě výše popsaných získaných výsledků nelze vyloučit ani potvrdit podíl hybridního proteinu na rezistenci k tetracyklinu u studovaných půdních izolátů. Vzhledem k tomu, že došlo k přenosu genu hybridního proteinu při konjugativní reakci, je možné, že je hledanou determinantou rezistence. Je také pravděpodobné, že se gen pro hybridní protein, nebo pouze část pro symportérovou doménu, vyskytuje na mobilním elementu ve více kopiích, čemuž odpovídají i shodné výsledky hybridizace u izolátů rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*. To by mohlo napovídat, že je tato doména nějak spojena s rezistencí k tetracyklinu a pod selekčním tlakem došlo k duplikaci genu v rámci mobilního elementu. Na druhé straně je ale možné, že by na mobilním elementu mohla být přítomná i neidentifikovaná determinanta rezistence k tetracyklinu a při konjugativní reakci by došlo k jejímu přenosu společně s hybridní kinázou. Transkonjuganty by pak projevovaly rezistenci k tetracyklinu.

Protože *S. maltophilia* byla donorem při horizontálním přenosu, který pravděpodobně proběhl v půdě, pokusili jsme se u půdních izolátů analyzovat přítomnost dalších efluxních pump, které se podílejí na rezistenci u *S. maltophilia* (**Kap. 2.3.1.1**). Specifické primery byly navrženy na část operonu kódujícího efluxní systém *smeJKL* (**Kap. 2.3.1.1.1**), který je spojován s rezistencí k tetracyklinu (CROSSMAN *et al.* 2008). Přítomnost *smeL* byla amplifikací potvrzena u izolátů rodu *Stenotrophomonas*. Slabý proužek byl amplifikován také u izolátu CHR5 rodu *Chryseobacterium*. Tento fragment nebyl zatím osekvenován, ale jeho velikost odpovídá velikosti očekávané (**Obr. 44**).

Dále byla analyzována přítomnost dalších efluxních systémů rodu *Stenotrophomonas*, které jsou kódovány geny *smeABC*, *smeDEF* a *smeVWX*. Na části těchto operonů byly navrženy degenerované primery. Efluxní systém SmeABC pravděpodobně nefunguje jako klasický efluxní systém, ale byla prokázána souvislost SmeC a rezistence k  $\beta$ -laktamům (LI *et al.* 2002) (**Kap. 2.3.1.1.2**). Systém SmeDEF pravděpodobně souvisí s rezistencí tetracyklinu, chloramfenikolu, erytromycinu a chinolonům

(ALONSO a MARTINEZ 2000) (**Kap. 2.3.1.1.3**). Ostatní efluxní systémy nebyly zatím dopodrobna analyzovány.

V případě izolátů rodů *Chryseobacterium* a *Stenotrophomonas* se nám podařilo amplifikovat *smeW*, část efluxního systému, který je kódován geny *smeVWX* (**Kap. 4.8**). Je možné, že *smeW* je součástí mobilního elementu společně s genem hybridního proteinu, k jehož přenosu došlo při simulaci konjugace. Vzhledem k tomu, že při amplifikaci *smeW* u transkonjugantů *E. coli* byl získán směsný sekvenační signál, nelze u nich vyloučit přítomnost *smeW* a tedy ani jeho přenos při konjugaci.

K přenosu genu *smeW* ze *Stenotrophomonas* mohlo dojít již v půdním ekosystému nebo při kultivaci vzorků půdy s nízkou koncentrací tetracyklinu při laboratorním pokusu (**Kap. 3.1.1**). Tomu napovídá i identifikace *smeW* u izolátů CHR1 a CHR2, které byly inkubovány v 0,1 mg Tc . kg<sup>-1</sup> společně s izolátem ST2, který mohl být donorem při horizontálním přenosu genu hybridního proteinu (viz výše). Třetím izolátem, u kterého byl amplifikován gen *smeW* byl CHR5, který byl inkubován s nulovou koncentrací tetracyklinu společně s CHR6, u kterého *smeW* amplifikován nebyl. V případě CHR5 tedy pravděpodobně došlo k horizontálnímu přenosu již v půdním ekosystému. Je tedy možné, že horizontální přenos probíhal v půdním ekosystému i při inkubačním pokusu v laboratoři.

Je možné, že přítomnost *smeL* a *smeW* má vliv na rezistenci půdních izolátů rodu *S. maltophilia* k tetracyklinu. V případě *S. maltophilia* nejedná o klasického nemocničního patogena a je pravděpodobné, že se u ní rezistence vyvinula již dávno v původním habitatu, kterým často bývá rhizosféra rostlin a půdní ekosystém. Tedy oblasti, kde se vyskytují i producenti antibiotik (BERG *et al.* 2005, MARTINEZ 2009). Tento fakt ale také vysvětluje přítomnost velkého množství MDR efluxních systémů v genomu *S. maltophilia*, které nepochybně přispívají vysokou měrou a k její přirozené rezistenci k velkému množství antibiotik. Je proto pravděpodobné, že tyto izoláty jsou přirozeně rezistentní k tetracyklinu právě díky přítomnosti MDR pump a proto se nám nepodařilo identifikovat známou determinantu rezistence k tetracyklinu u izolátů *Stenotrophomonas*. Zvláště když některé duhy rodu *Stenotrophomonas* jsou producentem maltophilinu, látky odvozené od polyketidů, kam patří i tetracykliny (JAKOBI *et al.* 1996).

Studované půdní izoláty byly izolovány z půdy ze dvou míst téže lokality – z hnojené a nehnojené půdy přičemž půdní vzorky byly inkubovány v různých koncentracích tetracyklinu. Proto jsme se pokusili izoláty porovnat z hlediska rezistence k tetracyklinu (**Kap. 4.1**) a tyto hodnoty dát do kontextu získaných výsledků.

U izolátu z hnojené půdy rodu *Chryseobacterium*, kmene CHR1, byla zjištěna intermediární hodnota MIC tetracyklinu - 8 µg/mL (**Kap. 4.1.1**). Tato hodnota byla ověřena i agarovou diluční metodou (**Kap. 4.1.2**). U ostatních izolátů rodu *Chryseobacterium* z nehnojené půdy, byla zjištěna MIC 16 µg/mL a 24 µg/mL. Tento rozdíl, mezi izoláty z hnojené a nehnojené půdy, by mohl být způsoben přítomností různých determinant rezistence. Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo identifikovat známou determinantu rezistence k tetracyklinu, lze tuto možnost připustit. Další možností je, že u jednotlivých izolátů rodu *Chryseobacterium* existuje různá hladina exprese nebo odlišné množství kopií stejné determinanty v genomu. Kromě toho, rody *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* jsou fylogeneticky vzdálené a je pravděpodobné, že se bude lišit i účinnost exprese v porovnání s původním hostitelem *Stenotrophomonas*. Účinnost exprese může být odlišná i u jednotlivých druhů rodu *Chryseobacterium*. Funkčnost determinanty u izolátu CHR1 by mohla být snížena i vlivem bodových mutací. Pokud by touto determinantou byl identifikovaný hybridní protein, bodové mutace by mohly vysvětlit, proč se nepodařilo u tohoto izolátu amplifikovat větší 700 bp dlouhý fragment hybridního proteinu (**Kap. 4.6**).

Izoláty rodu *Stenotrophomonas* byly všechny získány z nehnojené půdy (**Kap. 3.1.1**) a u všech byla stanovena stejná hodnota MIC 24 µg/mL (**Kap. 4.1.1**). Tato shoda MIC u izolátů rodu *Stenotrophomonas* ukazuje na přítomnost stejné determinanty rezistence. Při porovnání s hodnotou MIC<sub>90</sub> tetracyklinu u klinických izolátů, u kterých byla stanovena na 64 µg/ml, se zdá relativně nízká. V případě těchto klinických izolátů by však mohla být spojena se zvýšenou expresí nějakého efluxního MDR systému. V jiné studii se MIC tetracyklinu pohybovala v rozmezí 4-32 µg/ml u různých linií *S. maltophilia* (ALONSO a MARTÍNEZ 1997, VALDEZATE *et al.* 2001).

U izolátů rodu *Staphylococcus* byla hodnota MIC stanovena na 24 µg/mL respektive 32 µg/mL (**Kap. 4.1.1**). Oba izoláty *Staphylococcus* pocházejí z nehnojené půdy, která byla inkubována s odlišnou koncentrací tetracyklinu (**Kap. 3.1.1**). U obou těchto izolátů byla identifikována stejná determinanta rezistence *tet(K)*, a její nukleotidová sekvence byla u obou izolátů identická (**Kap. 4.3.2.2**). Regulace exprese determinanty *tet(K)* je kontrolována atenuací a pravděpodobně je i pod kontrolou MgrA (SCHWARZ

*et al.* 1992, LUONG *et al.* 2006). Izolát SP2, u kterého byla stanovena vyšší MIC tetracyklinu, byl inkubován v laboratorním experimentu ve vyšší koncentraci tetracyklinu a je možné, že během této inkubace došlo působením selekčního tlaku ke zvýšení hladiny exprese *tet(K)* determinanty vlivem mutace a tedy i přizpůsobení dané koncentraci tetracyklinu.

U jediného izolátu rodu *Arthrobacter*, který pochází z hnojené půdy, byla hodnota MIC stanovena na 24 µg/mL (**Kap. 4.1.1**), stejně jako u izolátů rodů *Stenotrophomonas* a *Staphylococcus*. Tato hodnota je vyšší, než ve studii klinických izolátů *Arthrobacter* provedené FUNKE (1996). U tohoto izolátu nebyl amplifikován fragment genu hybridní kinázy *Stenotrophomonas* nebo genu efluxní pumpy *tet(K)* rodu *Staphylococcus* (**Kap. 4.3.2.3**).

U studovaných půdních izolátů byla stanovena i citlivost k určité koncentraci vybraných antibiotik. Studované půdní izoláty rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* byly rezistentní k ampicilinu (100 µg/ml, patří do skupiny penicilinů), streptomycinu (340 µg/ml), spektinomycinu (0,5 µg/ml), kanamycinu (30 µg/ml, skupina aminoglykosidů), erytromycinu (0,3 µg/ml, skupina makrolidů) a chloramfenikolu (5 µg/ml, skupina amfenikolů). Společná pro izoláty rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* byla i senzitivita k rifampicinu (50 µg/ml, skupina ansamycinů) a nalidixové kyselině (20 µg/ml, skupina chinolonů) (**Kap. 4.2**).

Klinické izoláty rodu *Stenotrophomonas*, které jsou studované více než izoláty environmentální, jsou často rezistentní k tetracyklinům, β-laktamům (kam patří peniciliny, karbapenemy, cefalosporiny a monobaktamy), aminoglykosidům a fluorochinolonům (ZHANG *et al.* 2001, CHANG *et al.* 2004). Vzhledem k přítomnosti β-laktamázy, acetyltransferázy, MDR systémů a snížené permeability vnější membrány u *S. maltophilia*, není rezistence k různým třídám antibiotik překvapivá (WALSH *et al.* 1997, LAMBERT *et al.* 1999, ALONSO a MARTINEZ 2000, AVISON *et al.* 2001). Přítomnost nízké koncentrace tetracyklinu, které byly izoláty vystaveny pravděpodobně již v půdě a poté při inkubaci půdních vzorků, může také stimulovat expresi MDR systému, který rozeznává jako své substráty i další antibiotika, jak bylo popsáno ALONSO a MARTÍNEZ (1997). Potom tedy ani rezistence studovaných půdních izolátů k výše uvedeným testovaným antibiotikům není udivující. Zvláště pokud vezmeme v úvahu, jaké byly použité koncentrace antibiotik

v naší studii. Například u klinických izolátů byla stanovena hodnota MIC<sub>90</sub> (koncentrace antibiotika, která inhibuje 90% bakterií) kanamycinu na >256 µg/ml, erytromycinu na 256 µg/ml, nalidixové kyseliny na 32 µg/ml, chloramfenikolu na 64 µg/ml. Tyto minimální inhibiční koncentrace jsou tedy mnohem vyšší než koncentrace použité v naší studii.

Podobně i u izolátů rodu *Chryseobacterium* byla popsána přirozená rezistence k aminoglykosidům, chloramfenikolu, β-laktamům a polymyxinům. Se *S. maltophilia* tedy sdílí podobný profil rezistence. U některých druhů rodu *Chryseobacterium* byla popsána i rezistence k erytromycinu, ke kterému byly rezistentní i námi studované půdní izoláty rodu *Chryseobacterium* (ROSSOLINI *et al.* 1998, ROSSOLINI *et al.* 1999, CHANG *et al.* 2004). V případě chloramfenikolu byl rezistentní pouze izolát CHR4. Tento izolát byl inkubován ve střední koncentraci tetracyklinu (1,0 mg Tc · kg<sup>-1</sup>) společně s izoláty *Stenotrophomonas* ST1 a ST3, které byly také klasifikovány jako rezistentní k chloramfenikolu. Vzhledem k tomu, že ostatní izoláty rodu *Chryseobacterium* byly k chloramfenikolu středně senzitivní, lze se důvodně domnívat, že u CHR4 byla determinanta rezistence k chloramfenikolu rovněž získána horizontálně, možná od *S. maltophilia*.

U studovaných izolátů rodu *Staphylococcus* byl profil rezistence k antibiotikům s výjimkou chloramfenikolu shodný. Izoláty rodu *Staphylococcus* nesou často mobilní elementy s geny rezistence a častý je i výskyt efluxních pump (HASSAN *et al.* 2007). Studované izoláty byly rezistentní k použitým koncentracím nalidixové kyseliny a erytromycinu a středně rezistentní k použité koncentraci spektinomycinu, izolát SP2 byl rezistentní také k chloramfenikolu. Rezistence k nalidixové kyselině a chloramfenikolu je spojována s přítomností efluxní pumpy NorA a je tedy možné, že se vyskytuje i u izolátu SP2 (UBUKATA *et al.* 1989, NEYFAKH *et al.* 1993).

Studovaný izolát rodu *Arthrobacter* byl rezistentní k použité koncentraci spektinomycinu, nalidixové kyseliny a streptomycinu. Některé druhy rodu *Arthrobacter* jsou producenty erytromycinu a jsou k němu přirozeně rezistentní (ROBERTS *et al.* 1985). Náš studovaný izolát byl senzitivní ke koncentraci 0,3 µg/ml erytromycinu. Pravděpodobně se tedy neřadí k producentům tohoto antibiotika.

V poslední části jsme se pokusili rozlišit jednotlivé studované izoláty *S. maltophilia* na základě přítomnosti REP sekvencí v genomu. K typizaci jednotlivých linií jsme

využili poznatky o dynamice a variabilitě REP elementů a specifické primery Smal4, které jsou komplementární k části sekvence REP elementu Smal4 (NUNVAR *et al.* 2010). Tyto primery byly použity u půdních izolátů rodu *Stenotrophomonas* (**Kap. 4.9**). Na základě výsledků získaných REP profilů izolátů *S. maltophilia* jsme byli schopni rozlišit tři různé linie. Toto rozlišení souhlasí i s rozdíly v restričních profilech jednotlivých izolátů, které byly zjištěny při hybridizaci. Bylo tedy ověřeno, že specifické REP elementy lze využít při typizaci *S. maltophilia*. Zda bude možné tento systém využít v praxi, případně i u dalších mikroorganismů, bude nutné dále analyzovat.

V této studii se nám podařilo zachytit intenzivně probíhající recentní horizontální přenos mezi fylogeneticky velmi vzdálenými rody *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*. Většina námi studovaných kmenů pochází z půdy, která nebyla pod přímým selekčním tlakem tetracyklinu, což svědčí o tom, že je v tomto ekosystému vytvořen rezervoár genů rezistence k tetracyklinu a pravděpodobně i k dalším antibiotikům. Některé výsledky také nasvědčují, že horizontální přenos byl stimulován i při inkubaci půdy v nízkých koncentracích tetracyklinu. Zachycený přenos genů je prvním popsáním probíhajícím horizontálním přenosem mezi rody *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*.

To, že se nám podařilo prokázat možnost horizontálního přenosu mezi *S. maltophilia* a *E. coli* také ukazuje na určitou nebezpečnost *S. maltophilia*. Vzhledem k tomu, že *S. maltophilia* je rozšířený mikroorganismus, který se vyskytuje i v nemocničním prostředí, může být donorem v procesu rozšiřování determinant rezistence k různým antibiotikům do nemocničních patogenů. A to tím více, že byl prokázán i probíhající horizontální přenos mezi grampozitivními bakteriemi a *Stenotrophomonas*, což znásobuje možný potenciál přítomnosti různých determinant rezistence.

Poněvadž byl zjištěn i přenos částí efluxního systému specifického pro rod *Stenotrophomonas* u kterého není známá substrátová specifita, bylo by zajímavé zjistit, jaký by mohl být jeho podíl na rezistenci k tetracyklinu, případně i analyzovat přítomnost dalších blízce příbuzných širokospektrých efluxních pump u rodu *Chryseobacterium*. Tyto efluxní systémy, které jsou všudypřítomné, by mohly hrát roli v procesu antropogenních změn bakteriálního půdního ekosystému.

## 6. SOUHRN

Cílem mé diplomové práce bylo identifikovat genetické determinanty rezistence k tetracyklinu u půdních izolátů z hnojené a nehnojené půdy ze stejné oblasti v České Republice a pokusit se nastínit možnosti rozšiřování těchto determinant mezi jednotlivými bakteriálními druhy.

Bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Určili jsme MIC tetracyklinu u studovaných půdních izolátů.
2. Vyloučili jsme přítomnost mimochromozomální DNA u všech půdních izolátů.
3. Identifikovali jsme přítomnost determinanty *tet(K)* u izolátů rodu *Staphylococcus* metodou PCR.
4. Amplifikovali jsme fragment DNA primery specifickými pro *tet(M)* determinantu rezistence k tetracyklinu u izolátu rodu *Arthrobacter*. Její přítomnost nebyla potvrzena sekvenačně.
5. U izolátů rodů *Chryseobacterium* a *Stenotrophomonas* jsme vyloučili přítomnost 23 testovaných determinant rezistence k tetracyklinu.
6. Nepodařilo se nám identifikovat determinantu rezistence k tetracyklinu u izolátů rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* ve vytvořené knihovně DNA.
7. U všech izolátů rodu *Chryseobacterium* jsme amplifikovali část symportérové domény genu hybridního proteinu typického pro *Stenotrophomonas*. Metodou hybridizace jsme zjistili, že se fragment genu hybridní kinázy vyskytuje v genomu rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* ve více kopiích.
8. Zaznamenaný horizontální přenos mezi rody *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*, byl potvrzen konjugativní reakcí na pevném mediu v laboratorních podmínkách. Získali jsme několik transkonjugantů *Escherichia coli* rezistentních k tetracyklinu. U těchto transkonjugantů byl amplifikován stejný fragment genu hybridního proteinu rodu *Stenotrophomonas*.
9. Nepodařilo se nám ani potvrdit ani vyvrátit, že se identifikovaný hybridní protein podílí na rezistenci k tetracyklinu u studovaných půdních izolátů rodů *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium*.
10. U izolátů rodu *Stenotrophomonas* byla zjištěna přítomnost části efluxního systému SmeJKL a dalších efluxních systémů, které nebyly specifikovány. U izolátů rodu



*Chryseobacterium* jsme zjistili přítomnost části efluxního systému *Stenotrophomonas* SmeVWX, u kterého není zatím známa substrátová specifita.

11. Byla ověřena možnost využití přítomnosti specifických REP sekvencí v genomu *Stenotrophomonas* k typizaci jednotlivých linií rodu *S. maltophilia*. Na základě tohoto výsledku jsme u studovaných půdních izolátů *Stenotrophomonas* rozlišili dvě různé linie *S. maltophilia*.

## 7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Aarestrup, F., Agersø, Y., Ahrens, P., Jørgensen, J., Madsen, M., Jensen, L. (2000a): Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Veterinary Microbiology* 74: 353-364.

Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B. (2000b): Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37: 127-137.

Adelowo, O.O., Fagade, O.E. (2009): The tetracycline resistance gene *tet39* is present in both Gram-negative and Gram-positive bacteria from a polluted river, Southwestern Nigeria. *Letters in Applied Microbiology* 48: 167-172.

Agerso, Y., Sandvang, D. (2005): Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7941-7947.

Aires, J.R., Pechere, J.C., Van Delden, C., Kohler, T. (2002): Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 2169-2173.

Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S., Fukushima, T. (1960): On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Japanese Journal of Microbiology* 4: 219.

Aleksandrov, A., Schuldt, L., Hinrichs, W., Simonson, T. (2008): Tet repressor induction by tetracycline: A molecular dynamics, continuum electrostatics, and crystallographic study. *Journal of Molecular Biology* 898-912.

Aleksandrov, A., Simonson, T. (2008): Molecular dynamics simulations of the 30S ribosomal subunit reveal a preferred tetracycline binding site. *Journal of the American Chemical Society* 130: 1114-1115.

Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007): Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128: 1037-1050.

Alonso, A., Martínez, J. (1997): Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1140-1142.

Alonso, A., Rojo, F., Martinez, J.L. (1999): Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environmental Microbiology* 1: 421-430.

Alonso, A., Martinez, J.L. (2000): Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 3079-3086.

Alonso, A., Sanchez, P., Martínez, J.L. (2000): *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 1778-1782.

Alonso, A., Martinez, J.L. (2001): Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1879-1881.

Aminov, R., Chee-Sanford, J., Garrigues, N., Teferedegne, B., Krapac, I., White, B., Mackie, R. (2002): Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1786-1793.

Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I. (2001): Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 22-32.

Aminov, R.I., Mackie, R. (2007): Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 271: 147-161.

Avison, M.B., Higgins, C.S., Von Heldreich, C.J., Bennett, P.M., Walsh, T.R. (2001): Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 413-419.

Bafana, A., Krishnamurthi, K., Patil, M., Chakrabarti, T. (2010): Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric salt-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 177: 481-486.

Bahl, M.I., Sorensen, S.J., Hansen, L.H., Licht, T.R. (2004): Effect of tetracycline on transfer and establishment of the tetracycline-inducible conjugative transposon Tn916 in the guts of gnotobiotic rats. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 758-764.

Ball, P., Shales, S., Chopra, I. (1980): Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93: 74-81.

Benveniste, R., Davies, J. (1973): Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 2276.

Berg, G., Roskot, N., Smalla, K. (1999): Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3594-3600.

Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. (2005): The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* 1673-1685.

Bergeron, J., Ammirati, M., Danley, D., James, L., Norcia, M., Retsema, J., Strick, C.A., Su, W.G., Sutcliffe, J., Wondrack, L. (1996): Glycylcyclines bind to the high-

affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2226-2228.

Bertram, J., Stratz, M., Durre, P. (1991): Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 173: 443.

Bloch, K.C., Nadarajah, R., Jacobs, R. (1997): *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* 76: 30-41.

Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., 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.

Brown, M.H., Paulsen, I., Skurray, R. (1999): The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology* 31: 394-395.

Brown, M.H., Skurray, R.A. (2001): Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 3: 163-170.

Burdett, V. (1991): Purification and characterization of Tet(M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 2872-2877.

Burdett, V. (1996): Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *The Journal of Bacteriology* 178: 3246-3251.

Burton, J., Cadieux, P., Reid, G. (2003): Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 97.

Butaye, P., Cloeckaert, A., Schwarz, S. (2003): Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 205-210.

Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H., Taylor, D.E. (2003a): Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3675-3681.

Connell, S.R., Trieber, C.A., Dinos, G.P., Einfeldt, E., Taylor, D.E., Nierhaus, K.H. (2003b): Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO Journal* 22: 945-953.

Courvalin, P. (1994): Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38: 1447.

Crossman, L.C., Gould, V.C., Dow, J.M., Vernikos, G.S., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., Adlem, E., Kerhornou, A., Lord, A., Murphy, L., Seeger, K., Squares, R., Rutter, S., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Harris, D., Churcher, C., Bentley, S.D., Parkhill, J., Thomson, N.R., Avison, M.B.

(2008): The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology* 9: R74.

D'costa, V., Griffiths, E., Wright, G. (2007): Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current Opinion in Microbiology* 10: 481-489.

Dairi, T., Aisaka, K., Katsumata, R., Hasegawa, M. (1995): A self-defense gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in *Streptomyces aureofaciens*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 59: 1835-1841.

Dantley, K.A., Dannelly, H.K., Burdett, V. (1998): Binding Interaction between Tet(M) and the Ribosome: Requirements for Binding. *The Journal of Bacteriology* 180: 4089-4092.

Davidson, A., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. (2008): Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 317.

Degrange, S., Renaudin, H., Charron, A., Pereyre, S., Bebear, C., Bebear, C.M. (2008): Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 1390.

Denton, M., Kerr, K.G. (1998): Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 57-80.

Diaz-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., Mullany, P. (2003): Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 1430-1432.

Diekema, D., Pfaller, M., Schmitz, F., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R., Beach, M. (2001): Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clinical Infectious Diseases* 32: 114-132.

Duivenvoorden, W.C., Hirte, H., Singh, G. (1997): Use of tetracycline as an inhibitor of matrix metalloproteinase activity secreted by human bone-metastasizing cancer cells. *Invasion and Metastasis* 17: 312.

Fajardo, A., Martinez-Martin, N., Mercadillo, M., Galan, J.C., Ghysels, B., Matthijs, S., Cornelis, P., Wiehlmann, L., Tummler, B., Baquero, F., Martinez, J.L. (2008): The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *Plos One* 3: .

Fath, M., Kolter, R. (1993): ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57: 995.

Finlay, A.C., Hobby, G.L., P'an, S.Y., Regna, P.P., Routien, J.B., Seeley, D.B., Shull, G.M., Sobin, B.A., Solomons, I.A., Vinson, J.W., Kane, J.H. (1950): Terramycin, a New Antibiotic. *Science* 111: 85-.

- Fluit, A., Schmitz, F. (1999): Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18: 761-770.
- Fogarty, A., Tuovinen, O. (1991): Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55: 225.
- Forloni, G., Iussich, S., Awan, T., Colombo, L., Angeretti, N., Girola, L., Bertani, I., Poli, G., Caramelli, M., Grazia Bruzzone, M. (2002): Tetracyclines affect prion infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10849.
- Funke, G., Hutson, R.A., Bernard, K.A., Pfyffer, G.E., Wauters, G., Collins, M.D. (1996): Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2356-2363.
- Funke, G., Pagano-Niederer, M., Sjoden, B., Falsen, E. (1998): Characteristics of *Arthrobacter cumminsii*, the most frequently encountered *Arthrobacter* species in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1539-1543.
- Ghosh, S., Lapara, T.M. (2007): The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The ISME Journal* 1: 191-203.
- Ginn, S., Brown, M., Skurray, R. (1997): Membrane topology of the metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter TetA(K) from *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Bacteriology* 179: 3786-3789.
- Golub, L.M., Suomalainen, K., Sorsa, T. (1992): Host modulation with tetracyclines and their chemically modified analogues. *Current Opinion in Dentistry* 2: 80-90.
- Golub, L.M., Lee, H., Ryan, M., Giannobile, W., Payne, J., Sorsa, T. (1998): Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Advances in Dental Research* 12: 12.
- Gould, V.C., Avison, M.B. (2006): SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 1070-1076.
- Griffith, J., Baker, M., Rouch, D., Page, M., Skurray, R., Paulsen, I., Chater, K., Baldwin, S., Henderson, P. (1992): Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Current Opinion in Cell Biology* 4: 684-695.
- Grkovic, S., Brown, M.H., Roberts, N.J., Paulsen, I.T., Skurray, R.A. (1998): QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 18665-18673.
- Grkovic, S., Brown, M., Skurray, R. (2002): Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 671-701.

Guillaume, G., Ledent, V., Moens, W., Collard, J.M. (2004): Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. *Microbial Drug Resistance* 10: 11-26.

Gupta, P., Reddy, G.S., Delille, D., Shivaji, S. (2004): *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2375-2378.

Haider, A., Shaw, J.C. (2004): Treatment of Acne Vulgaris. *The Journal of the American Medical Association* 292: 726-735.

Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., Tjornelund, J. (2002): Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 263-271.

Hassan, K., Skurray, R., Brown, M. (2007): Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 12: 180-196.

Hauschild, T., Kehrenberg, C., Schwarz, S. (2003): Tetracycline Resistance in Staphylococci from Free-living Rodents and Insectivores. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 50: 443-446.

He, G., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T., Tsuchiya, T. (2004): An H<sup>+</sup>-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 186: 262.

Heringa, S.D., Monroe, J.D., Herrick, J. (2007): A Simple, Rapid Method for Extracting Large Plasmid DNA from Bacteria (online). Dostupné na <http://dx.doi.org/10.1038/npre.2007.1249.1>.

Hirata, T., Saito, A., Nishino, K., Tamura, N., Yamaguchi, A. (2004): Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to tigecycline (GAR-936). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 2179.

Huda, N., Lee, E., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T. (2003): Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in non-O1 *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 2413.

Hughes, L.J., Stezowski, J.J., Hughes, R.E. (1979): Chemical-structural properties of tetracycline derivatives. 7. Evidence for the coexistence of the zwitterionic and nonionized forms of the free base in solution. *Journal of the American Chemical Society* 101: 7655-7657.

Hvorup, R., Saier Jr, M. (2002): Sequence similarity between the channel-forming domains of voltage-gated ion channel proteins and the C-terminal domains of secondary carriers of the major facilitator superfamily. *Microbiology* 148: 3760.

Chang, J., Hsueh, P., Wu, J., Ho, S., Hsieh, W., Luh, K. (1997): Antimicrobial susceptibility of flavobacteria as determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1301.

- Chang, L.L., Chen, H.F., Chang, C.Y., Lee, T.M., Wu, W.J. (2004): Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 518-521.
- Chee-Sanford, J.C., Aminov, R.I., Krapac, I.J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I. (2001): Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1494-1502.
- Chopra, I., Hawkey, P.M., Hinton, M. (1992): Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 29: 245-277.
- Chopra, I. (1994): Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38: 637-640.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001): Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 232-260.
- Chung, Y., Saier Jr, M. (2001): SMR-type multidrug resistance pumps. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 4: 237.
- Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempfer, C., Jung, G., Berg, G., Bahl, H. (1996): Maltophilin: A new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *Journal of Antibiotics* 1101-1104.
- Kaatz, G.W., McAleese, F., Seo, S.M. (2005): Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1857-1864.
- Kazimierczak, K.A., Scott, K.P., Kelly, D., Aminov, R.I. (2009): Tetracycline resistance of the organic pig gut. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1717-1722.
- Kirby, J.T., Sader, H.S., Walsh, T.R., Jones, R.N. (2004): Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Journal of Clinical Microbiology* 42: 445-448.
- Konstantinidis, K., Tiedje, J. (2004): Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3160.
- Kumar, A., Schweizer, H. (2005): Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews* 57: 1486-1513.
- Lambert, T., Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P. (1999): Characterization of the chromosomal *aac(6')*-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2366-2371.
- Law, C., Maloney, P., Wang, D. (2008): Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annual Review of Microbiology* 62: 289-305.



Leelaporn, A., Paulsen, I.T., Tennent, J.M., Littlejohn, T.G., Skurray, R.A. (1994): Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *Journal of Medical Microbiology* 40: 214-220.

Levy, S. (1992): Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 695.

Li, X., Zhang, L., Poole, K. (2002): SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 333-343.

Li, X.Z., Livermore, D.M., Nikaido, H. (1994): Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38: 1732-1741.

Li, X.Z., Nikaido, H., Poole, K. (1995): Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 1948.

Li, X.Z., Barre, N., Poole, K. (2000): Influence of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 885-893.

Littlejohn, T.G., Diberardino, D., Messerotti, L.J., Spiers, S.J., Skurray, R.A. (1991): Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* 101: 59-66.

Livermore, D. (2005): Tigecycline: what is it, and where should it be used? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 611.

Lokeshwar, B., Selzer, M., Zhu, B., Block, N., Golub, L. (2002): Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. *International Journal of Cancer* 98: 297-309.

Lomovskaya, O., Watkins, W. (2001): Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3: 225-236.

Lubelski, J., Konings, W., Driessen, A. (2007): Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 463.

Luong, T.T., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., Lee, C.Y. (2006): Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 188: 1899-1910.

Ma, D., Cook, D., Alberti, M., Pon, N., Nikaido, H., Hearst, J. (1993): Molecular cloning and characterization of acrA and acrE genes of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 175: 6299.

Margesin, R., Schinner, F. (1997): Heavy metal resistant *Arthrobacter* sp. - A tool for studying conjugational plasmid transfer between Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Basic Microbiology* 217-227.

Martin, C., Timm, J., Rauzier, J., Gomez-Lus, R., Davies, J., Gicquel, B. (1990): Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature* 345: 739 - 743.

Martinez, J. (2009): Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 157: 2893-2902.

Martinez, J., Sánchez, M., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C. (2009): Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 430-449.

Mayer, S., Boos, M., Beyer, A., Fluit, A.C., Schmitz, F.J. (2001): Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 896-897.

Mcmurry, L., Petrucci, R.E., Levy, S.B. (1980): Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 3974.

Mcmurry, M.C., Cullinane, J.C., Levy, S.B. (1982): Transport of the lipophilic analog minocycline differs from that of tetracycline in susceptible and resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 22: 791-799.

Melville, C.M., Scott, K.P., Mercer, D.K., Flint, H.J. (2001): Novel tetracycline resistance gene, tet(32), in the *Clostridium*-related human colonic anaerobe K10 and its transmission in vitro to the rumen anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 3246-3249.

Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., Roberts, M. (2003): Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 883-888.

Misra, R., Bavro, V.N. (2009): Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1794: 817-825.

Mitchell, B.A., Brown, M.H., Skurray, R.A. (1998): QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 475-477.

Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., Tsuchiya, T. (1998): NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 1778.

Moriyama, Y., Hiasa, M., Matsumoto, T., Omote, H. (2008): Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica* 38: 1107-1118.

- Morris, D.O., Rook, K.A., Shofer, F.S., Rankin, S.C. (2006): Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Veterinary Dermatology* 17: 332-337.
- Nelson, M.L. (1998): Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Advances in Dental Research* 12: 5-11.
- Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., Kaatz, G.W. (1993): Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 128-129.
- Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M., Mulvey, M. (2001): Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes* 15: 209-215.
- Nikaido, H., Thanassi, D.G. (1993): Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 1393.
- Nikaido, H. (2003): Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 593-656.
- Nip, L., Uitto, V., Golub, L. (1993): Inhibition of epithelial cell matrix metalloproteinases by tetracyclines. *Journal of Periodontal Research* 28: 379-385.
- Noah, J.W., Dolan, M.A., Babin, P., Wollenzien, P. (1999): Effects of tetracycline and spectinomycin on the tertiary structure of ribosomal RNA in the *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 16576-16581.
- Nonaka, L., Suzuki, S. (2002): New Mg<sup>2+</sup>-dependent oxytetracycline resistance determinant Tet 34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1550.
- Nonaka, L., Connell, S.R., Taylor, D.E. (2005): 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* decrease drug binding in *Escherichia coli* ribosomes. *The Journal of Bacteriology* 187: 3708-3712.
- Novak-Pekli, M., El-Hadi Mesbah, M., Petho, G. (1996): Equilibrium studies on tetracycline-metal ion systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14: 1025-1029.
- Nunvar, J., Huckova, T., Licha, I. (2010): Identification and characterization of repetitive extragenic palindromes (REP)-associated tyrosine transposases: implications for REP evolution and dynamics in bacterial genomes. *BMC Genomics* 11: 44.
- Ohyama, T., Cowan, J.A. (1995): Calorimetric Studies of Metal Binding to Tetracycline. Role of Solvent Structure in Defining the Selectivity of Metal Ion-Drug Interactions. *Inorganic Chemistry* 34: 3083-3086.
- Oliva, B., Gordon, G., McNicholas, P., Ellestad, G., Chopra, I. (1992): Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 913.

- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., Moriyama, Y. (2006): The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in pharmacological sciences* 27: 587-593.
- Palleroni, N.J., Bradbury, J.F. (1993): *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43: 606-609.
- Pao, S., Paulsen, I., Saier, M.J. (1998): Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 1-34.
- Paulsen, I., Skurray, R. (1993): Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes--an analysis. *Gene* 124: 1-11.
- Paulsen, I., Chen, J., Nelson, K., Saier Jr, M. (2001): Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3: 145-150.
- Paulsen, I.T., Brown, M., Skurray, R. (1996a): Proton-dependent multidrug efflux systems. *FEMS Microbiology Reviews* 60: 575-608.
- Paulsen, I.T., Skurray, R., Tam, R., Saier Jr, M., Turner, R., Weiner, J., Goldberg, E., Grinius, L. (1996b): The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular Microbiology* 19: 1167-1175.
- Pioletti, M., Schlunzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Gluhmann, 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 Journal* 20: 1829-1839.
- Pipke, R., Amrhein, N. (1988): Degradation of the Phosphonate Herbicide Glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1293-1296.
- Pringle, M., Fellström, C., Johansson, K.-E. (2007): Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology* 123: 245-248.
- Quiros, L.M., Fidalgo, S., Mendez, F.J., Hardisson, C., Salas, J.A. (1988): Novel mechanisms of resistance to lincosamides in *Staphylococcus* and *Arthrobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32: 420-425.
- Rahme, L., Stevens, E., Wolfort, S., Shao, J., Tompkins, R., Ausubel, F. (1995): Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899.
- Rasmussen, B., Noller, H., Daubresse, G., Oliva, B., Misulovin, Z., Rothstein, D., Ellestad, G., Gluzman, Y., Tally, F., Chopra, I. (1991): Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 2306.

- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.J. (1994): A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* 1197: 133-166.
- Roberts, A.N., Hudson, G.S., Brenner, S. (1985): An erythromycin-resistance gene from an erythromycin-producing strain of *Arthrobacter* sp. *Gene* 35: 259-270.
- Roberts, A.N., Barnett, L., Brenner, S. (1987): Transformation of *Arthrobacter* and studies on the transcription of the *Arthrobacter* ermA gene in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 243: 431-436.
- Roberts, M.C. (2003): Tetracycline therapy: update. *Clinical Infectious Diseases* 36: 462-467.
- Roberts, M.C. (2010a): Distribution of tetracycline resistance genes among Gram-positive bacteria, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Nocardia*, *Streptomyces* and *Ureaplasma* (online). Dostupné na <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb3.pdf>.
- Roberts, M.C. (2010b): Mechanism of resistance for characterized tet and otr genes (online). Dostupné na <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>.
- Roberts, M.C. (2010c): Distribution of tet resistance genes among Gram-negative bacteria (online). Dostupné na <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb2.pdf>.
- Rocco, F., De Gregorio, E., Colonna, B., Di Nocera, P.P. (2009): *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: A start-up comparison. *International Journal of Medical Microbiology* 299: 535-546.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J. (1998): 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 1702-1705.
- Rossolini, G.M., Franceschini, N., Riccio, M.L., Mercuri, P.S., Perilli, M., Galleni, M., Frere, J.M., Amicosante, G. (1998): Characterization and sequence of the *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B beta-lactamase showing a broad substrate profile. *Biochemical Journal* 332 (Pt 1): 145-152.
- Rossolini, G.M., Franceschini, N., Lauretti, L., Caravelli, B., Riccio, M.L., Galleni, M., Frere, J.M., Amicosante, G. (1999): Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (blaA(CME)) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2193-2199.
- Sader, H.S., Jones, R.N. (2005): Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25: 95-109.
- Saidijam, M., Benedetti, G., Ren, Q., Xu, Z., Hoyle, C.J., Palmer, S.L., Ward, A., Bettaney, K.E., Szakonyi, G., Mueller, J., Morrison, S., Pos, M.K., Butaye, P., Walravens, K., Langton, K., Herbert, R.B., Skurray, R.A., Paulsen, I.T., O'reilly, J., Rutherford, N.G., Brown, M.H., Bill, R.M., Henderson, P.J. (2006): Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily. *Current Drug Targets* 7: 793-811.

- Saier, M.H. (2003): Tracing pathways of transport protein evolution. *Molecular Microbiology* 1145-1156.
- Saier, M.H.J., Tam, R., Reizer, A., Reizer, J. (1994): Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular Microbiology* 11: 841-847.
- Saier, M.H.J., Paulsen, I., Sliwinski, M., Pao, S., Skurray, R., Nikaido, H. (1998): Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB Journal* 12: 265-274.
- Saier, M.H.J., Beatty, J., Goffeau, A., Harley, K., Heijne, W., Huang, S., Jack, D., Jähn, P., Lew, K., Liu, J., Pao, S., Paulsen, I., Tseng, T., Virk, P. (1999): The major facilitator superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 257-279.
- Saier, M.H.J., Paulsen, I. (2001): Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12: 205-213.
- Salmond, G., Welch, M. (2008): Antibiotic resistance: adaptive evolution. *The Lancet* 372: S97-S103.
- Sanchez, M.B., Hernandez, A., Martinez, J.L. (2009): *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiology* 4: 655-660.
- Sanchez, P., Alonso, A., Martinez, J.L. (2002): Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3386-3393.
- Sapadin, A.N., Fleischmajer, R. (2006): Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *Journal Of American Academy Of Dermatology* 54: 258-265.
- Showsh, S., Andrews, R.J. (1992): Tetracycline enhances Tn916-mediated conjugal transfer. *Plasmid* 28: 213-224.
- Schmitz, F.J., Krey, A., Sadurski, R., Verhoef, J., Milatovic, D., Fluit, A.C. (2001): Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 239-240.
- Schnappinger, D., Hillen, W. (1996): Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology* 165: 359-369.
- Schneider, E., Hunke, S. (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 1-20.
- Schwarz, S., Cardoso, M., Wegener, H.C. (1992): Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 580-588.

Schwarz, S., Roberts, M.C., Werckenthin, C., Pang, Y., Lange, C. (1998): Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Veterinary Microbiology* 63: 217-227.

Sigler, A., Schubert, P., Hillen, W., Niederweis, M. (2000): Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* 267: 527-534.

Song, B., Wang, G., Shoemaker, N., Salyers, A. (2009): An unexpected effect of tetracycline concentration: growth phase-associated excision of the *Bacteroides* mobilizable transposon NBU1. *Journal of Bacteriology* 191: 1078-1082.

Spahn, C., Blaha, G., Agrawal, R., Penczek, P., Grassucci, R., Trieber, C., Connell, S., Taylor, D., Nierhaus, K., Frank, J. (2001): Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the ribosome and the mechanism of tetracycline resistance. *Molecular Cell* 7: 1037-1045.

Speer, B.S., Salyers, A.A. (1988): Characterization of a novel tetracycline resistance that functions only in aerobically grown *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170: 1423-1429.

Stanton, T.B., Mcdowall, J.S., Rasmussen, M.A. (2004): Diverse tetracycline resistance genotypes of *Megasphaera elsdenii* strains selectively cultured from swine feces. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3754-3757.

Stephens, C., Conover, L., Pasternack, R., Hochstein, F., Moreland, W., Regna, P., Pilgrim, F., Brunings, K., Woodward, R. (1954): The Structure of Aureomycin. *Journal of the American Chemical Society* 76: 3568-3575.

Su, X., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. (2005): AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 4362.

Taylor, D.E., Chau, A. (1996): Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 1-5.

Testa, R., Petersen, P., Jacobus, N., Sum, P., Lee, V., Tally, F. (1993): In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylcyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 2270.

Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G. (2010): The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 419-431.

Thanassi, D.G., Suh, G.S., Nikaido, H. (1995): Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology* 177: 998-1007.

Tiedje, J., Duxbury, J., Alexander, M., Dawson, J. (1969): 2, 4-D metabolism: pathway of degradation of chlorocatechols by *Arthrobacter* sp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17: 1021-1026.

- Tikhonova, E.B., Zgurskaya, H.I. (2004): AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *Journal of Biological Chemistry* 279: 32116-32124.
- Trieber, C.A., Taylor, D.E. (2002): Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *Journal of Bacteriology* 184: 2131-2140.
- Truong-Bolduc, Q.C., Dunman, P.M., Strahilevitz, J., Projan, S.J., Hooper, D.C. (2005): MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 187: 2395-2405.
- Tseng, T., Gratwick, K., Kollman, J., Park, D., Nies, D., Goffeau, A., Saier Jr, M. (1999): The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 107-125.
- Ubukata, K., Itoh-Yamashita, N., Konno, M. (1989): Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33: 1535-1539.
- Vaara, M. (1993): Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 2255.
- Valdezate, S., Vindel, A., Loza, E., Baquero, F., Canton, R. (2001): Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1581-1584.
- Van Bambeke, F., Balzi, E., Tulkens, P. (2000): Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* 60: 457-470.
- Van Veen, H., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., Driessen, A., Konings, W. (1996): Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10668.
- Van Veen, H., Margolles, A., Müller, M., Higgins, C., Konings, W. (2000): The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *The EMBO Journal* 19: 2503-2514.
- Vila, J., Martinez, J.L. (2008): Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Current Drug Targets* 9: 797-807.
- Walsh, T.R., Macgowan, A.P., Bennett, P.M. (1997): Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1460-1464.
- White, P., Mciver, C., Rawlinson, W. (2001): Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 2658.



- Wright, G. (2007): The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 175-186.
- Yamaguchi, A., Shiina, Y., Fujihira, E., Sawai, T., Noguchi, N., Sasatsu, M. (1995): The tetracycline efflux protein encoded by the *tet(K)* gene from *Staphylococcus aureus* is a metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter. *FEBS Letters* 365: 193-197.
- Yang, W., Moore, I.F., Koteva, K.P., Bareich, D.C., Hughes, D.W., Wright, G.D. (2004): TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *Journal of Biological Chemistry* 279: 52346-52352.
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., Schuldiner, S. (1995): EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H and is soluble in organic solvents. *Journal of Biological Chemistry* 270: 6856.
- Yu, Z., Michel, F.C., Jr., Hansen, G., Wittum, T., Morrison, M. (2005): Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6926-6933.
- Zakeri, B., Wright, G.D. (2008): Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochemistry and Cell Biology* 86: 124-136.
- Zgurskaya, H., Nikaido, H. (2000): Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology* 37: 219-225.
- Zhang, L., Li, X.Z., Poole, K. (2001): SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 3497-3503.
- Zhang, Q.J., Xu, W.X. (1993): Morphological, physiological and enzymatic characteristics of cephalosporin acylase-producing *Arthrobacter* strain 45-8A. *Archives of Microbiology* 159: 392-395.