

Dovoľujem zapožičanie svojej diplomovej práce k študijným účelom a prosím, aby bola vedená riadna evidencia výpožičiek. Prevzaté údaje je vypožičovateľ povinný riadne citovať.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Bich Nguyen Thi Ngoc

**Buněčná lokalizace rezistentních proteinů Vga(A)_{LC} a Msr(A)
prostřednictvím fluorescenční mikroskopie**

**Subcellular localization of resistant proteins Vga(A)_{LC} and Msr(A)
using fluorescence microscopy**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Gabriela Balíková-Novotná, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 13.08.2018

Podpis

Táto diplomová práca bola vypracovaná v Laboratóriu Biológie sekundárneho metabolizmu Mikrobiologického ústavu AV ČR, v rokoch 2016 – 2018 za finančnej podpory GAČR v rámci projektu 15-16225Y a MEYS ČR v rámci projektu Czech-BioImaging (LM2015062).

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať v prvom rade svojej školiteľke Mgr. Gabriele Balíkovej-Novotnej, Ph.D. za vedenie práce, odborné konzultácie, rady a podnetné pripomienky. Moje veľké poďakovanie patrí aj Mgr. Vladimirovi Vimbergovi, Ph.D. a rovnako aj Mgr. Jakubovi Lenartovi za ich vládny prístup, trpezlivosť a cenné rady k experimentálnej časti práce. Ďakujem aj ostatným členom Laboratória Biológie sekundárneho metabolizmu MBÚ AV ČR za ich rady a príjemné pracovné prostredie. Ďalej ďakujem aj kolektívu Laboratória svetelnej mikroskopie a cytomerie ÚMG AV ČR za odbornú pomoc pri práci na superrezolučnej mikroskopii. Osobitné poďakovanie patrí aj mojej rodine a priateľom za podporu počas môjho štúdia.

Abstrakt

Vga(A)_{LC} a Msr(A) jsou klinicky významnými rezistentními proteiny u stafylokoků, které udělují rezistenci k inhibitorům translace. Patří mezi ARE ABC-F podrodinu proteinů, která je součástí ABC transportérů. Narozdíl od typických ABC transportérů, ABC-F proteiny nemají transmembránové domény, které jsou zodpovědné za transport látek přes membránu. Proto pro ně není charakteristická transportní funkce, ale regulační nebo rezistenční funkce. Jejich mechanismus působení na ribozomu byl popsán teprve nedávno, kde tyto proteiny vytěsňují antibiotikum z ribozomu. Stále jsou však některé aspekty jejich funkce neobjasněné. Například to, jaký je význam umístění Vga(A) na membráně, které bylo detekováno v membránové frakci nikoliv v ribozomální.

V této práci jsem prostřednictvím fluorescenční mikroskopie pozorovala subcelulární lokalizaci rezistenčních fúzních proteinů Vga(A)_{LC}-mEos2, Vga(A)_{LC}-GFP a Msr(A)-eqFP650 v živých buňkách *S. aureus*, za různých kultivačních podmínek. Ukázalo se, že Vga(A)_{LC}-GFP i Msr(A)-eqFP650 se vyskytují v ohnisku blízko membrány. V závislosti na ATPázové aktivitě nebo přítomnosti antibiotika se lokalizace Msr(A)-eqFP650 v buňce mění z ohniskové na difuzní, pravděpodobně na ribozomech, což navrhuje hypotézu o duálním mechanismu ARE ABC-F proteinů. Druhým cílem práce bylo sledování *in vivo* exprese Vga(A)_{LC} v klinických izolátech *S. haemolyticus*. Prokázalo se, že exprese Vga(A)_{LC} je kontrolována v závislosti na přítomnosti specifického antibiotika navázaného na ribozomu mechanismem označovaným jako transkripční atenuace a, že exprese je indukovaná specificky antibiotiky, ke kterým protein uděluje rezistenci.

Klíčová slova: ABC proteiny, ARE proteiny, antibiotická rezistence, Vga(A)_{LC}, Msr(A), subcelulární lokalizace, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*

Abstract

Vga(A)_{LC} and Msr(A) are clinically significant resistant proteins in staphylococci that confer resistance to translational inhibitors. They belong to ARE ABC-F protein subfamily, which is part of ABC transporters. Unlike typical ABC transporters, ABC-F proteins do not have transmembrane domains that are responsible for the transport of substances through the membrane. Therefore, they do not have characteristic transport function but regulatory or resistance function. Their mechanism of action on the ribosome has been described only recently, where these proteins displace the antibiotic from the ribosome. However, some aspects of their function are still unclear. For example, what is the function of the Vga(A) location on a membrane that has been detected in the membrane fraction but not in the ribosomal.

In this work, using fluorescence microscopy, I observed subcellular localization of the Vga(A)_{LC}-mEos2, Vga(A)_{LC}-GFP and Msr(A)-eqFP650 resistant fusion proteins in live cells of *S. aureus* under different culture conditions. It has been shown that Vga(A)_{LC}-GFP and Msr(A)-eqFP650 occur in a foci near the membrane. Depending on ATPase activity or the presence of an antibiotic, the localization of Msr(A)-eqFP650 in the cell changes from focal to diffuse, presumably on ribosomes, suggesting a hypothesis about the dual mechanism of ARE ABC-F proteins. The second aim of this work was to monitor *in vivo* expression of Vga(A)_{LC} in clinical isolates of *S. haemolyticus*. Vga(A)_{LC} expression has been shown to be controlled depending on the presence of a specific antibiotic bound to the ribosome by a mechanism known as transcriptional attenuation. Moreover the expression is specifically induced by antibiotics to which the protein confers resistance.

Key words: ABC proteins, ARE proteins, antibiotic resistance, Vga(A)_{LC}, Msr(A), subcellular localization, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*

Obsah

ZOZNAM SKRATIEK	11
1 ÚVOD.....	13
CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE.....	15
2 PREHLAD LITERATÚRY.....	16
2.1 BAKTERIÁLNA PROTEOSYNTÉZA.....	16
2.2 MAKROLIDY, LINKOZAMIDY, STREPTOGRAMÍNY (MLSP).....	19
2.2.1 KLINICKY VYUŽÍVANÉ MLSP ANTIBIOTIKÁ.....	19
2.2.1.1 Makrolidy.....	19
2.2.1.2 Linkozamidy.....	21
2.2.1.3 Streptogramíny.....	21
2.2.1.4 Pleuromutilíny.....	22
2.2.2 MECHANIZMY ÚČINKU MLSP ANTIBIOTÍK.....	23
2.2.3 MECHANIZMY REZISTENCIE VOČI MLSP ANTIBIOTIKÁM.....	25
2.2.3.1 Modifikácia cieľového miesta.....	25
2.2.3.2 Ochrana ribozómu ARE ABC-F proteínmi.....	26
2.2.3.3 Aktívny eflux antibiotík.....	27
2.2.3.4 Enzymatická inaktivácia antibiotík.....	28
2.3 REGULÁCIA ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE.....	29
2.4 ŠTRUKTÚRA A MECHANIZMUS FUNKCIE ABC-F PROTEÍNOV.....	32
2.4.1 SUPERRDOINA ABC PROTEÍNOV: ŠTRUKTÚRA A KLASIFIKÁCIA.....	32
2.4.2 ABC-F PROTEÍNY.....	34
2.4.3 ABC-F UDELUJÚCE REZISTENCIU K ANTIBIOTIKÁM.....	36
2.4.3.1 Ochrana ribozómu ARE proteínmi.....	37
2.4.3.1.1 Väzba ARE proteínov na ribozóm.....	37
2.4.3.1.2 Funkcia linkeru a ramena u ARE proteínov.....	38
2.4.3.1.3 Biochemický dôkaz ribozomálnej funkcie ARE proteínov.....	40
2.4.3.2 Funkcia ARE proteínov na membráne.....	40
3 MATERIÁL A METÓDY.....	43
3.1 MATERIÁL.....	43
3.1.1 BAKTERIÁLNE KMENE.....	43
3.1.2 VEKTORY.....	44
3.1.3 PRIMERY.....	44
3.1.4 KULTIVAČNÉ MÉDIÁ.....	45

3.1.5 ROZTOKY A PUFRY.....	
3.1.6 ANTIBIOTIKÁ.....	50
3.1.7 ENZÝMY.....	51
3.1.8 PROTILÁTKY.....	51
3.1.9 FLUORESCENČNÉ FARBIČKY.....	51
3.1.10 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	52
3.1.11 KOMERČNÉ SÚPRAVY A ŠTANDARDY.....	53
3.1.12 SOFTWARE A INTERNETOVÉ APLIKÁCIE.....	53
3.2 METÓDY.....	55
3.2.1 KULTIVÁCIA A UCHOVÁVANIE BAKTÉRIÍ.....	55
3.2.1.1 Kultivácia a uchovávanie <i>Escherichia coli</i>	55
3.2.1.2 Kultivácia a uchovávanie <i>Staphylococcus aureus</i>	55
3.2.1.3 Kultivácia a uchovávanie <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	56
3.2.2 PRÍPRAVA A TRANSFORMÁCIA KOMPETENTNÝCH BUNIEK.....	56
3.2.2.1 Príprava kompetentných buniek <i>E. coli</i> pre transformáciu teplotným šokom.....	56
3.2.2.2 Transformácia kompetentných buniek <i>E. coli</i> teplotným šokom.....	57
3.2.2.3 Príprava kompetentných buniek <i>S. aureus</i> pre transformáciu elektroporáciou.....	58
3.2.2.4 Transformácia kompetentných buniek <i>S. aureus</i> elektroporáciou.....	58
3.2.3 PRÍPRAVA KONŠTRUKTOV.....	59
3.2.3.1 Príprava konštruktov klonovacou metódou SLiCE (Seamless Ligation Cloning Extract).....	59
3.2.4 METÓDY PRÁCE S DNA.....	60
3.2.4.1 Izolácia plazmidovej DNA.....	60
3.2.4.2 Purifikácia PCR produktu.....	61
3.2.4.3 Elektroforéza DNA v agarózovom géli.....	62
3.2.4.4 Sekvenovanie.....	63
3.2.5 POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA (PCR).....	63
3.2.5.1 Amplifikácia naklonovaného génu <i>vga(A)_{LC}</i> v pRMC2.....	63
3.2.5.2 Amplifikácia génu kódujúceho fotokonvertibilný fluorescenčný proteín mEos2.....	64
3.2.5.3 Kolóniová PCR.....	64
3.2.5.4 Kontrolná PCR pre overenie prítomnosti inzertu v plazmide pRMC2.....	65
3.2.6 STANOVENIE CITLIVOSTI NA ANTIMIKROBIÁLNE LÁTKY.....	66
3.2.6.1 Mikrodilučná metóda.....	66
3.2.6.2 Disková difúzna metóda.....	67
3.2.7 METÓDY PRÁCE S PROTEÍNMI.....	67
3.2.7.1 Príprava vzoriek pre SDS- PAGE.....	67
3.2.7.2 SDS- PAGE proteínová elektroforéza.....	68

3.2.7.3	Farbenie SDS- PAGE gélu.....	69
3.2.7.4	Western blot.....	70
3.2.7.5	Príprava bunkových frakcií centrifugáciou.....	71
3.2.7.6	Qubit assay.....	72
3.2.8	MIKROSKOPIA.....	72
3.2.8.1	Mikroskopia so štruktúrovaným osvetlením (SIM).....	73
3.2.8.2	Opracovanie krycích sklíčok na mikroskopovanie pre zvýšenie hydrofóbného charakteru povrchu skla.....	73
3.2.8.3	Príprava buniek na mikroskopické pozorovanie.....	74
3.2.8.4	Príprava preparátu na mikroskopické pozorovanie.....	74
3.2.8.5	Podmienky pre mikroskopické pozorovanie.....	75
3.2.8.6	Spracovanie a analýza mikroskopických obrázkov.....	75
4	VÝSLEDKY.....	76
4.1	SUBCELULÁRNA LOKALIZÁCIA ARE Vga(A)_{LC} PROTEÍNU PROSTREDNÍCTVOM FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE.....	76
4.1.1	PRÍPRAVA KONŠTRUKTU PRE EXPRESIU PROTEÍNU V KMENI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RN4220.....	77
4.1.1.1	Príprava konštruktu Vga(A) _{LC} -mEos2.....	77
4.1.1.2	Transformácia konštruktu do <i>S. aureus</i> RN4220 a overenie transformantov.....	79
4.1.2	OVERENIE FUNKČNOSTI FÚZNYCH PROTEÍNOV Vga(A) _{LC} -mEos2 A Vga(A) _{LC} -GFP V KMENI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RN4220.....	80
4.1.2.1	Testovanie citlivosti k antimikrobiálnym látkam u kmeňa <i>S. aureus</i> RN4220.....	80
4.1.2.2	Vplyv rôznej hladiny expresie fúznych proteínov na bunkový rast.....	81
4.1.2.3	Detekcia fúznych proteínov metódou Western blot.....	82
4.1.3	MIKROSKOPICKÉ POZOROVANIE BUNKOVEJ LOKALIZÁCIE FÚZNYCH PROTEÍNOV Vga(A) _{LC} -mEos2 A Vga(A) _{LC} -GFP V KMENI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RN4220.....	83
4.1.4	MIKROSKOPICKÉ POZOROVANIE BUNKOVEJ LOKALIZÁCIE FÚZNEHO PROTEÍNU Vga(A) _{LC} -GFP V KMENI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RN4220.....	85
4.1.4.1	Vplyv kultivačnej teploty, rastovej fázy a doby expresie na bunkovú lokalizáciu Vga(A) _{LC} -GFP v kmeni <i>S. aureus</i> RN4220.....	85
4.1.5	Vga(A) _{LC} -GFP V KMENI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> 8325-4 A JE2.....	87
4.1.5.1	Testovanie citlivosti k antimikrobiálnym látkam u kmeňa <i>S. aureus</i> 8325-4 a <i>S. aureus</i> JE2.....	87
4.1.5.2	Mikroskopické pozorovanie a vplyv antibiotika na bunkovú lokalizáciu rezistentného proteínu Vga(A) _{LC} -GFP v kmeni <i>S. aureus</i> 8325-4 a <i>S. aureus</i> JE2.....	89
4.1.5.3	Subcelulárna lokalizácia Vga(A) _{LC} a Vga(A) _{LC} -GFP proteínu pomocou centrifugácie a následnej imunodetekcie.....	92
4.2	SUBCELULÁRNA LOKALIZÁCIA ARE Msr(A) PROTEÍNU PROSTREDNÍCTVOM FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE.....	94
4.2.1	MIKROSKOPICKÉ POZOROVANIE BUNKOVEJ LOKALIZÁCIE REZIDENTNÉHO PROTEÍNU Msr(A) V KMENI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> 8325-4.....	95

4.3 <i>IN VIVO</i> EXPRESIA ARE PROTEÍNU Vga(A) _{LC} V KLINICKÝCH IZOLÁTOCH <i>STAPHYLOCOCCUS HAEMOLYTICUS</i>	99
5 DISKUSIA.....	101
6 SÚHRN.....	108
7 LITERATÚRA.....	110

Zoznam skratiek

5' UTR	5' untranslated region	5' koniec neprekladanej oblasti
A miesto	aminoacyl site	aminoacylové miesto na ribozóme
ABC proteíny	ATP-binding cassette	ATP- väzobný proteín
AnhTet	anhydrotetracycline	anhydrotetracyklín
ARE proteíny	antibiotic resistant proteins	proteíny udeľujúce rezistenciu
aa- tRNA	aminoacyl t- RNA	aminoacyl t- RNA
ATP	adenosin triphosphate	adenozíntrifosfát
Bp	base pair	bázové páry
BPD	binding protein dependent	
CLI	clindamycin	klindamycín
CAM	chloramphenicol	chloramfenikol
CARB	carbenicillin	karbenicilín
cMLS_B	constitutive MLS _B resistance	konštitutívna MLS _B rezistencia
DDT		diskový difúzny test
dH₂O	distilled water	destilovaná voda
E miesto	exit site	výstupné miesto na ribozóme
EF	elongation factor	elongačný faktor
Erm	erythromycin resistance methylase gene	
ERY	erythromycin	erytromycín
EtBr	ethidium bromide	etídium bromid
EtOH	ethanol	etanol
EttA	energy- dependent translational throttle	
FL-VAN	fluorescent vancomycin	fluorescenčný vankomycín
FL- TEI	fluorescent teicoplanin	fluorescenčný teikoplanín
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenčný proteín
GTP	guanosin triphosphate	guanozíntrifosfát
IF	iniciation faktor	iniciačný faktor
iMLS_B	inducible MLS _B resistance	inducibilná MLS _B rezistencia
KAN	kanamycine	kanamycín
LIN	lincomycin	linkomycín
lnu (A)	linkosamide nucleotidyltransferase	linkozamid nukleotidyltransferáza
Mac	macrolides	makrolidy
MATE	multidrug and toxic compound extrusion	
MFS	major facilitator superfamily	
MIC	minimal inhibitory concentration	minimálna inhibičná koncentrácia
MLSP	macrolide, linkosamide, streptogramins, pleuromutilins	makrolidy, linkozamidy, streptogramíny, pleuromutilíny
MLS_B	macrolide, linkosamide, streptogramins B	makrolidy, linkozamidy, streptogramíny B
MRSA	methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	metecilín rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i>
NBD	nucleotide binding domain	nukleotid- väzobné miesto
ncRNA	non- coding RNA	nekódujúca RNA
NTP	nucleotide triphosphate	nukleotidtrifosfát
OD	optical density	optická denzita
PIA	pristinamycin IA	pristinamycín IA
PIIA	pristinamycin IIA	pristinamycín IIA
P miesto	peptidyl t-RNA	peptidyl t-RNA
PET	polypeptide exit tunnel	polypeptidový výstupný tunel
Plu	pleuromutilins	pleuromutilíny
PTC	peptidyl transferase centre	peptidyl-transferázové centrum
PtIM		motív interakcie tRNA v mieste P
PVDF	polyvinylidfluorid	polyvinylidfluorid
RBS	ribosome binding site	ribozóm väzobné miesto
RF	release factor	uvoľňovací terminačný faktor
RND	resistance- nodulation- cell division	

RPM	revolutions per minute	otáčky za minútu
RRF	ribosomal recycling factor	ribozomálne recyklačné faktory
SD	Shine- Dalgarno	Shine- Dalgarno
SgA	streptogramin A	streptogramín A
SgB	streptogramin B	streptogramín B
SIM	structured illumination microscopy	mikroskopia metódou štruktúrovaného osvetlenia
SMR	small multidrug resistance	
TIA	Tiamulin	tiamulín
TIR	translation initiation region	oblasť iniciácie translácie
TET	Tetracycline	tetracyklín
TMD	transmembrane domain	transmembránová doména
T/T	translation, transcription assay	translačný, transkripčný assay
uORF	upstream open reading frame	upstream otvorený čítací rámec
UV svetlo	ultra violet light	ultrafialové svetlo
Vat	virginiamycin A acetyltransferase	virginiamycín A acetyltransferáza
WF	wide-field	wide-field
WHO	World Health Organization	Svetová zdravotnícka organizácia

1 ÚVOD

Antibiotická rezistencia v súčasnosti predstavuje celosvetový problém, na ktorý upozornila aj Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) (www.who.int/antimicrobial-resistance/en/). Účinnosť antibiotík po ich zavedení do klinickej praxe od polovice 80. rokov minulého storočia výrazne klesá, pretože stále viac baktérií si začalo vyvíjať mechanizmy a prostriedky odolnosti voči antibiotikám. Príčinou vzniku a šírenia rezistencie je nadmerné či nevhodné používanie antibiotík v liečbe bakteriálnych infekcií. Detailnejšie pochopenie účinku antibiotík a mechanizmov rezistencie by mohlo viesť k vývoju účinnejších antibakteriálnych látok (Lin *et al.* 2015; Sharkey *et al.* 2016). Napriek tomu, že je v súčasnosti väčšina mechanizmov rezistencie voči klinicky významným antibiotikám dobre charakterizovaná, stále existujú rezistencie, ktorých mechanizmus nie je úplne objasnený. Medzi ne patrí aj rezistencia spôsobená antibioticky rezistentnými (ARE) ABC-F proteínmi (Sharkey *et al.* 2016).

ABC-F proteíny patria do superrodiny ABC (ATP- binding cassette) transportérov. ABC transportéry sú tvorené integrálnymi membránovými proteínmi, ktoré sú prítomné u baktérií, archea a eukaryot (Sharkey *et al.* 2016). Sú zodpovedné za ATP- riadenú translokáciu mnohých substrátov cez membránu. Štruktúrna organizácia klasických ABC transportérov pozostáva z dvoch nukleotid- väzobných domén (NBD) a dvoch transmembránových domén (TMD) (Schneider & Hunke 1998; Lubelski *et al.* 2007). ABC-F proteíny sú však narozdiel od typických ABC transportérov zložené iba z dvoch NBD, ktoré sú fúzované do jedného polypeptidu (Rees *et al.* 2009). Nakoľko nemajú TMD, tak sa zúčastňujú bunkových procesov iných ako transportných, napr. DNA opravy, enzymatických regulácií, translačnej kontroly a antibiotickej rezistencie (Sharkey *et al.* 2016). Práve týmto ARE ABC-F proteínom sa táto práca venuje. Tieto proteíny udeľujú rezistenciu k antibiotikám, ktoré inhibujú syntézu proteínov väzbou do 50S podjednotky ribozómu u Gram pozitívnych bakteriálnych patogénov (Sharkey *et al.* 2016). Napriek tomu, že sú všadeprítomné ich mechanizmus pôsobenia bol popísaný len nedávno (Su *et al.* 2018) a stále sú niektoré aspekty ich funkcie neobjasnené. Kedysi boli nastolené dve konkurujúce hypotézy. Prvá predpokladala, že je rezistencia spôsobená efluxom, čo naznačuje umiestnenie niektorých z nich na membráne (Chesneau 2005). Druhá predpokladala, že tieto proteíny chránia ribozóm, tak ako bolo ukázané v štúdiách od Sharkey *et al.* (2016) a Su *et al.* (2018). Avšak napriek doposiaľ získaných poznatkov, tu stále pretrvávajú otázky týkajúce sa ich membránovej lokalizácie, ktorá bola preukázaná pre

proteín Vga(A) v štúdií od Chesneau (2005), kde frakcionáciou buniek zdetegovali prítomnosť ARE-ABCF proteínov iba v membránovej frakcii, nie však v ribozomálnej.

CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo sledovanie subcelulárnej lokalizácie rezistentných proteínov Vga(A)_{LC} a Msr(A) v živých bunkách *Staphylococcus aureus* prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie a to v nasledujúcich krokoch:

- Príprava konštruktu exprimujúceho fúzny fluorescenčný proteín Vga(A)_{LC}- mEos2
- Overenie funkčnosti fúznych proteínov Vga(A)_{LC}-mEos2 a Vga(A)_{LC}-GFP
- Sledovanie lokalizácie fúznych proteínov Vga(A)_{LC}-mEos2, Vga(A)_{LC}-GFP a Msr(A)-eqFP650 za rôznych kultivačných podmienok a v rôznych kmeňoch *S. aureus*
- Overiť subcelulárnu lokalizáciu rezistentného proteínu Vga(A)_{LC}-GFP frakcionáciou buniek a Western blot analýzou

Druhým cieľom tejto diplomovej práce bolo *in vivo* sledovanie expresie rezistentného proteínu Vga(A)_{LC} v klinických izolátoch *S. haemolyticus*.

2 PREHĽAD LITERATÚRY

2.1 BAKTERIÁLNA PROTEOSYNTÉZA

Vo všetkých živých organizmoch sa bakteriálnej proteosyntézy -translácie-zúčastňujú ribozómy, čo sú komplexy RNA a proteínov (Laursen 2005). Eukaryotické a prokaryotické ribozómy sa od seba líšia veľkosťou a stavbou. Zatiaľ čo eukaryotický ribozóm 80S pozostáva z malej podjednotky 40S a z veľkej podjednotky 60S, bakteriálny ribozóm 70S je menší s približnou molekulovou hmotnosťou 2,5 MDa a priemerom 200-250 Å (Waller 1964; Wimberly *et al.* 2000). Pozostáva z dvoch asymetrických ribonukleoproteínových podjednotiek, 30S a 50S podjednotky. Menšia 30S (0,8 MDa) podjednotka je zložená z jedného reťazca 16S rRNA pozostávajúcej z 1542 nukleotidov (nt) a 21 ribozomálnych proteínov. Väčšia 50S (1,5 MDa) podjednotka pozostáva z dvoch rôznych rRNA, 23S rRNA (2904 nkt) a 5S rRNA (120 nt) a z 34 proteínov (Wimberly *et al.* 2000; Laursen *et al.* 2005; Byrgazov *et al.* 2013).

Každá podjednotka zohráva špecifickú funkciu pri syntéze bielkovín. Hlavnou funkciou malej ribozomálnej podjednotky je väzba na mRNA v iniciačnom kroku translácie. Je podstatná pri dekódovaní genetickej informácie, v priebehu ktorej sa príslušné kodóny mRNA párujú s antikodónmi tRNA (Yonath 2005). Funkciou veľkej ribozomálnej podjednotky je, že katalyzuje tvorbu peptidovej väzby v peptidyltransferázovom centre (PTC). Obsahuje tri väzobné miesta: aminoacylové miesto (A), ktoré prijíma prichádzajúcu aminoacyl- tRNA (aa- tRNA); peptidylové miesto (P), ktoré viaže tRNA s nasýteným peptidovým reťazcom; a výstupné (E) miesto, viažuce deacylovanú tRNA v PTC. Poskytuje väzobné miesta pre elongačné faktory (EF) a zabezpečuje tvorbu a polymerizáciu aminokyselín (Ramakrishnan 2002; Yonath 2005).

Translácia je komplexný proces rozdelený do štyroch fáz (Obr. 1). Prvou je iniciácia, v ktorej sa ribozomálny komplex zostavuje v oblasti iniciácie translácie (TIR) na mRNA. Druhým krokom je elongácia, v ktorej dochádza polymerizáciou aminokyselín k predlžovaniu polypeptidového reťazca. V ďalšom kroku označovaným ako terminácia, sa molekula mRNA posúva po malej podjednotke ribozómu a po dosiahnutí STOP kodónu dôjde k ukončeniu translácie a novosyntetizovaný proteín sa uvoľní. Posledným krokom,

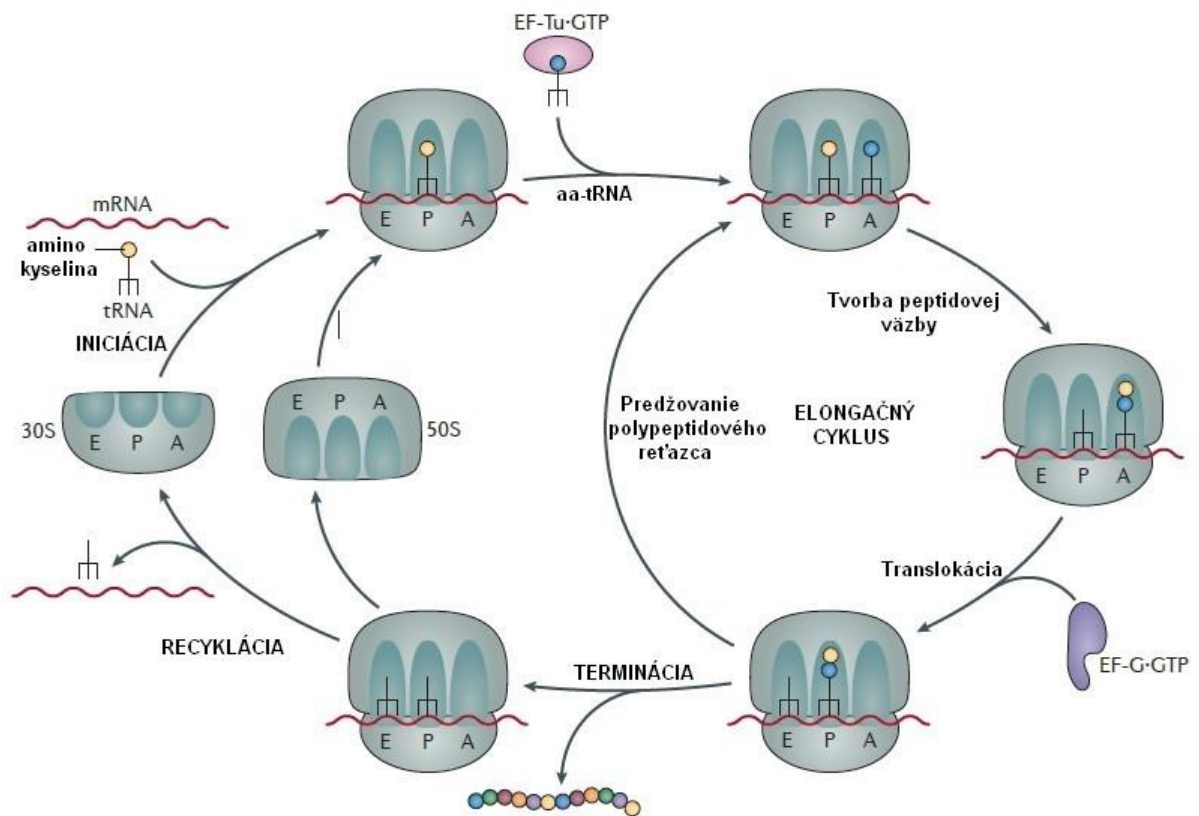
označovaným ako recyklácia, dochádza za účasti recyklačných faktorov k disociácii ribozómu na jednotlivé podjednotky pre ďalší cyklus syntézy bielkovín (Laursen 2005).

Translácia u prokaryot prebieha súčasne s transkripciou a ribozómy tak iniciujú bakteriálnu transláciu na mRNA už počas transkripcie (Laursen 2005). Na začiatku translačného cyklu sa vytvorí komplex medzi tRNA, mRNA a 30S podjednotkou ribozómu, ktorá interaguje so Shine- Dalgarno (SD) sekvenciou na mRNA, komplementárnou k 3' koncu 16S RNA (Ramakrishnan 2002). Iniciátorová tRNA nabitá iniciačnou aminokyselinou, metionínom (fMet- tRNA^{fMet}) sa naviaže na štart kodón AUG na mRNA, v P mieste ribozómu (Gualerzi & Pon 1990). Proces iniciácie prebieha za pomoci troch iniciačných faktorov (IF1, IF2 a IF3). IF1 sa špecificky viaže do A miesta 30S ribozomálnej podjednotky, čím ho blokuje a usmerňuje naviazanie iniciátorovej tRNA do P miesta. IF2 je GTP- dependentný faktor, ktorý sa prednostne viaže na fMet- tRNA^{fMet}. IF3 pomáha pri výbere iniciátorovej tRNA tým, že destabilizuje väzby iných tRNA v P mieste ribozómu a pevne sa viaže na 30S podjednotku (Hartz *et al.* 1990). Ku iniciačnému komplexu sa následne pripojí 50S podjednotka, čím dôjde k vytvoreniu 70S iniciačného komplexu a uvoľneniu iniciačných faktorov. Kompletný ribozóm je pripravený vstúpiť do druhej fázy translačného cyklu (Zucker & Hershey 1986; Laursen 2005).

V druhej fáze translačného cyklu tzv. elongácie si ribozóm pomocou tRNA nabitých aminokyselín a elongačných faktorov (EF-Tu, EF-G, EF-TS) formuje polypeptidový reťazec. Ribozóm sa pohybuje pozdĺž mRNA v smere 5' - na 3' - koniec (pre tento pohyb je potrebná energia získaná hydrolýzou GTP). Elongácia začína vstupom aa- tRNA do A miesta na ribozóme, ktoré je susediace s P miestom, pomocou EF-Tu v komplexe s GTP (Vanuffel 1996; Laursen 2005). Počas procesu dekódovania, ribozóm monitoruje správne interakcie párovania báz medzi kodónom na mRNA a antikodónom na tRNA. Tvorba peptidovej väzby sa uskutočňuje medzi aminokyselinami naviazanými na tRNA v miestach A a P, čo vedie k prenosu aminokyseliny (alebo polypeptidového reťazca v neskorších cykloch elongácie) z tRNA v mieste P na aa- tRNA v mieste A. Aby sa mohla naviazať ďalšia aa- tRNA, tRNA s polypeptidovým reťazcom sa presúvajú z A a P miesta do P a E miesta, v procese známym ako translokácia, ktorá je uskutočnená za účasti EF-G. Výsledkom je ribozóm s deacylovanou tRNA v mieste E, peptidyl tRNA v mieste P a prázdne A miesto pre aa- tRNA (Vanuffel 1996; Ramakrishnan 2002; Laursen 2005).

Celý dej sa opakuje a peptidový reťazec narastá s pribúdajúcim sa počtom aminokyselín až do chvíle, než sa na molekule mRNA vyskytne špecifický triplet v mieste A, označovaný ako STOP kodón. STOP kodón je signálom pre termináciu proteosyntézy. U baktérií sú STOP kodóny rozpoznávané tzv. uvoľňovacími terminačnými faktormi RF1, RF2 (release factor). Hydrolýzou peptidyl- tRNA väzieb, sa uvoľní polypeptidový reťazec z ribozómu. Faktory RF1 a RF2 spoločne rozpoznávajú UAA STOP kodón. Individuálne je UAG rozpoznávaný RF1 a UGA RF2 faktorom (Ramakrishnan 2002).

Novosyntetizovaný proteín sa uvoľňuje z ribozómu cez tzv. peptidový výstupný tunel (PET). V tomto bode sa komplex z peptidylu- tRNA, z ribozomálnych podjednotiek disociuje a mRNA je uvoľnená. Takto sú ribozómy opäť pripravené začať nový cyklus translácie. Tohto procesu sa zúčastňujú tzv. ribozomálne recyklačné faktory (RRF) spolu s EF-G (Ramakrishnan 2002; Lancini & Parenti 1995).



Obrázok 1 Bakteriálna proteosyntéza. Iniciácia spočíva v zložení 70S ribozómu (30S a 50S podjednotka) spolu s iniciačnou tRNA a ŠTART kodónom na mRNA v P mieste. V elongačnom cykle prichádza aminoacyl- tRNA (aa- tRNA) do A miesta ribozómu za pomoci elongačného faktoru Tu (EF-Tu). Translokácia tRNA je katalyzovaná pomocou EF-G. Poslednými krokmi proteosyntézy sú terminácia a recyklácia, ktoré vedú k uvoľneniu polypeptidového reťazca a následnej disociácii 70S ribozómu pre ďalší cyklus translácie (Wilson 2014- upravené).

2.2 MAKROLIDY, LINKOZAMIDY, STREPTOGRAMÍNY, PLEUROMUTILÍNY (MLSP)

Makrolidy, linkozamidy, streptogramíny a pleuromutilíny (MLSP) sú chemicky odlišné, ale funkčne podobné antibiotiká. Inhibujú proteosyntézu väzbou na 50S podjednotku bakteriálneho ribozómu (Tenson *et al.* 2003; Le Bouter *et al.* 2011). Spektrum ich účinku zahŕňa Gram pozitívne koky (predovšetkým stafylokoky a streptokoky), Gram pozitívne sporujúce aeróbne tyčinky (bacily), Gram negatívne koky a intracelulárne baktérie (*Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*). Gram negatívne tyčinky sú všeobecne rezistentné k týmto antibiotikám s niektorými dôležitými výnimkami (t.j. druhy *Bordetella pertussis*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*) (Leclercq 2002).

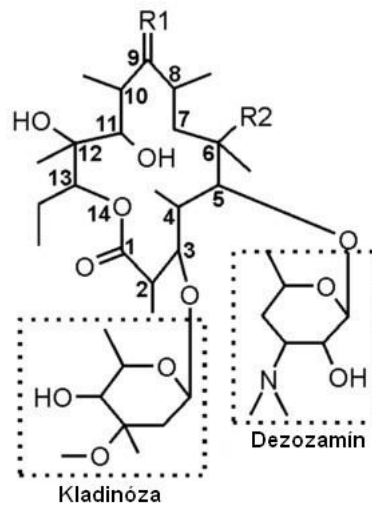
2.2.1 KLINICKY VYUŽÍVANÉ MLSP ANTIBIOTIKÁ

2.2.1.1 Makrolidy

Makrolidové antibiotiká sa zaraďujú medzi najúspešnejšie antibakteriálne látky (Kannan *et al.* 2014). Predstavujú alternatívu miesto použitia penicilínov a cefalosporínov na liečbu infekcií spôsobených Gram pozitívnymi mikroorganizmami (Le Bouter *et al.* 2011).

Vyznačujú sa komplexnou makrocyclickou štruktúrou s 14-, 15-, alebo 16- členným laktónovým kruhom, ku ktorému sa viažu minimálne 2 aminocukry alebo neutrálne cukry pomocou glykozidických väzieb (Leclercq 2002; Schroeder & Stephens 2016).

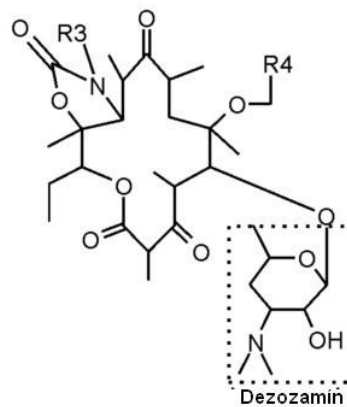
Predstaviteľom prvej generácie makrolidov (Mac) je erytromycín (ERY) (Obr. 2), ktorý bol aj prvým používaným Mac v klinickej praxi od roku 1952 (Salih *et al.* 2014). ERY je produkovaný z *Saccharopolyspora erythraea* a skladá sa z 14- členného kruhu s dvomi cukornatými zložkami (kladinóza, dezozamín) (Obr. 2) (Poehlsgaard & Douthwaite 2003).



ERYTROMYCÍN

Obrázok 2 Chemická štruktúra erytromycínu so cukornatými zložkami, kladinózou a dezozamínom (Vimberg *et al.* 2004- upravené).

Neskôr bolo vyvinutých niekoľko derivátov antibiotík, ktoré sa označujú ako druhá generácia Mac. Druhá generácia Mac (klaritromycín, roxitromycín, azitromycín, josamycin) sa vyznačuje lepšou farmakodynamikou, rozšíreným spektrom účinku voči Gram pozitívnym baktériám a lepšou stabilitou v kyslom prostredí (Gaynor & Mankin 2003; Tenson *et al.* 2003). Postupom času však došlo k rozvoju rezistencie aj u vyššie spomínaných makrolidových antibiotík druhej generácie. Najnovšou generáciou Mac sú ketolidy. Tieto 14- členné kruhové liečivá sa od Mac štruktúrne odlišujú prítomnosťou keto skupiny namiesto kladinózového zvyšku v polohe C3 laktónového kruhu a majú alkyl-arylové postranné reťazce (Obr. 3) (Tenson *et al.* 2003) . Vyznačujú sa zlepšenou aktivitou voči niektorým rezistentným kmeňom (Gaynor & Mankin 2003).

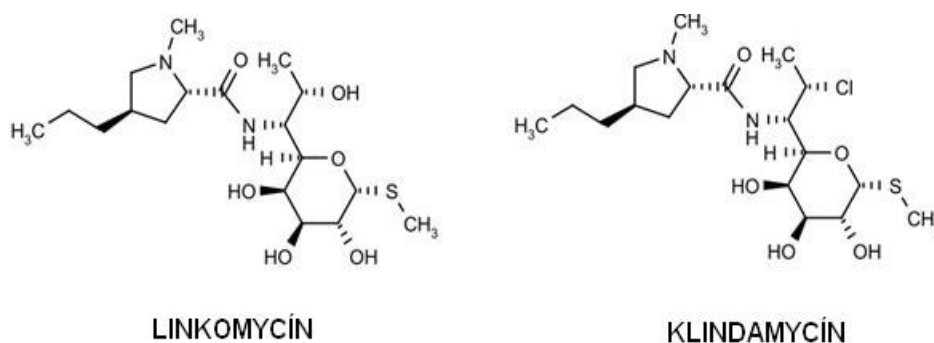


KETOLIDY

Obrázok 3 Chemická štruktúra ketolidu (Vimberg *et al.* 2004- upravené).

2.2.1.2 Linkozamidy

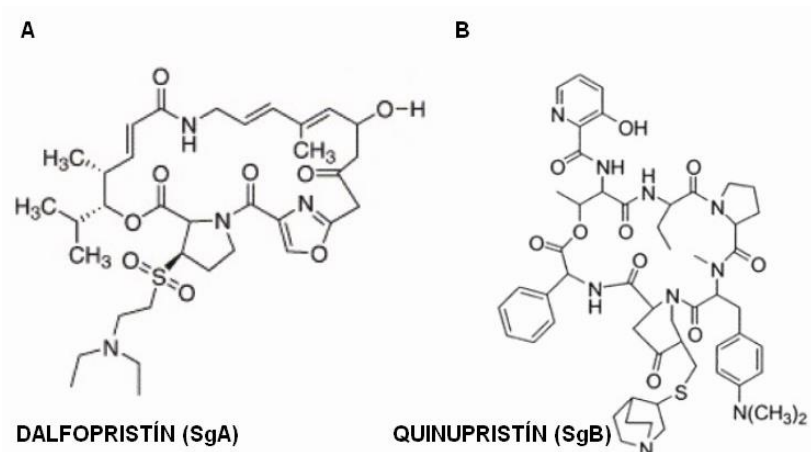
Jedinými klinicky využívanými linkozamidmi sú linkomycín (LIN), ktorý bol izolovaný z pôdneho organizmu *Streptomyces lincolnensis* a zavedený do klinickej praxe v roku 1963 a jeho semisyntetický derivát klindamycín (CLI), ktorý bol pripravený chloráciou LIN na siedmom uhlíku aminocukornatej časti (Obr.4). Štruktúra LIN pozostáva z cukornatej zložky metyltiolinkozamidu a aminokyselinového derivátu propylprolínu, ktoré sú spojené amidovou väzbou. Vykazujú biologickú aktivitu najmä proti Gram pozitívnym baktériám, anaeróbnym baktériám a protozoám. Obe antibiotiká majú bakteriostatický účinok t.j. inhibujú syntézu proteínov. Pri vyšších koncentráciách môžu pôsobiť baktericídne (Ball *et al.* 1978; Spížek & Rezanka 2017).



Obrázok 4 Chemická štruktúra linkomycínu a klindamycínu (Poehlsgaard & Douthwaite 2003- upravené).

2.2.1.3 Streptogramíny

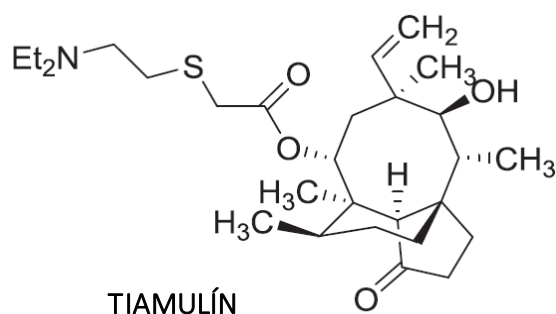
Streptogramíny sú prírodné látky produkované kmeňom *Streptomyces pristinaespiralis* (pristinamycín I a II) a *Streptomyces virginiae* (virginiamycín M a S). Na základe chemickej štruktúry ich rozdeľujeme do dvoch skupín: streptogramíny A (SgA) a streptogramíny B (SgB). SgA sú tvorené cyklickými polynenasýtenými makrolaktónmi (pristinamycín IIA, virginiamycín M). Komponenty SgB sú cyklické hexadepsipeptidy (pristinamycín IA, virginiamycín S) (Cocito *et al.* 1997; Jacquet *et al.* 2008). Klinicky využívaným semisyntetickým derivátom odvodeným od SgA (PIIA) je dalfopristín (Obr. 5A) a od SgB (PIA) je quinupristín (Obr. 5B). Liek zložený z týchto dvoch zložiek je známy pod obchodným názvom Synercid (Yonath 2005). Individuálne pôsobia bakteriostaticky, zatiaľ čo kombinácia týchto dvoch zložiek vedie k synergickému efektu so sto násobne vyššou aktivitou, čoho výsledkom je baktericídny účinok streptogramínov (Haroche *et al.* 2000; Mast & Wohlleben 2014).



Obrázok 5 Chemická štruktúra dalfopristínu a quinupristínu (Bockstael & Aerschot 2009- upravené).

2.2.1.4 Pleuromutilíny

Pleuromutilíny (Plu) boli objavené ako prírodné antibiotiká v roku 1950 (Novak & Shlaes 2010). Sú produkované hubou z rodu *Pleurotus*. Prvým semisyntetickým derivátom pleuromutilínu, ktorý bol schválený pre použitie vo veterinárnej praxi v roku 1979 je tiamulín (TIA) (Obr. 6) (Eyal *et al.* 2016). Vo všeobecnosti vykazujú Plu silnú aktivitu voči Gram pozitívnym a niektorým Gram negatívnym organizmom (*Haemophilus influenzae*). Pozostávajú z trojcyklického mutilínového jadra s postranným reťazcom C- 14 kyseliny glykolovej, z ktorej keto- skupina C- 21 je esenciálna pre antimikrobiálnu aktivitu (Brown & Dawson 2015).



Obrázok 6 Chemická štruktúra tiamulínu (Brown & Dawson 2015- upravené).

2.2.2 MECHANIZMY ÚČINKU MLSP ANTIBIOTÍK

Bakteriálne patogény rezistentné k látkam s antibiotickým účinkom aktuálne predstavujú závažný globálny problém. Na základe mechanizmu účinku rozdeľujeme antibiotiká na: antibiotiká inhibujúce syntézu peptidoglykanu, antibiotiká poškodzujúce bunkovú membránu, antibiotiká inhibujúce replikačný či transkripčný aparát a antibiotiká inhibujúce syntézu proteínov (Poehlsgaard & Douthwaite 2003; Wilson 2016).

Práve inhibícia proteosyntézy je jedným z kľúčových funkčných mechanizmov účinku niektorých klinicky využívaných antibiotík. Presný molekulárny mechanizmus MLSP antibiotík závisí predovšetkým od toho kam sa v ribozóme chemická látka viaže. Tá ovplyvňuje interakciu s ribozómom i spôsob inhibičného účinku (Gaynor & Mankin 2003). MLSP antibiotiká inhibujú proteosyntézu väzbou do 50S podjednotky v mieste PET, neďaleko PTC, ktorým novosyntetizované proteíny vychádzajú z ribozómu (Obr. 7) (Roberts 2008; Kanoh & Rubin 2010). Vo všeobecnosti, inhibícia proteosyntézy môže prebiehať piatimi spôsobmi: 1. inhibíciou elongácie nascentného peptidového reťazca v priebehu včasných fáz translácie, 2. stimuláciou disociácie peptidyl- tRNA z ribozómu, 3. inhibíciou tvorby peptidovej väzby, 4. zabránením správneho zloženia veľkej ribozomálnej podjednotky, 5. dysreguláciou proteosyntézy. Pričom inhibičný účinok MLSP antibiotík závisí od vzdialenosti ich väzby od PTC (Gaynor & Mankin 2003).

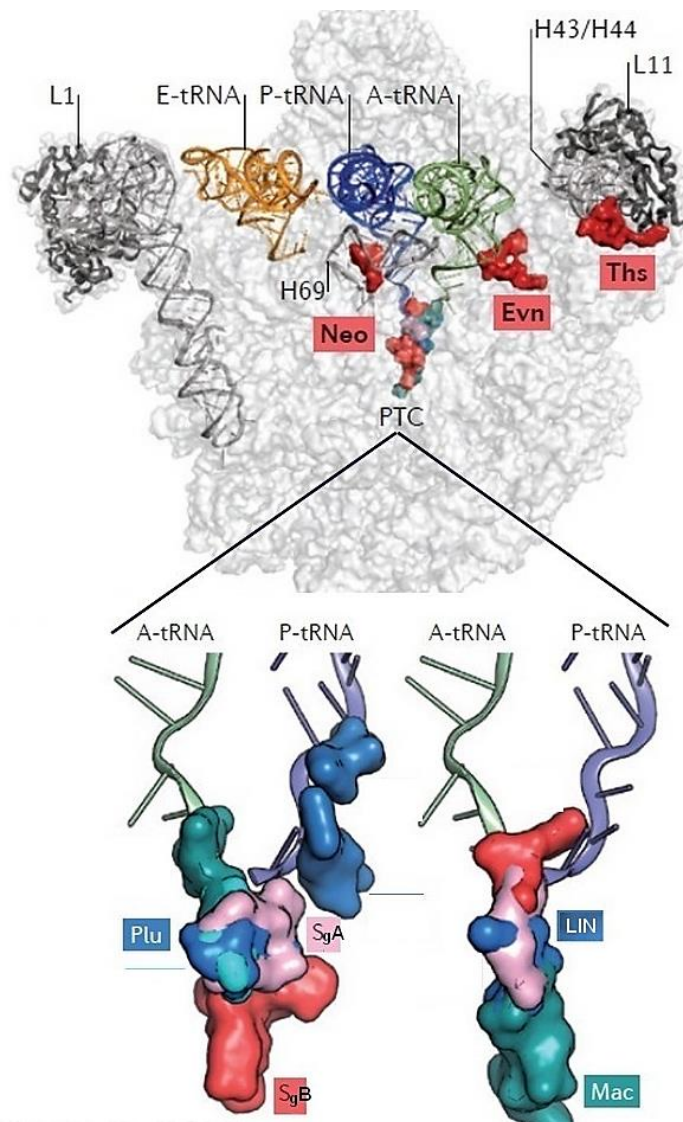
Mac sa viažu do 50S podjednotky, v mieste PET tesne pred konstrikciami tvorenou ribozomálnymi proteínmi L4 a L22. Väzba Mac dramaticky zužuje tunel, čím blokuje výstup polypeptidového reťazca z ribozomálneho tunelu (Gaynor & Mankin 2003; Kannan *et al.* 2012). Zastavuje elongáciu peptidového reťazca, ktorá nakoniec vedie k disociácii peptidyl- tRNA z ribozómu (Gaynor & Mankin 2003; Becker 2013).

LIN sa narozdiel od Mac, ktoré bránia prestupu nascentného peptidu, viažu skoro do PTC, kde interagujú s A aj P miestom ribozómu a ovplyvňujú proces vzniku prvých peptidových väzieb nascentného peptidu, stimulujú disociáciu peptidyl- tRNA z ribozómu a inhibujú tvorbu peptidovej väzby (Bockstael & Aerschot 2009).

SgA sa viažu a pôsobia podobne ako LIN a blokujú naviazanie substrátu do P a A miesta PTC, čím bránia predlžovaniu polypeptidového reťazca vo včasnej fáze. K inhibícii dochádza tesne po dokončení iniciácie (Vannuffel 1996; Cocito *et al.* 1997). Okrem toho, väzba SgA indukuje konformačné zmeny na ribozóme, čím významne zvyšuje ribozomálnu afinitu SgB (Contreras & Vázquez 1977; Harms *et al.* 2004).

SgB sa viažu a pôsobia podobne ako Mac, blokujú syntézu peptidovej väzby a vedú k predčasnému uvoľneniu nekompletných polypeptidových reťazcov (Vannuffel 1996; Bockstael & Aerschot 2009).

Plu podobne ako LIN sa viažu na 50S podjednotku bakteriálneho ribozómu do PTC v A a P miestach ribozómu, kde interferujú s tvorbou peptidovej väzby a sprostredkovávajú tak inhibíciu biosyntézy bakteriálnych proteínov (Dawson 2015; Eyal *et al.* 2016).



Obrázok 7 Znáznornenie veľkej rizoosomálnej podjednotky (50S) a väzby rôznych antibiotík v blízkosti PTC. Mac, SgB; rezistencia udeľovaná Msr(A) proteínom. Spôsobujú inhibíciu elongácie nascentného reťazca. LIN, SgA, Plu; rezistencia udeľovaná Vga(A)/ Vga(A)_{LC} proteínmi. Inhibujú tvorbu peptidovej väzby (Wilson 2014- upravené).

2.2.3 MECHANIZMY REZISTENCIE VOČI MLS_B ANTIBIOTIKÁM

Približne polovica antibiotík, ktorá sa v súčasnosti používa v liečbe bakteriálnych infekcií, inhibuje syntézu proteínov. Ich cieľom sú kľúčové miesta ribozómu. Sú známe štyri základné mechanizmy rezistencie voči MLS_B antibiotikám u Gram pozitívnych baktérií: 1) modifikácia cieľového miesta mutáciou alebo metyláciou 2) ochrana ribozómu ARE ABC-F proteínmi 3) enzymatická inaktivácia antibiotík 4) aktívny eflux antibiotík (Leclercq 2002; Shaker, Khaled *et al.* 2014).

2.2.3.1 Modifikácia cieľového miesta

Spoločnou a zároveň najvýznamnejšou stratégiou baktérií pre rozvoj antimikrobiálnej rezistencie je vyvarovanie sa účinku antibiotika tým, že zabraňujú ich väzbe do cieľového miesta. Mutáciou alebo metyláciou ribozómu (Munita & Arias 2016).

a) Metylácia 23S ribozomálnej RNA

Jedným z najlepšie preštudovaných prípadov rezistencie prostredníctvom enzymatickej modifikácie cieľového miesta je metylácia ribozómu katalyzovaná enzýmom, ktorý je kódovaný *erm* génmi (erytromycínová ribozomálna metylácia) (Vester & Douthwaite 2001; Gaynor & Mankin 2003). Tieto enzýmy sú schopné mono- alebo dimetylovať adenínový zvyšok v N(6) pozícii A2058 (číslovanie v *E.coli*) v PTC 23S rRNA domény V, a zabraňujú väzbe antibiotika do cieľového miesta (Poehlsgaard & Douthwaite 2003; Munita & Arias 2016). Plne zostavený ribozóm nie je substrátom pre metyltransferázu, pretože A2058 je lokalizovaný hlboko vo vnútri veľkej ribozomálnej podjednotky. Metylácia A2058 teda môže prebiehať iba počas zostavovania ribozómu, čo predstavuje veľmi krátke časové rozmedzie pre *erm* enzým na metyláciu svojho rRNA cieľa (Gaynor & Mankin 2003). Nakoľko Mac, LIN a SgB majú prekrývajúce sa väzobné miesta v 23S rRNA, expresia *erm* génov udeľuje krížovú rezistenciu voči všetkým členom MLS_B skupiny (Munita & Arias 2016).

Rozlišujeme dva typy metyltransferáz. Prvým typom sú monometyltransferázy, ktoré sú prítomné u producentov a udeľujú vysokú rezistenciu k LIN, ale nižšiu mieru rezistencie k Mac a SgB. Druhým typom sú dimetyltransferázy, ktoré udeľujú vysokú rezistenciu voči všetkým MLS_B antibiotikám (Gaynor & Mankin 2003; Poehlsgaard & Douthwaite 2003).

U stafylokokov, najpodstatnejšími *erm* génmi sú *erm* (A) (väčšinou distribuovaný v transpozóne v meticilín- rezistentných *S. aureus* (MRSA)) a *erm* (C) (vyskytujúci sa v plazmidoch v meticilín- citlivých *S. aureus*), ktorý je zodpovedný za erytromycínovú rezistenciu. Ďalšími *erm* génmi sú *erm* (B), rozšírené v enterokokoch a streptokokoch (v ktorých boli prvýkrát popísané) a gény triedy *erm* (F) u druhov *Bacteroides* a iných anaeróbných baktérií (Leclercq 2002; Munita & Arias 2016).

Postranskripčná modifikácia rRNA nukleotidov je katalyzovaná aj Cfr metyltransferázou, ktorá je kódovaná *cfr* génom. *Cfr* gén je kódovaný na plazmide a bol opísaný v roku 2000 v bovinom izoláte *Staphylococcus sciuri* (Munita & Arias 2016). Cfr metyltransferáza metyluje C- 8 v A2503 23S rRNA v PTC bakteriálneho ribozómu. Cfr udeľuje rezistenciu voči antibiotikám viažucim sa do PTC na ribozóme. S tzv. PhLOPSa fenotypom udeľuje rezistenciu voči fenikolom, LIN, oxazolidinónom, Plu, SgA a niektorým makrolidovým ATB (Atkinson *et al.* 2013).

b) Mutácie

Posledných 10 rokov bol identifikovaný rastúci počet izolátov rezistentných voči MLSP antibiotikám spôsobených mutáciami. Izoláty mali mutácie v doméne V v 23S rRNA a v proteínoch L4 a L22, ktoré viedli ku konformačným zmenám v mieste väzby pre makrolidy a k vysokému zníženiu ich účinnosti (Roberts 2008). Mutácie v proteíne L4 priamo alebo alostericky ovplyvňujú väzbu antibiotika a bránia jeho väzbe na ribozóm. Mutácie v ribozomálnom proteíne L22 spôsobujú rezistenciu voči antibiotikám prostredníctvom nepriameho mechanizmu. Ich vplyvom dôjde k rozšíreniu ribozomálneho tunelu a nascentný peptid je tak schopný vyhnúť sa naviazanému antibiotiku, alebo poprípade vytesniť antibiotikum z väzobného miesta (Gabashvili *et al.* 2001; Gaynor & Mankin 2003).

2.2.3.2 Ochrana ribozómu ARE ABC-F proteínmi

Spoločne ARE ABC-F rodina proteínov udeľuje rezistenciu voči väčšine klinicky významným antibiotikám, ktoré sa viažu na 50S podjednotku ribozómu, konkrétne k Mac, LIN, ketolidom, fenikolom, Plu a Sg skupiny A a B. Žiadny z ARE ABC-F proteínov, však neudeľuje rezistenciu ku všetkým uvedeným skupinám naraz. ARE ABC-F proteíny možno rozdeliť do troch skupín, ktoré sú založené na schopnosti udeľovať

rezistenciu voči antibiotikám. 1. Vga, Lsa, Sal homológy udeľujúce rezistenciu voči LIN, SgA a Plu. 2. Msr homológy udeľujúce rezistenciu voči Mac a SgB. 3. OprA homológy udeľujúce rezistenciu voči fenikolom a oxazolidinómom (Wang *et al.* 2015; Sharkey *et al.* 2016). V rámci fenotypových skupín, však jednotlivé proteíny udeľujú rôznu mieru rezistencie (Lenart *et al.* 2015). Lsa je kódovaný na chromozóme *Enterococcus faecalis*. Udeľuje rezistenciu voči Lin a SgA (Singh *et al.* 2002). Medzi významné proteíny patrí Vga(A) a Msr(A), obidva sú kódované mobilnými genetickými elementami v stafylokokoch. Vga(A) poskytuje nízku úroveň rezistencie voči LIN a vysokú odolnosť voči SgA, zatiaľ čo Msr(A) poskytuje vysokú rezistenciu voči 14-, 15- členným Mac a SgB (Jacquet *et al.* 2008; Alekshun & Levy 2007). Podrobne sa budem venovať ARE ABC-F proteínom v kap. 2.4.3.

2.2.3.3 Aktívny eflux antibiotík

Keďže cieľom mnohých antibiotík používaných v klinickej praxi sú intracelulárne bakteriálne štruktúry, tak si baktérie rozvinuli mechanizmy, ktoré udržujú nízku hladinu antibiotika v bunkách (Munita & Arias 2016). Mechanizmus je sprostredkovaný membránovými efluxnými proteínmi, ktoré sú schopné exportovať toxickú zlúčeninu z bunky a viesť tak k antibiotickej rezistencii. K dnešnému dňu bolo popísaných päť efluxných systémov, ktoré sa líšia v zmysle štruktúrnej konformácie, zdroja energie a rozsahu substrátov (Bockstael & Aerschot 2009; Munita & Arias 2016). Medzi sekundárne transportéry, využívajúce protónový gradient, patrí: RND (resistance- nodulation- cell division), MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance), MATE (multidrug and toxic compound extrusion). Medzi transportéry, poháňané energeticky závislým spôsobom prostredníctvom hydrolýzy ATP, patria ABC transportéry (Alekshun & Levy 2007; Munita & Arias 2016).

Najznámejšie transportéry udeľujúce rezistenciu k MLSP antibiotikám sú súčasťou MFS a kódované *lmrA* a *mef* génmi (*mefA*, *mefB*, *mefC* a *mefE*), ktoré exportujú linkozamidové a makrolidové antibiotiká. Vyskytujú sa hlavne u *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* (Munita & Arias 2016).

2.2.3.4 Enzymatická inaktivácia antibiotík

Niektoré baktérie produkujú enzýmy nachádzajúce sa vo vnútri alebo blízko bunkového povrchu, ktoré cielene rozpoznávajú a chemicky modifikujú antibiotikum tak, že sa stáva inaktívnym (Bockstael & Aerschot 2009).

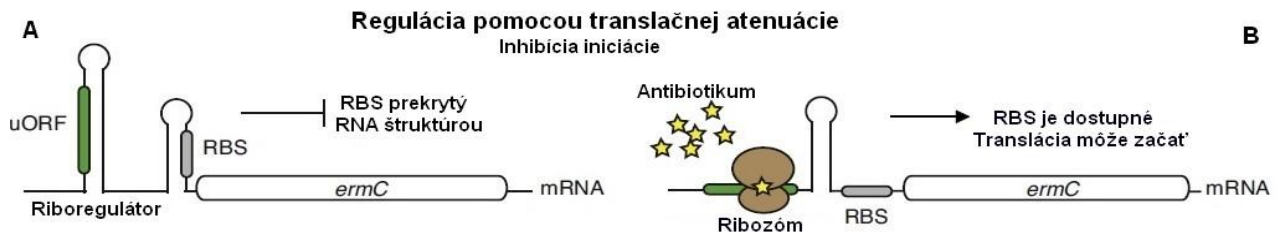
Existuje množstvo inaktivujúcich enzýmov, ktoré pôsobia na MLSP antibiotiká. Tieto gény kódujú esterázy, nukleotidyltransferázy, lyázy, acetyltransferázy, glykozylázy, a fosfotransferázy (Aleksun & Levy 2007). Esterázy ako napr. EreA a EreB sú kódované génmi *ere (A)/ (B)* a inaktivujú 14- (napr. ERY) a 15- (napr. Azitromycín) členné Mac hydrolyzou laktónovového kruhu makrocyclického jadra. Linkozamidová nukleotidyltransferáza kódovaná *lnu(A)* génom udeľuje rezistenciu len k LIN (Roberts 2008). Lyázy kódované *vgb(A)* a *vgb(B)* inaktivujú SgB štiepením esterovej väzby, čím linearizujú cyklický depsipeptid (Mukhtar 2001, Bockstael & Aerschot 2009). Acetyltransferázy, kódované génmi *vat* (virginiamycin A acetyltransferáza) inaktivujú antibiotiká SgA, prenosom acetylu z acetylCoA na sekundárny hydroxyl antibiotika (Bockstael & Aerschot 2009). Nakoniec makrolidová fosfotransferáza C kódovaná génom *mph(C)* inaktivuje 14-,15- a 16- členné makrolidové antibiotiká. Katalyzuje prenos fosfátovej skupiny (zvyčajne z ATP) na substrát (Li *et al.* 2015).

2.3 REGULÁCIA ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE

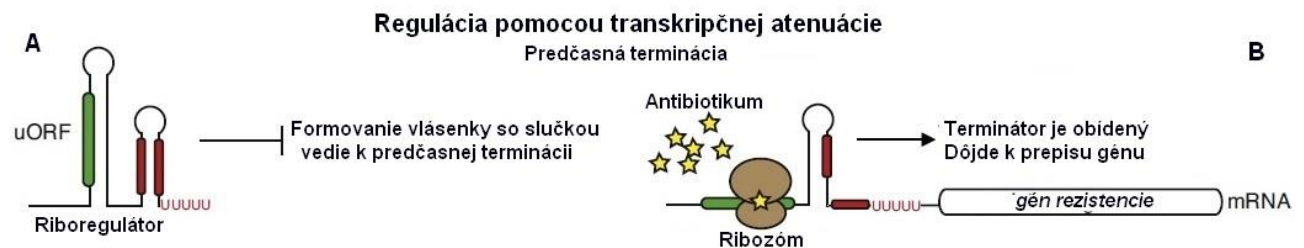
Gény rezistencie voči antibiotikám sú regulované sofistikovanými kontrolnými mechanizmami, ktoré dôsledne regulujú expresiu génov iba v prítomnosti antibiotika, čím zaisťujú vysoký efekt účinku a zároveň minimalizujú náklady na fitnes bakteriálnej populácie (Munita & Arias 2016). Rezistencia k translačným inhibítom je často regulovaná tzv. *cis*- regulačnými nekódujúcimi RNA (ncRNA), ktoré registrujú prítomnosť antibiotika a zodpovedajúcim spôsobom regulujú gény rezistencie. Tieto ncRNA, označované aj ako riboregulátory, sú štruktúrne RNA elementy. Nachádzajú sa na 5' konci neprekladaných oblastí (5'UTR) antibioticky rezistentných génov (Dar & Sorek 2017).

Najpreštudovanejšie sú mechanizmy indukcie *erm* génov. Expresia *ermC* génu u *S. aureus* je konštitutívna alebo inducibilná. V konštitutívnej expresii sa aktívna metylázová mRNA syntetizuje aj v neprítomnosti antibiotika. Inducibilná expresia súvisí s prítomnosťou riboregulátora na 5'UTR upstream od štruktúrneho *erm* génu pre metylázu (Leclercq 2002). V neprítomnosti antibiotika, RNA riboregulátory inhibujú expresiu génu rezistencie v *cis* prekrytím ribozomálneho väzobného miesta (RBS) (Obr. 8A) (Gaynor & Mankin 2003). V prípade väzby antibiotika na ribozóm, sa ribozóm zastaví nad krátkym uORF (upstream open reading frame) (tento dej označujeme ako atenuácia) a vyvolá konformačnú zmenu RNA štruktúr riboregulátorov, ktorá vedie k uvoľneniu RBS a k indukcii ErmC proteosyntézy (Obr. 8B) (Dar *et al.* 2018). Induktorom sú 14- a 15- členné Mac (Le Bouter *et al.* 2011). Neindukujúce 16- členné Mac, LIN a Sg zostávajú aj naďalej účinné (Leclercq 2002).

Okrem vyššie spomínanej regulácie na úrovni translačnej iniciácie, sú schopné riboregulátory kontrolovať expresiu génov antibiotickej rezistencie aj na transkripčnej úrovni. Napríklad u *Bacillus subtilis* pri absencii LIN alebo virginiamycínu M, dochádza k inhibícii expresie *vmlR* génu (kódujúci ABC proteín) a k ukončeniu transkripcie vznikom predčasného transkripčného terminátorového signálu tvoreného zo stabilnej štruktúry v tvare slučky, nachádzajúcim sa upstream od *vmlR* kódujúcej oblasti (Obr. 9A). Prítomnosť antibiotika a jeho väzba na ribozóm, vedie k zastaveniu ribozómu nad krátkym uORF čo spôsobí preskupenie sekundárnej štruktúry mRNA a umožnenie transkripcie a syntézy *vmlR* mRNA (Obr. 9B) (Ohki R. *et al.* 2005).



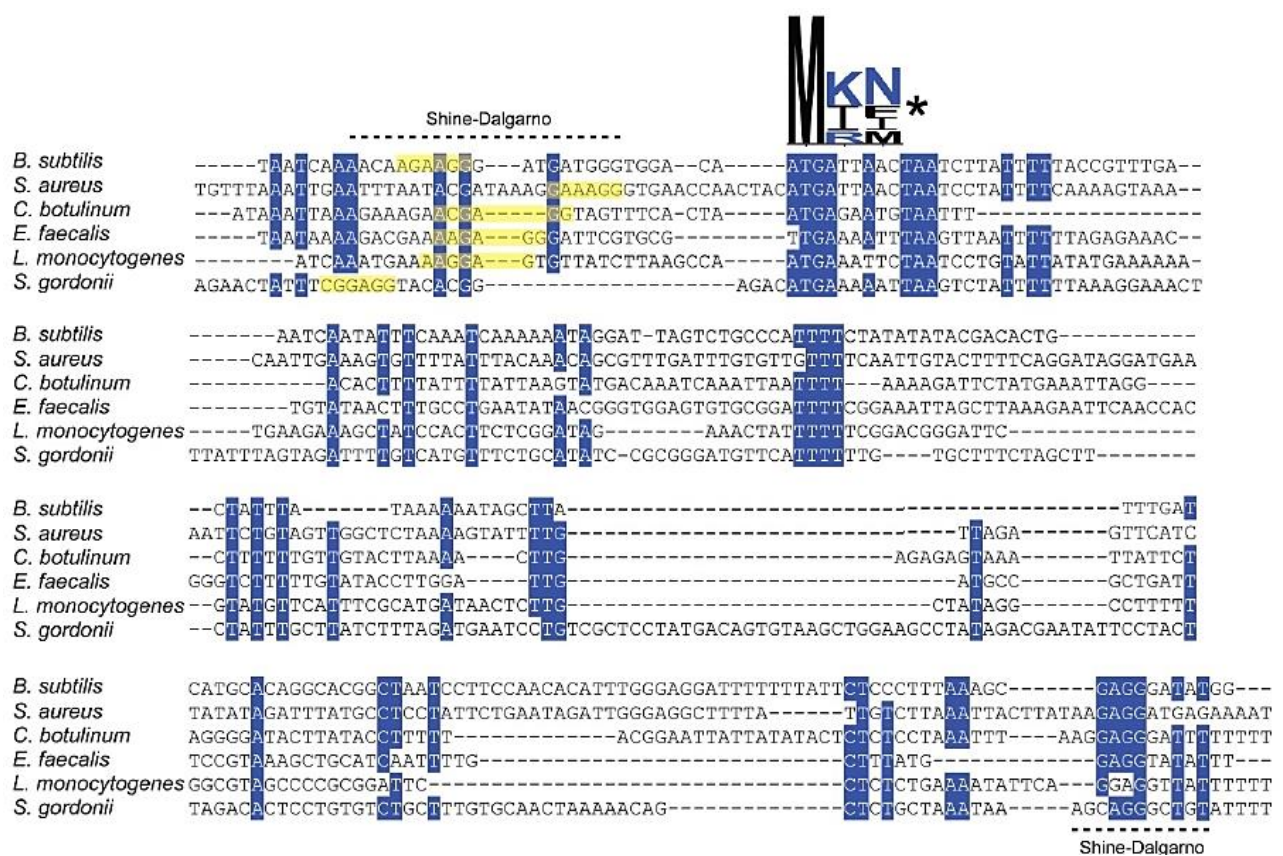
Obrázok 8 Schematické znázornenie translačnej atenuácie. **A)** V neprítomnosti antibiotík je RBS prekrytý riboregulátorom a iniciácia translácie mRNA génu rezistencie tak neprebehne. **B)** V prítomnosti antibiotika inhibujúceho transláciu, ribozóm nasadne na určitú pozíciu uORF, čo vedie ku konformačnej zmene štruktúry riboregulátora. Zmenou konformácie sa RBS uvoľní a translácia môže začať (Dar & Sorek 2017- upravené).



Obrázok 9 Schematické znázornenie transkripčnej atenuácie, ktorá reguluje expresiu v závislosti od vzniku predčasného terminátora transkripcie- vlásenky so slučkou, nasledovanej polyuridínovým traktom. **A)** V neprítomnosti antibiotika transkripcia začne a predčasne skončí. **B)** Ribozóm na uORF inhibuje tvorbu vlásenky a umožňuje transkripciu génu rezistencie (Dar & Sorek 2017- upravené).

Riboregulátory reagujú na mnohé triedy antibiotík, avšak podľa najnovšej štúdie sa u nich ukázala istá antibiotická špecifita (Dar & Sorek 2017). Príkladom je ďalší gén (kódujúci ABC proteín) *lmo0919* u *Listeria monocytogenes*, ktorý na základe proteínovej sekvencie vykazuje 41% aminokyselinovú identitu s Vga(A) ARE proteínom (Chesneau *et al.* 2005). Expresia génu *lmo0919* je kontrolovaná riboregulátorom, ktorý špecificky reaguje na LIN, ale nie na ERY alebo chloramfenikol, hoci všetky tri antibiotiká inhibujú translačnú elongáciu (Dar & Sorek 2017). Predpokladá sa, že za usmernenie antibiotickej špecifity riboregulátora je zodpovedná aminokyselinová sekvencia a dĺžka uORF. Bolo demonštrované, že antibiotická špecifita dvoch rozdielnych riboregulátorov môže byť zmenená jednou aminokyselinovou mutáciou v uORF sekvencii (Dar, Sorek 2017). Dĺžka uORF reflektuje miesto väzby antibiotika na ribozóme. U riboregulátora *lmo0919*, ktorý je indukovaný LIN, je uORF dlhý iba tri aminokyseliny, kdežto uORF regulátorov indukovaných Mac, ktoré sa viažu ďalej, je zvyčajne dlhší než 10 aminokyselín. To zodpovedá dĺžke peptidov, ktoré disociujú z ribozómu inhibovaným príslušnými antibiotikami. Linkozamidové antibiotiká zastavujú ribozóm po syntéze 1- 2 aminokyselín,

zatiaľ čo ERY vyžaduje syntézu 6- 8 aminokyselín na to, aby narastajúci peptid interagoval s antibiotikom v PET. Predpokladá sa tak, že uORF so sekvenciou troch aminokyselín pravdepodobne určuje špecifitu riboregulátora tým, že interaguje s linkozamidmi, nie však s Mac naviazanými na ribozóm (Dar & Sorek 2017). Pri určovaní antibiotickej špecifickosti riboregulátorov však pravdepodobne zohrávajú úlohu aj iné faktory, pretože chloramfenikol, ktorý sa tiež viaže do PTC v podobnom mieste ako LIN neaktivuje riboregulátor *lmo0919*. Avšak prítomnosť a pozícia tohto krátkeho uORF je konzervovaná aj u vzdialených homológov regulátora *lmo0919* (napr. *vmlR* u *B. subtilis* alebo *vga(A)* u *S. aureus*) (Obr. 10) (Dar *et al.* 2016).



Obrázok 10 Komparatívna analýza 5' UTR sekvencie u homológov *lmo0919* regulátora. Analýza sekvencií ukazuje, že zatiaľ čo nukleotidová sekvencia riboregulátora nie je zachovaná medzi druhmi a výrazne sa líši, pozícia a veľkosť krátkeho 3- aminokyselínového uORF (MXX*) je evolučne konzervovaná medzi všetkými homológmi. SD sekvencia je konzervovaná upstream od uORF (žltá). Ďalšia konzervovaná SD sekvencia je detegovaná na konci riboregulátora tesne pred oblasťou kódujúcou proteíny. Konzervované nt sú vyznačené modrou farbou (Dar *et al.* 2016).

2.4 ŠTRUKTÚRA A MECHANIZMUS FUNKCIE ABC-F PROTEÍNOV

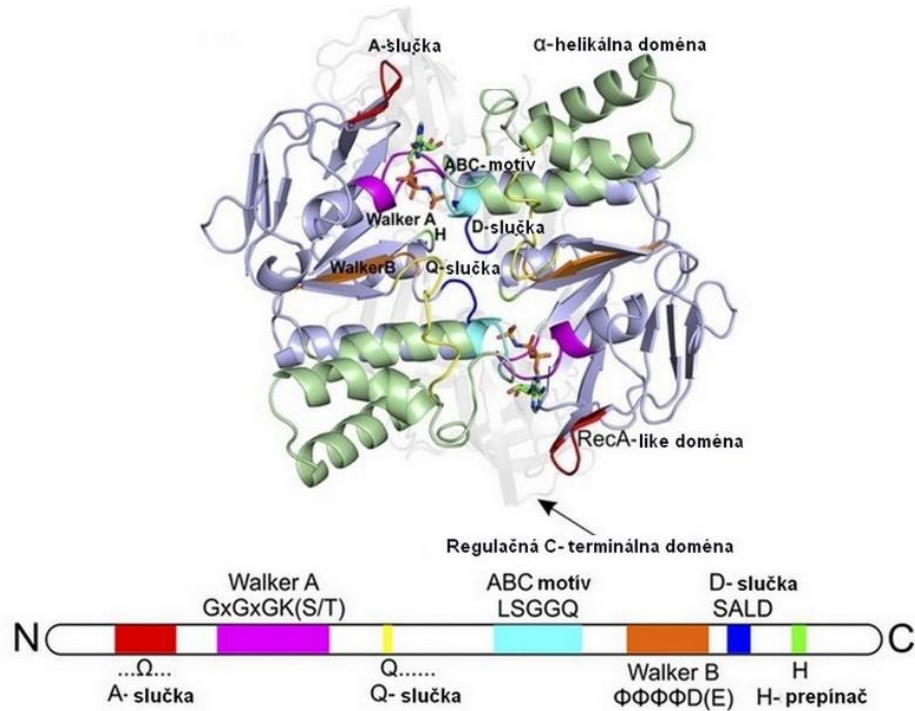
2.4.1 SUPERRODINA ABC PROTEÍNOV: ŠTRUKTÚRA A KLASIFIKÁCIA

Pre všetky živé organizmy je podstatný primárny a sekundárny transport pre príjem externých živín a odstránenie nežiaducich (toxických) zlúčenín. ABC transportéry patria do jednej z najrozšírejších skupín membránových proteínových komplexov (Rees *et al.* 2009; Licht & Schneider 2011). Zúčastňujú sa na mnohých energeticky závislých bunkových procesoch, pretože sú schopné viazať a hydrolyzovať ATP, čím dôjde k uvoľneniu chemickej energie využitej k translokácii substrátu cez membránu (Vasiliou *et al.* 2008; Beek *et al.* 2014). Okrem ABC proteínov s transportnou funkciou, existujú ABC proteíny, ktoré nemajú TMD, ale len NBD a zúčastňujú sa bunkových procesov iných ako transportných: DNA opravy, enzymatických regulácií, translačnej kontroly a antibiotickej rezistencie (Schneider & Hunke 1998; Sharkey *et al.* 2016).

NBD je narozdiel od TMD vysoko konzervovaná naprieč jednotlivými ABC rodinami (Locher 2009). Pôsobí ako motorová doména, viaže a hydrolyzuje ATP s cieľom vyvolať konformačné zmeny v TMD, ktoré umožnia transmembránový transport (Schneider & Hunke 1998; Beek *et al.* 2014). V prokaryotických bunkách sú ATP transportéry lokalizované v plazmatickej membráne, pričom ATP s NBD dimérom sa následne hydrolyzuje na cytoplazmatickej strane (Biemans-Oldehinkel *et al.* 2006; Beek *et al.* 2014).

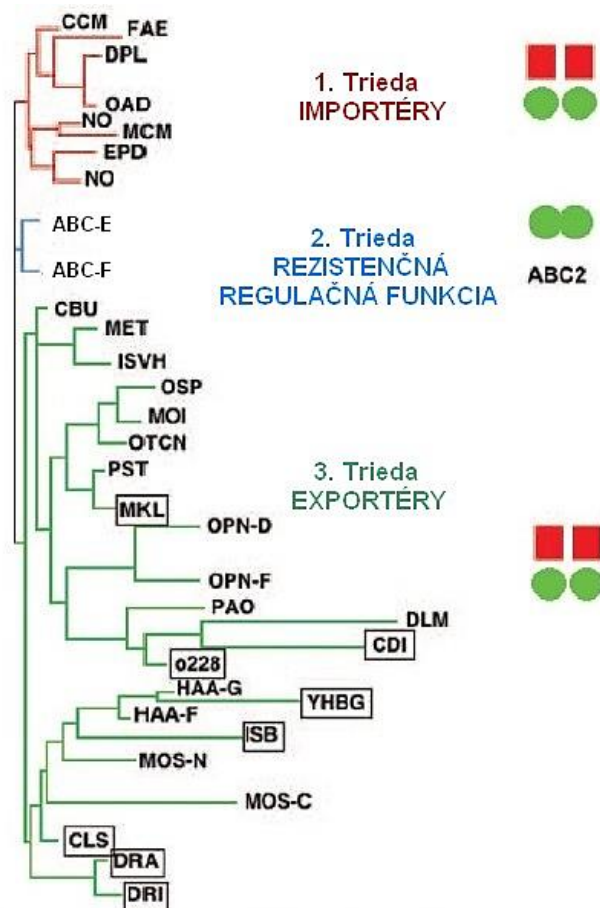
NBD pozostávajú z katalytickej RecA- like subdomény a α - helikálnej subdomény a obsahujú vysoko konzervované sekvencie aminokyselinových motívov, ktoré sú zapojené do nukleotidovej väzby a koordinácie Mg^{2+} iónov (Obr. 11). Sú to motívy 1) P- slučka alebo aj Walker A (G-X-X-G-X-KS/T), fosfát väzobná slučka je oblasť bohatá na glycín. 2) Walker B (h-h-h-h-D, kde "h" je hydrofóbna aminokyselina) motív viaže horčík, obsahuje hydrofóbnu oblasť s nabitými aminokyselinami. 3) A- slučka obsahujúca konzervovaný aromatický zvyšok (zvyčajne tyrozín) je zahrnutá v interakciách s ATP. 4) D- slučka (SALD motív) priamo nasleduje Walker B motív na C- terminálnej oblasti. Je v kontakte so zvyškami oboch *cis* aj *trans* NBD monomérov v ATP- väzobných miestach. 5) H- slučka (alebo tzv. oblasť prepínača) obsahuje vysoko konzervovaný histidínový zvyšok a je potrebný pre hydrolyzu. 6) Q- slučka je úsek približne z ôsmich zvyškov s konzervovaným glutamínovým zvyškom na N- konci a sprostredkúva interakcie medzi NBD a TMD. 7) C motív alebo inak L-S-G-G-Q, označovaný aj ako „signatúra“ je lokalizovaný v α - helikálnej subdoméne a je charakteristickým motívom ABC transportérov.

Ostatné konzervované motívy môžu byť prítomné aj u iných ATPáz (Lubelski *et al.* 2007; Vasiliou *et al.* 2008; Beek *et al.* 2014).



Obrázok 11 Schematické znázornenie pozície sekvenčných motívov v NBD (Beek *et al.* 2014- upravené).

Na základe fylogenetickej analýzy sekvencií NBD ABC proteínov, rozlišujeme tri triedy ABC proteínov (Obr. 12) (Davidson *et al.*, 2008). 1. trieda zahŕňa exportéry, ktoré sa podieľajú na sekrécii rôznych molekúl (peptidy, lipidy, hydrofóbne liečivá, polysacharidy, proteíny, toxíny). Štruktúrna organizácia exportérov pozostáva z dvoch NBD a dvoch TMD, ktoré sú fúzované v jeden polypeptid. 2. trieda zahŕňa proteíny, ktoré sa podieľajú na iných bunkových procesoch než je transport. Táto trieda proteínov má fúzované dve NBD v jeden polypeptid a postráda TMD. 3. trieda zahŕňa importéry, ktoré sú zodpovedné za transport živín do bunky u prokaryot (mono-, oligosacharidy, anorganické ióny, aminokyseliny, peptidy, kovy, vitamíny) (Lubelski *et al.* 2007; Davidson *et al.* 2008; Theodoulou & Kerr 2015). Tieto proteíny sú závislé na väzobnom proteíne (BPD, binding protein dependent) a rovnako ako prvá trieda majú dve NBD a dve TMD fúzované v jeden polypeptid (Linton 2007).



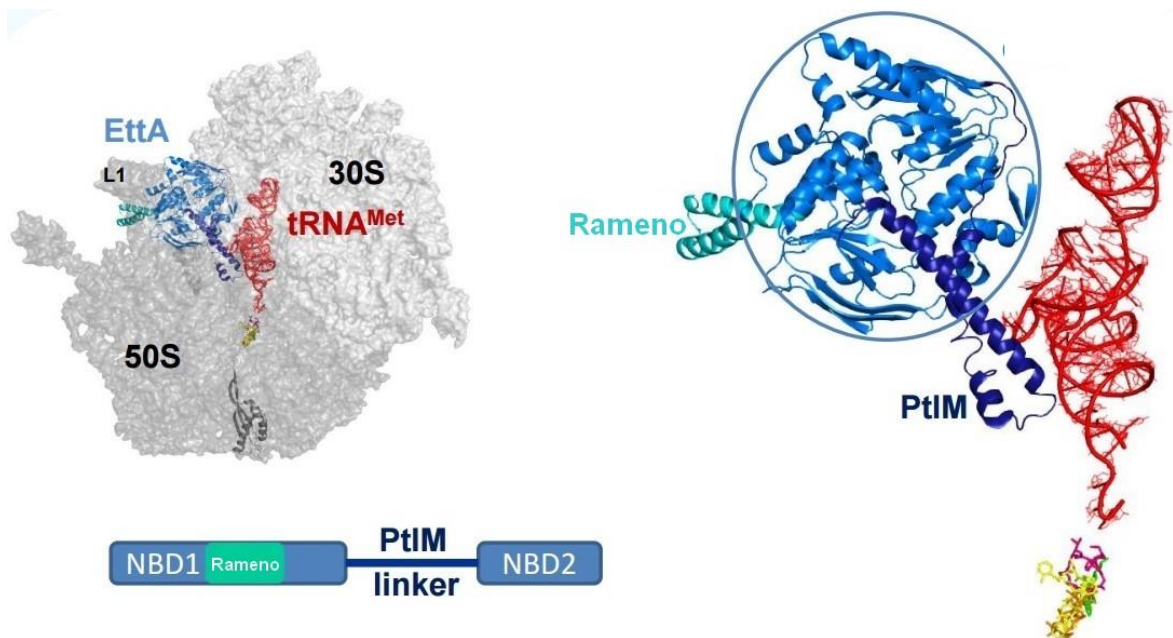
Obrázok 12 Klasifikácia ABC proteínov do troch základných tried. 1. Importéry (dve NBD a dve TMD), 2. Proteíny s rezistentnou a regulačnou funkciou (dve NBD), 3. Exportéry (dve NBD a dve TMD) (Davidson *et al.*, 2008- upravené).

2.4.2 ABC-F PROTEÍNY

V tejto práci sa venujem ABC-F proteínom, patriacim do druhej triedy ABC proteínov. Táto trieda proteínov sa podieľa na biologických procesoch iných ako je transport, zahrňujúce opravy a replikácie DNA, regulácie enzýmov, regulácie a kontroly translačných procesov (translačný faktor EttA) či na antibiotickej rezistencii, ktorej sa téma tejto diplomovej práce týka (Sharkey *et al.* 2016). ABC-F proteíny narozdiel od ostatných ABC proteínov nemajú žiadne identifikovateľné TMD (Wilson 2016; Murina *et al.* 2017). Sú to rozpustné proteíny tvorené z jediného polypeptidového reťazca s dvomi hydrofilnými NBD, ktoré sú oddelené flexibilným inter- ABC linkerom (Lenart *et al.* 2015).

Jediným nerezistentným ABC-F proteínom, ktorý bol charakterizovaný je EttA (energy- dependent translational throttle A). EttA, pôvodne nazývaná YjjK, je translačný faktor a najrozšírenejší regulačný ABC-F proteín u eubaktérií. Reguluje vstup 70S

iniciačného komplexu do elongačného cyklu translácie v závislosti od zmien intracelulárneho pomeru ATP/ ADP. V bunkách, ktoré majú nízky ATP/ ADP pomer, zamedzuje syntézu bielkovín. Dostatok ATP vedie k uvoľneniu EttA z ribozómu, čo stabilizuje ribozóm v konformácii, ktorá podporuje tvorbu peptidovej väzby v PTC a vstup ribozómu do elongačného cyklu translácie (Boel *et al.* 2014). Dôležitosť ATP hydrolyzy sa preukázala u hydrolyticky deficientnej mutanty EttA-EQ1+2 (dvojitá substitúcia v katalytických zvyškoch), ktorá negatívne ovplyvňovala bunkový rast inhibíciou proteosyntézy. EttA sa viaže na ribozóm v mieste výstupu tRNA (E miesto) (Boel *et al.* 2014; Lenart *et al.* 2015). Jedinečnou vlastnosťou štruktúry EttA (Obr. 13) je 81 AA- zvyškový linker medzi dvoma NBD. Označujeme ho ako motív interakcie tRNA v mieste P (PtIM). PtIM vytvára charakteristickú predĺženú štruktúru, ktorá vstupuje do ribozómu v smere PTC, kde aminokyselinové zvyšky na špičke PtIM domény špecificky rozpoznávajú aminoacyl- tRNA- fMet. Druhým funkčne dôležitým štruktúrnym motívom EttA je subdoména „ramena“, ktorá je vsunutá do NBD a interaguje s L1 veľkou ribozomálnou podjednotkou a obmedzuje dynamiku ribozómu podľa dostupnosti ATP, predstavuje tak vyššie spomínanú regulačnú funkciu (Boel *et al.* 2014).

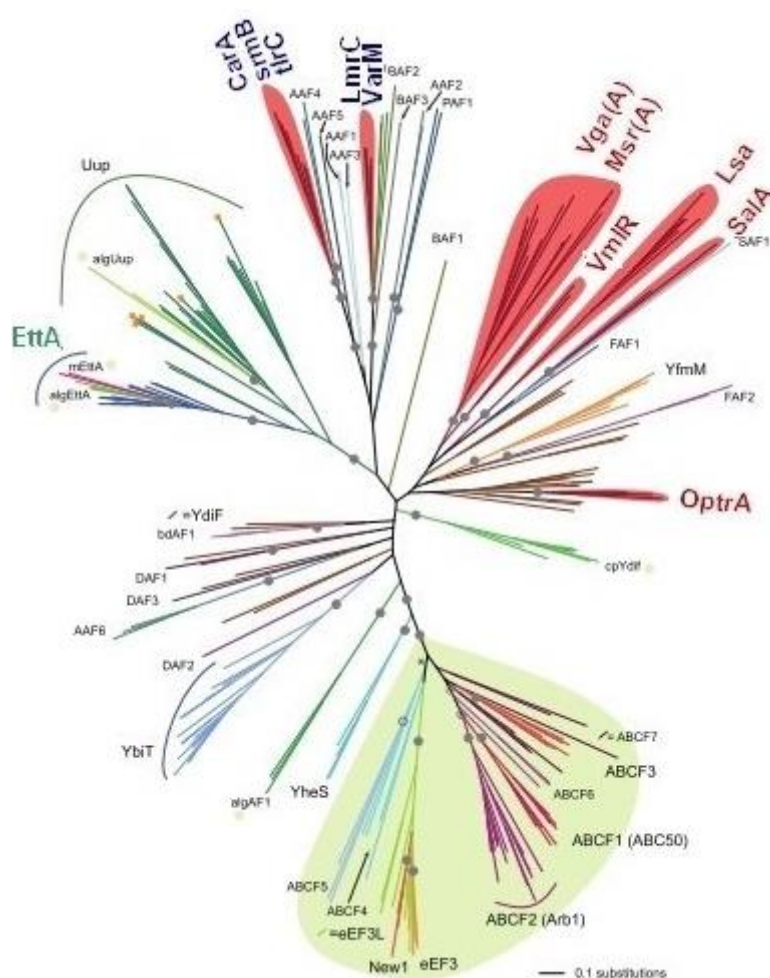


Obrázok 13 EttA (modrá) viazaná na 50S ribozomálnu podjednotku v komplexe s P- tRNA- fMet (červená) a väzobné miesta antibiotík (zelená, purpurová, žltá). Subdoména „ramena“ EttA (tyrkysová) a PtIM doména (tmavomodrá) sú označené. Približený náhľad zobrazuje detailný pohľad na PtIM doménu interagujúcu s P- tRNA- fMet v smere väzby antibiotika (Chen *et al.* 2014; Lenart *et al.* 2015- upravené).

2.4.3 ABC-F UDELUJÚCE REZISTENCIU K ANTIBIOTIKÁM

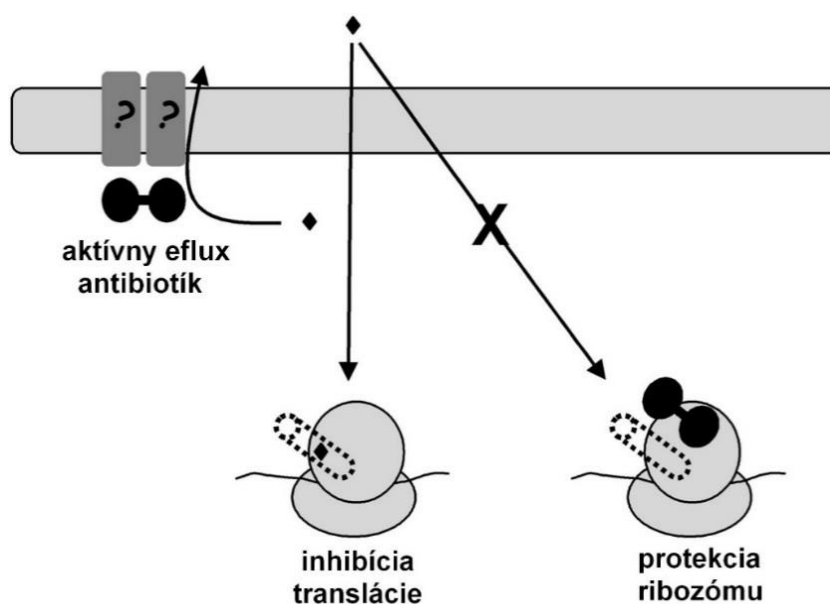
ABC-F proteíny sprostredkujúce rezistenciu voči antibiotikám sa súhrne označujú ako ARE proteíny (Sharkey *et al.* 2016).

ARE ABC-F proteíny boli identifikované v Gram pozitívnych baktériách produkujúcich antibiotiká ako sú *Streptomyces*, ale aj v patogénnych baktériách ako *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* (Sharkey *et al.* 2016; Wilson 2016). Podrobná fylogenetická analýza ABC-F podrodiny proteínov, ktorá zobrazuje okrem regulačných ABC-F proteínov aj ARE ABC-F proteíny u producentov a u patogénov je na Obr. 14.



Obrázok 14 Fylogenetická analýza ABC-F podrodiny proteínov. Na obrázku sú zobrazené proteíny patriace medzi ARE ABC-F patogény (Vga(A), Msr(A), VmlR, Lsa, SalA; červená farba), proteíny patriace medzi ARE ABC-F producenty (CarA, srmB, tlrC; tmavomodrá farba) a regulačné proteíny ABC-F (EttA; zelená farba) (Murina *et al.* 2017- upravené).

Mechanizmus, akým tieto proteíny udeľujú rezistenciu voči antibiotikám bol predmetom dlhotrvajúcej diskusie s dvomi konkurujúcimi hypotézami. Prvou hypotézou bolo, že je rezistencia spôsobená antibiotickým efluxom naproti tomu druhou hypotézou bolo, že tieto proteíny chránia ribozóm (Obr. 15). Dnes už je jasné, že ABC-F proteíny fungujú na ribozóme (Su *et al.* 2018). V nasledujúcich stránkach zhrniem štúdie, ktoré tento fakt dokazujú a zároveň aj štúdie, ktoré dokladajú hypotézu o efluxe.



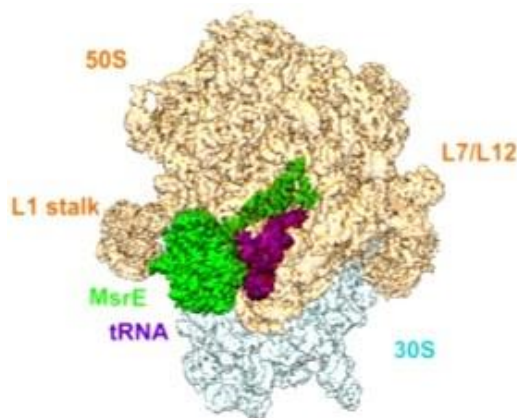
Obrázok 15 Navrhované mechanizmy antibiotickej rezistencie ARE ABC-F proteínov. Antibiotikum (kosoštvorec) vstupuje pasívne do bunky, pričom hnacou silou je jeho väzba na ribozóm (bodkovaný tunel), čo vedie k inhibícii translácie. Ľavá strana nám znázorňuje neznámy spôsob interakcie ARE ABC-F proteínov (činky) s TMD, spôsobujúci eflux antibiotík. Pravá strana naopak znázorňuje zabránenie väzby antibiotika do cieľového miesta, účinkom ARE ABC-F proteínu (Kerr *et al.* 2005- upravené).

2.4.3.1 Ochrana ribozómu ARE proteínmi

2.4.3.1.1 Väzba ARE proteínov na ribozóm

Nedávno bola publikovaná cryo- EM štruktúra ARE ABC-F MsrE proteínu viazaného na bakteriálny ribozóm (Obr. 16). Čo definitívne potvrdilo, že proteín skutočne funguje na ribozóme (Su *et al.* 2018). Predpokladá sa, že táto funkcia je univerzálne konzervovaná pre všetky ARE ABC-F proteíny, ktoré udeľujú rezistenciu k inhibítorm translácie. Protektiu ribozómu podporuje aj fakt sekvenčnej homológie ARE proteínov s translačným faktorom EttA a skutočnosť, že tieto proteíny poskytujú rezistenciu výlučne k antibiotikám inhibujúcich transláciu (Boel *et al.* 2014). MsrE sa viaže rovnako ako EttA

na ribozóm v mieste výstupu tRNA (E miesto), kde linker, ktorý tvorí helikálnu štruktúru smeruje do PTC a interaguje s aminoacyl- tRNA- fMet naviazanou v P mieste (Boel *et al.* 2014; Su *et al.* 2018).



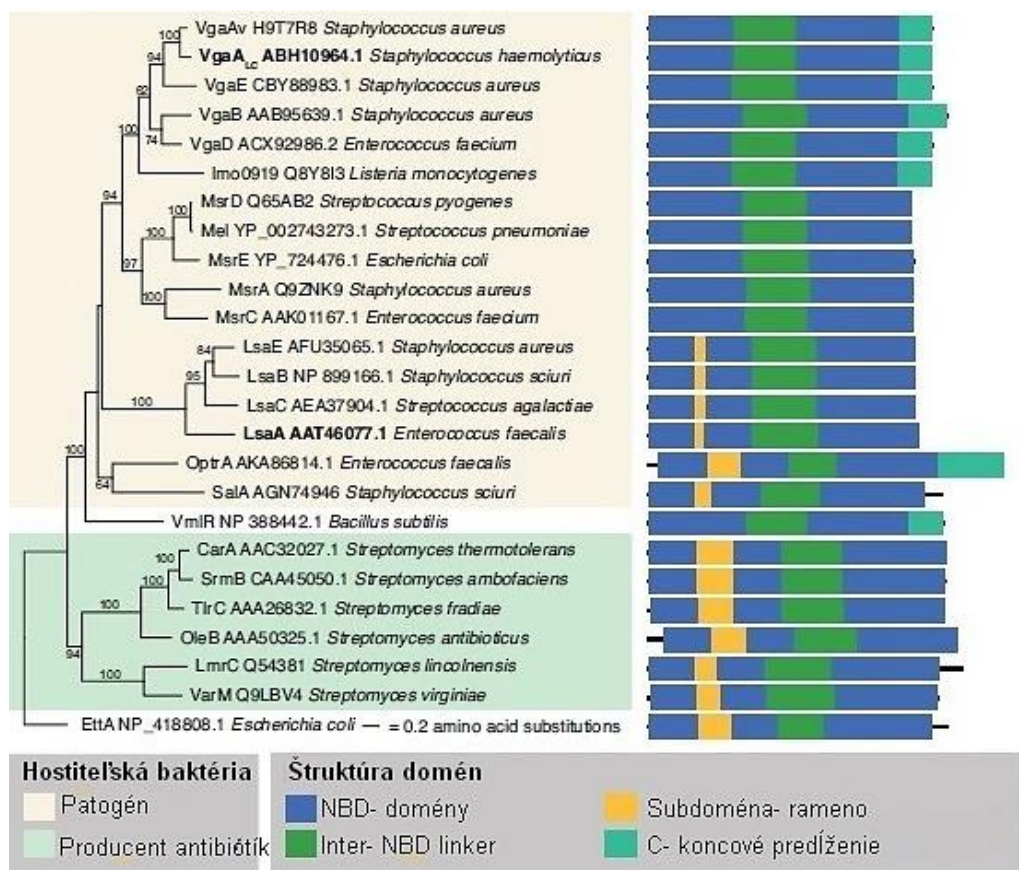
Obrázok 16 Väzba MsrE na ribozóm *Thermus Thermophilus*. 50S podjednotka (bledooranžová), 30S (azúrová). MsrE proteín (zelená) a tRNA (fialová) (Su *et al.* 2018).

2.4.3.1.2 Funkcia linkeru a ramena u ARE proteínov

Dĺžka linkeru medzi dvoma NBD je vo všeobecnosti u ABC-F proteínov variabilná (Obr. 17) (Murina *et al.*, 2017). Linker u MsrE je v porovnaní s linkerom u EttA dlhší a je kľúčový pre účinnosť a špecifitu antibiotickej rezistencie (Lenart *et al.* 2015; Su *et al.* 2018). Predpokladá sa, že ribozomálna funkcia ARE proteínov spočíva v tom, že uvoľňujú antibiotikum z ribozómu kontaktom predĺženého linkeru s antibiotikom. Aby k takémuto kontaktu došlo, ARE proteíny spôsobia konformačnú zmenu ribozómu a posun P-tRNA do A miesta, čo následne umožní linkeru dosiahnuť antibiotikum (Su *et al.* 2018). MsrE sa od EttA líši absenciou druhého funkčne dôležitého štruktúrneho motívu, tzv. subdoménou „ramena“, ktoré je vsunuté do NBD (Boel *et al.* 2014). K ARE MsrE je doménovým usporiadaním podobný ARE Vga(A).

Vo Vga(A) subdoména „ramena“ tiež chýba a jeho linker je predĺžený o 30 aminokyselinových zvyškov (Lenart *et al.* 2015). Spomínaná dôležitosť linkeru bola spozorovaná práve pri porovnávaní proteínov Vga(A) a Vga(A)_{LC} (index LC označuje rezistenciu na linkomycín a klindamycín), ktorý bol objavený v klinických izolátoch *Staphylococcus haemolyticus* (Novotná & Janata 2006). Vga(A)_{LC} udeľuje narozdiel od Vga(A) rezistenciu okrem SgA, aj linkozamidom či Plu. Gén Vga(A)_{LC} sa líši od génu

Vga(A) na proteínovej úrovni siedmimi aminokyselinovými substitúciami, z ktorých štyri: L212S, G219V, A220T, G226S sú zoskupené v linkeru spájajúcim obe NBD. Pri porovnávaní rezistentného fenotypu došlo v prípade Vga(A)_{LC} ku zvýšenej úrovni rezistencie k linkozamidom, pričom Vga(A) udeľoval vysokú úroveň rezistencie iba ku SgA (Lenart *et al.* 2015). Vyplýva z toho, že linker je dôležitý pri rozpoznávaní antibiotík, kde štyri aminokyselinové zvyšky sústredené v 15- aminokyselinovej oblasti sú rozhodujúce pre stanovenie fenotypu t.j. pre stanovenie substrátovej špecificity (Novotná & Janata 2006; Lenart *et al.* 2015). Zaujímavým experimentom bolo skrátenie tohto predĺženého linkeru, prítomného u ARE proteínov (konkrétne u Vga(A)_{LC}) na dĺžku linkeru, ktorý je u EttA. Skrátenie linkeru malo významný účinok na funkčnosť linkeru, čoho výsledkom bolo, že proteín nechránil ribozóm pred antibiotikom a jeho hydrolyticky inaktívna EQ1+2 mutanta neblokovala peptidyltransferázovú reakciu. To naznačuje, že skrátený linker nie je viac schopný dosiahnuť PTC a interagovať s ním (Murina *et al.* 2018).



Obrázok 17 Strom zobrazujúci štruktúru domén ABC-F proteínov a rozdielnosť v ich dĺžke linkeru a subdomény „ramena“ u patogénov, producentov a regulačných proteínov (EttA) (Murina *et al.*, 2018- upravené).

2.4.3.1.3 Biochemický dôkaz ribozomálnej funkcie ARE proteínov

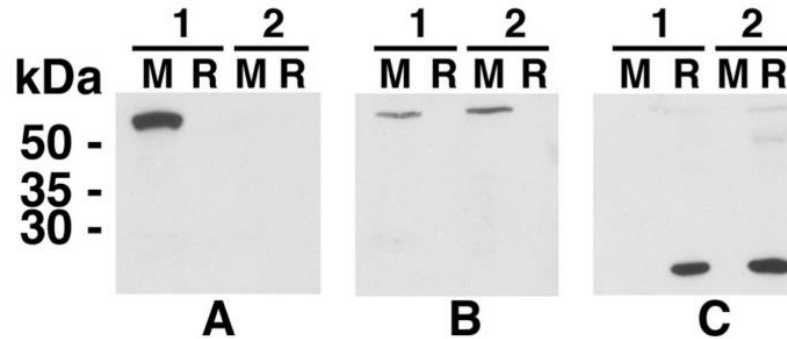
Ribozomálnu funkciu ARE ABC-F proteínov ďalej rozvíjajú nasledujúce biochemické experimenty. Prvý dôkaz ribozomálnej funkcie ABC-F proteínov bol demonštrovaný prostredníctvom *in vitro* spriahnutého transkripčného a translačného assay (T/T) enterokokových ARE proteínov Vga(A) a Lsa(A) (Sharkey *et al.* 2016). Konkrétne autori preukázali, že pridaním purifikovaného proteínu *S. aureus* Vga(A) do *in vitro* T/T systému odvodeného z *S. aureus*, došlo k ochrane translácie pred inhibíciou antibiotikami skupiny SgB- virginiamycínom M. Okrem toho autori demonštrovali, že vo väzobnom assay došlo po pridaní Lsa(A) proteínu z *Enterococcus faecalis* k vytesneniu rádioaktívneho linkomycínu z 70S ribozómu. Táto štúdia ukázala, že na ribozómoch *Escherichia coli*, Vga(A) aktívny nie je, čo navrhuje, že tento proteín je schopný špecificky ochraňovať len niektoré ribozómy, čo je v súlade s tým, že Vga(A) neudeluje v *E. coli* rezistenciu. Táto štúdia poukázala na to, že tieto rezistentné proteíny pravdepodobne znižujú prístupnosť alebo afinitu väzobných miest pre antibiotikum na 50S ribozomálnej podjednotke, čím priamo chránia translačné mechanizmy pred inhibíciou sprostredkovanou antibiotikami.

Ďalšia publikovaná štúdia (Murina *et al.* 2018) navrhuje detailný model ochrany PTC ribozómu proteínom Vga(A)_{LC} pred inhibíciou antibiotikami. S použitím rekonštituovaného iniciačného komplexu ribozómov *S. aureus* s fMet-tRNA ukázala, že Vga(A)_{LC} je NTPáza, ktorá striktne vyžaduje NTP hydrolyzu (nie len NTP väzbu) pre ribozomálnu ochranu. Zámenou konzervovaných katalytických glutamátových zvyškov za glutamínové zvyšky v obidvoch NBD kazetách (E105Q a E410Q; EQ1+2), bola pripravená dvojité mutanta Vga(A)_{LC} EQ1+2, ktorá viaže, avšak nehydrolyzuje ATP. Výsledkom je uzamknutie enzýmu v aktívnej konformácii viazanej ATP. Väzba Vga(A)_{LC} EQ1+2 na ribozóm, v takto hydrolyticky neaktívnej forme inhibuje peptidyltransferázu, čo naznačuje priamu interakciu medzi ARE ABC-F proteínmi a ribozómom.

2.4.3.2 Funkcia ARE proteínov na membráne

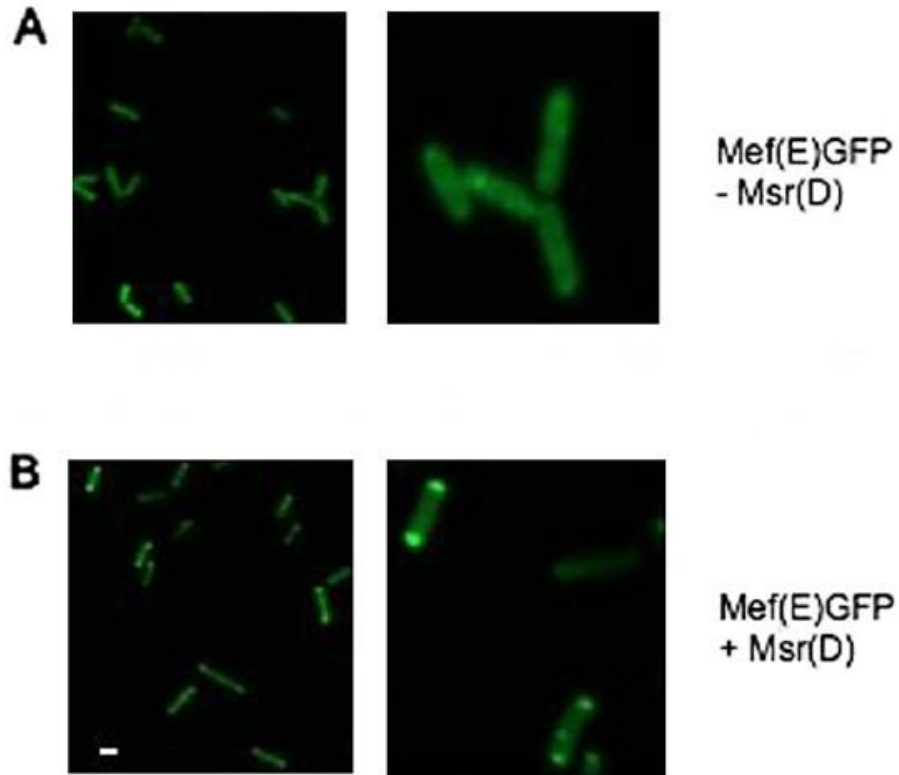
Napriek tomu, že ribozomálna funkcia ARE proteínov bola preukázaná, tak existujú staršie štúdie, ktoré ukazujú lokalizáciu niektorých ARE proteínov na membráne a dokumentujú ich spoluprácu s transportérom. Membránová lokalizácia bola preukázaná pre Vga(A) proteín (Chesneau *et al.* 2005). U Vga(A) a Msr(A), prítomných v klinických izolátoch *Staphylococcus epidermidis* BM10385 a IPF69, sa frakciáciou buniek ukázalo,

že proteín Vga(A) kolokalizuje s β podjednotkou F₁-F₀ ATPázy v membránových frakciách stafylokokových buniek. V analyzovaných ribozomálnych frakciách však Vga(A) detegovaný nebol (Obr. 18).



Obrázok 18 Analýza membránových (M) a ribozomálnych (R) frakcií z klinického izolátu *S. epidermidis*. Prvá časť (1) každého panelu zodpovedá kmeňu BM10385 s *vga(A)*, a druhá časť (2) zodpovedá kmeňu IPF69 s *msr(A)*. (A) Protilátka proti MalE-Vga(A); (B) Protilátka proti β podjednotke F₁-F₀ ATPázy; (C) Protilátka proti L24 proteínu (Chesneau *et al.* 2005).

Druhá štúdia (Nunez-Samudio & Chesneau 2012) poukazuje na spoluprácu proteínu Msr(D) s efluxou pumpou Mef(E). ARE proteín Msr(D) je v *Streptococcus pneumoniae* ko-transkribovaný s iným génom kódujúcim transportér Mef(E) patriaci medzi MFS transportéry. Pokiaľ boli tieto proteíny exprimované v *E. coli* zvlášť vykazovali každý svoj vlastný fenotyp rezistencie. Msr(D) samostatne udeľuje vysokú rezistenciu voči makrolidom (8- 16 $\mu\text{g/ml}$), zatiaľ čo Mef(E) udeľuje iba nízku úroveň rezistencie voči makrolidom (2- 8 $\mu\text{g/ml}$). Avšak pokiaľ boli exprimované dohromady, ich synergickým účinkom sa úroveň rezistencie až osemnásobne zvýšila (64 $\mu\text{g/ml}$). Ich interakcia bola pozorovaná aj fluorescenčnou mikroskopiou. Mef(E) bol fúzovaný so zeleným fluorescenčným proteínom GFP. V neprítomnosti Msr(D) bol Mef(E) nesprávne zložený a ako agregát sa vyskytoval v cytoplazme (Obr. 19A). Prítomnosť Msr(D) však zmenila lokalizáciu MefE-GFP jeho inzerciou do membrány na póloch bunky (Obr. 19B).



Obrázok 19 Mikroskopická analýza fluorescenčného signálu Mef(E)-GFP. **A)** Distribúcia fluorescenčného signálu bez expresie Msr(D). **B)** Distribúcia fluorescenčného signálu spolu s expresiou Msr(D) (Nunez-Samudio & Chesneau 2012- upravené).

Dané výsledky tak poukazujú na možnú fyzickú interakciu medzi ABC Msr(D) a MFS Mef(E) a naznačujú, že proteíny ARE ABC-F by mohli sprostredkovať interakciu s membránou a asociovať s doposiaľ neidentifikovanými TMD (Nunez-Samudio & Chesneau 2012). Teoreticky, by takto vytvorený funkčný efluxný komplex bol schopný znižovať koncentráciu antibiotika v bunke jeho exportovaním von z bunky (Chesneau *et al.* 2005). Pointou však je, že rozhodujúcou zložkou klasickej pumpy ABC proteínov je práve transmembránová doména, ktorá ARE ABC-F podrodine proteínov chýba (Wilson 2016). Tým sa vyvoláva otázka, aká je funkcia ABC-F proteínov, v prípade že sa vyskytujú na membráne.

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 MATERIÁL

3.1.1 BAKTERIÁLNE KMENE

XL1-Blue kompetentné bunky (Stratagene)

XL-1 Blue kompetentné bunky boli použité pri klonovaní plazmidov pripravených SLiCE metódou a na transformáciu pre namnoženie plazmidu.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB lacIqZ deltaM15 Tn10 (Tetr)]*

IM08B kompetentné bunky

Derivát kmeňa DC10B *E. coli* produkujúci metylázu DNA, ktorá má rovnaký metylovaný patern ako kmeň *S. aureus*.

Genotyp: *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG Δdcm ΩPhelp-hsdMS (CC8-2) ΩPN25-hsdS (CC8-1)*

***Staphylococcus aureus* RN4220 (Focus Bio-Inova)**

Kmeň *Staphylococcus aureus* RN4220 je laboratórny kmeň a bol použitý ako recipientný kmeň pre expresiu fúzneho fluorescenčného proteínu Vga(A)_{LC}-mEos2 a pre sledovanie rezistentného fenotypu, ktorý tento proteín udeľuje.

***Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4**

Derivát klinického izolátu, ktorý je menej geneticky modifikovaný než *S. aureus* RN4220.

***Staphylococcus aureus* JE2**

JE2 je meticilín-rezistentný kmeň *S. aureus* (MRSA), plazmidom odliečený derivát klinického izolátu USA300 z komunity.

Staphylococcus haemolyticus

Kmeň *Staphylococcus haemolyticus* je klinický izolát a bol použitý pre *in vivo* expresiu proteínu Vga(A)_{LC}.

3.1.2 VEKTORY

pRMC2 (6433 bp) (získáno od T. Foster)

pRMC2 je modifikovaný klonovací vektor pALC2703, ktorý má mutovaný indukibilný P_{xyI/tetO} promotór a obsahuje multiklonálne klonovacie miesta. P_{xyI/tetO} promotór je indukovaný anhydratetracyklínom. Ako selekčný marker pre *S. aureus* sa používal chloramfenikol. Pre *E. coli* sa ako selekčný marker používal ampicilín.

3.1.3 PRIMERY

Primery požívané v experimentálnej časti boli pripravované firmou Sigma alebo Promega. Primery boli riedené sterilnou destilovanou vodou na pracovnú koncentráciu 10 pmol/μl. Zoznam všetkých používaných primerov v experimentálnej časti je uvedený v Tabuľke 1.

Tabuľka 1

Názov primeru	Primery používané pri príprave konštruktú Vga(A) _{LC} -mEos2
Vga_pRMC_invPCR_F	TAAGAATTCACCTGGCCGTC
Vga_PGGGS_pRMC_invPCR_R	TGAACCACCACCTGGTTTATCTAAATTTCTTTTTTC
Vga_PGGGS_mEos2_F	AAAACCTTAATAAATGAAAAAAGAAATTTAGATAAACCCAGGTGG TGGTTCAATGAGCGCGATCAAGCCG
pRMC_mEos2_R	CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTcTT AGCGACGAGCGTTATCAGGTAaac
	Primery používané pre overenie správnosti klonovania
pRMC2_F	ACATTATATCATTGATAGAGTTATTTGTCAAACCTAG
mEos2_R	GTACATCTTCTCGGTACTC
Vga_PGGGS_mEos2_F	AAAACCTTAATAAATGAAAAAAGAAATTTAGATAAACCCAGGTGG TGGTTCAATGAGCGCGATCAAGCCG
pRMC2_R	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG
	Primery používané pre overenie prítomnosti inzertu v plazmide pRMC2
Vga_PGGGS_mEos2_F	AAAACCTTAATAAATGAAAAAAGAAATTTAGATAAACCCAGGTGG TGGTTCAATGAGCGCGATCAAGCCG
pRMC2_R	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG
	Primery používané pri sekvenácii
pRMC2_R	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG
pRMC2_F	ACATTATATCATTGATAGAGTTATTTGTCAAACCTAG

3.1.4 KULTIVAČNÉ MÉDIÁ

Uvedené kultivačné médiá boli pripravované v destilovanej vode a sterilizované autoklávaním (Tuttanauer model 2540E) pri teplote 121 °C po dobu 15 minút (pokiaľ nie je uvedené inak).

B2 médium

Zloženie:

Kvasničný extrakt	25 g
NaCl	25 g
Kazeínový hydrolyzát	10 g
Glukóza	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml	
pH= 7,5	

BHI médium

Zloženie:

Brain- heart infusion	9,25 g
Destilovaná voda doplnená do objemu 250 ml	
pH= 7,5	

BHI agar

Zloženie:

Brain- heart infusion	9,25 g
Agar	3,75 g
Destilovaná voda doplnená do objemu 250 ml	
pH= 7,5	

LB médium

Zloženie:

Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	5 g
Destilovaná voda doplnená do objemu 1000 ml	
pH= 7,5	

LB agar

Zloženie:

Agar	15 g
LB médium	1 000 ml
pH= 7,5	

SOC médium

Zloženie:

Kvasničný extrakt	5,5 g
Trypton	20 g
1 M NaCl	10 ml
1 M KCl	2,5 ml
Destilovaná voda	970 ml
pH= 7,5	

Po sterilizácii:

2 M MgCl₂ 5 ml (sterilizovaný filtráciou)

2 M MgSO₄ 5 ml (sterilizovaný filtráciou)

2 M glukóza 10 ml (sterilizovaný filtráciou)

TSA agar

Zloženie:

Trypton Soya Broth (Oxoid)	30 g
Agar	15 g
Destilovaná voda doplnená do objemu	1 000 ml

TSB médium

Zloženie:

Trypton Soya Broth (Oxoid)	30 g
Destilovaná voda doplnená do objemu	1 000 ml

Mueller-Hinton agar

Zloženie:

Mueller- Hinton Broth (Oxoid)	21 g
Agar	15 g
Destilovaná voda doplnená do objemu	1 000 ml

Mueller-Hinton médium

Zloženie:

Mueller- Hinton Broth (Oxoid)	21 g
Destilovaná voda doplnená do objemu	1 000 ml

Médium pre uchovávanie kompetentných buniek

Zloženie:

Polyetylénglykol (Mw= 8000)	3,6 g
Glycerol	10,8 ml
1 M MgSO ₄	0,36 ml
LB médium doplniť do objemu	30 ml

Pripravené médium bolo sterilizované filtráciou.

Médium pre uchovávanie buniek

Zloženie:

TSB médium	42,5 ml
Glycerol	7,5 ml

3.1.5 ROZTOKY A PUFRY

Fyziologický roztok

Zloženie:

Chlorid sodný	0,9 g
Destilovaná voda doplnená do objemu	100 ml

Príprava: Navážené množstvo chloridu sodného je zodpovedné výslednej koncentrácii fyziologického roztoku 0,9 %, rozpusteného v destilovanej vode v určitom objeme. Sterilizovaný bol autoklávaním (Tuttanauer model 2540E) pri teplote 121 °C po dobu 15 minút.

Roztok glycerolu (10%)

Zloženie:

Glycerol	10 ml
Destilovaná voda	100 ml

10% roztok glycerolu bol sterilizovaný filtráciou.

10% roztok SDS

Zloženie:

SDS	10 g
Destilovaná voda doplnená do objemu	100 ml

10% roztok SDS bol sterilizovaný filtráciou.

Farbiaci roztok- Coomassie Brilliant Blue

Zloženie:

Metanol	50 %
Coomassie Brilliant	0,1 %
Kyselina octová	10 %

Odfarbovací roztok (Destain)

Zloženie:

Metanol	200 ml
Kyselina octová	100 ml
Destilovaná voda	700 ml

1x PBS

Zloženie:

1 tableta PBS (Phosphate Buffer Saline) DulbeccoA (Oxoid)	
Destilovaná voda	100 ml

10x DNA vzorkový pufor

Zloženie:

100 mM EDTA
1 % SDS
20 % glycerol
0,25 % brómfenolová modrá
pH= 8,0

1x SDS- PAGE pufor

Zloženie:

25 mM Tris
192 mM glycín
0,1 % SDS

2x SDS- PAGE vzorkový pufor

Zloženie:

125 mM Tris- HCl
2 % SDS
5 % merkptoetanol
20 % glycerol
0,002 % brómfenolová modrá

1x TAE pufor

Zloženie:

40 mM Tris- acetát
1 mM EDTA
pH= 8,0

TE⁻¹ pufo

Zloženie:

10 mM Tris- HCl
0,1 mM EDTA
pH= 8,0

Prenosový pufo

Zloženie:

25 mM Tris
192 mM glycín
0,1 % SDS
15 % metanol

Pufo pre polymerázu

5x Phusion GC pufo

Pufo pre Taq- Purple DNA polymerázu

Pufo použitý pri SLiCE

Pufo NEB č. 4

Pufo pre prípravu bunkových frakcií

Zloženie:

10 mM Tris-HCl
50 mM NH₄Cl
8 mM MgCl₂
2 mM merkptoetanol
1 tableta Complete Mini EDTA-free inhibítora proteáz (Roche)
pH= 7,5

3.1.6 ANTIBIOTIKÁ

Zásobné roztoky antibiotík uvedené v Tab. 2 boli pripravené 1000x koncentrované a sterilizované filtráciou. Používali sa za účelom selekcie testovaných bakteriálnych kmeňov na kultivačných pôdach a v médiách. V experimentálnej časti práce boli využité aj antibiotické disky: linkomycín (2 µg) a klindamycín (2 µg), ktoré boli zakúpené od firmy Sigma.

Tabuľka 2

Antibiotikum	Koncentrácia	Rozpustené v
Anhydratetracyklín	100 ng/ml	Etanol
Chloramfenikol	25 mg/ml	Etanol
Erytromycín	10 mg/ml	Etanol
Karbenicilín	100 mg/ml	destilovaná voda
Kanamycín	50 mg /ml 80 mg/ml	destilovaná voda
Klindamycín	10 mg/ml	destilovaná voda
Linkomycín	10 mg/ml	destilovaná voda
Pristinamycín IA	10 mg/ml	Metanol
Pristinamycín IIA	10 mg/ml	Metanol
Tetracyklín	10 mg/ml	Etanol
Tiamulin	10 mg/ml	destilovaná voda

3.1.7 Enzýmy

DNA polymerázy

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Taq-Purple DNA polymeráza (Top-Bio)

Ostatné

Lyzostafín (pracovná koncentrácia 10 mg/ ml) (Ambi Product LLC)

3.1.8 PROTILÁTKY

Primárna protilátka

Špecifická protilátka proti Vga(A)_{LC} proteínu

Sekundárna protilátka

Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti- rabbit (H+L) (Invitrogen)- Kožia polyklonálna protilátka proti králičiemu IgG konjugovaná s chrenovou peroxidázou

3.1.9 FLUORESCENČNÉ FARBIVÁ

BIODIPY Fluorescenčný vankomycín (FL-VAN) (Invitrogen)

Fluorescenčný teikoplanín (FL-TEI) (Sigma)

3.1.10 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Tabuľka 3

Názov	Skratka	Firma
40% Akrylamid	AA	Merck
Acetón		Lach:Ner
Agar		Oxoid
Agaróza		BIO-RAD
Anhydratetracyklín hydrochlorid	AnhTet	Fluka
Bakteriologický agar		Oxoid
Blotting- Grade Blocker		Oxoid
Brain- heart infusion	BHI	Oxoid
Brómfenolová modrá		BIO-RAD
Deoxyadenozíntrifosfát	dATP	NEB
Deoxycytidín trifosfát	dCTP	NEB
Deoxyguanozín trifosfát	dGTP	NEB
Deoxytymidín trifosfát	dTTP	NEB
Dodecylsírán sodný	SDS	Sigma Aldrich
Erytromycín	ERY	Duchefa
Etanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	Fagron
Ethidium Bromid	EtBr	Sigma Aldrich
Etyléndiamintetraacetát	EDTA	Sigma Aldrich
FluoroBrite DMEM		Gibco
Glukóza	GLU	Lach-Ner
Glycerol		Lach-Ner
Glycín		Lach-Ner
Hydrogénfosforečnan draselný	K ₂ HPO ₄	AppliChem
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner
Chloramfenikol	CAM	Duchefa
Chlorid draselný	KCl	Lachema
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Kanamycín	KAN	Duchefa
Karbenicilín	CARB	Duchefa
Kazeín hydrolyzát		Fluka
Klindamycín	CLI	Duchefa
Kvasničný extrakt		Oxoid
Kyselina chlorovodíková	HCl	Lachema
Kyselina octová	CH ₃ -COOH	Lach:ner
Kyselina sírová	H ₂ SO ₄	Lachema
Linkomycín	LIN	Sigma Aldrich
Metanol	MetOH	Lach:Ner
Mueller- Hinton Broth	MH	Oxoid
N,N,N,N- tetrametylendiamin	TEMED	AppliChem
Pepton		BD
Persírán amónny	APS	Sigma
Phosphate buffered saline	PBS	Oxoid
Polyetylén glykol (Mr= 8000)	PEG	Sigma Aldrich
Pristinamycín IA	PIA	Aventis Pharma S.A.
Pristinamycín IIA	PIIA	Aventis Pharma S.A.
Sírán horečnatý	MgSO ₄ .7H ₂ O	Lachema
Tiamulín	TIA	Fluka
Tris(hydroxylmethyl)aminomethan	Tris	Serva
Trypton-sójový vývar	TSB	Oxoid

3.1.11 KOMERČNÉ SÚPRAVY A ŠTANDARDY

Izolácia plazmidovej DNA z *E. coli*:

Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega)

Prečistenie PCR zmesi pred restriktčným štiepením

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Štandard molekulej hmotnosti pre DNA agarózovú elektroforézu:

1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Fragментy sú vo veľkosti od 100 bp do 12 000 bp. 5 ul štandardu obsahuje fragment vo veľkosti 1650 bp, ktorý zodpovedá 40 ng DNA. Pomocou tohto štandardu môžeme odčítať približnú koncentráciu vzorky DNA.

Príprava pracovného roztoku:

100 ul 1 kb Plus DNA ladder

100 ul 10x DNA vzorkový pufor

800 ul TE⁻¹ pufru

Štandard molekulej hmotnosti pre SDS- PAGE elektroforézu:

BlueElf Prestained Protein Marker (Jena Bioscience). Proteínový marker obsahuje 13 purifikovaných proteínov s molekulovou hmotnosťou 5- 245 kDa.

3.1.12 SOFTWARE A INTERNETOVÉ APLIKÁCIE

CLC Main Workbench 6.8.1. – software pre analýzu sekvencií

ExPaSy- internetová stránka využitá pre preklad nukleotidovej sekvencie na aminokyselinovú.

Gen5 2.01- software zaznamenávajúci namerané hodnoty z doštičkového spektrofotometra (Biotek Synergy HT)

GenBank- databáza sekvencií

GENESys V 1.5.5.0- program na analýzu DNA elektroforézy v agarózovom géli

ImageJ (FIJI)- program na spracovanie a analýzu mikroskopických obrázkov

Image lab 5.0- program na zobrazenie detekcie proteínov metódou Western blot, poriadene na prístroji ChemiDoc™ MP Imaging system (Bio-Rad)

SoftWorx 6.5.2- program na rekonštrukciu a dekonvuláciu získaných mikroskopických obrázkov metódou štruktúrovaného osvetlenia a wide-field

3.2 METÓDY

3.2.1 KULTIVÁCIA A UCHOVÁVANIE BAKTÉRIÍ

3.2.1.1 Kultivácia a uchovávanie *Escherichia coli*

Bunky *E. coli* boli kultivované buď na pevnej pôde (LB agar) v termostate 24 hodín pri teplote 37 °C, alebo v tekutom médiu (LB médium) po dobu 16- 18 hodín pri teplote 37 °C za stáleho trepania pri 200 RPM (revolution per minute; otáčky za minútu). Pre selekciu buniek nesúcich vektor bolo pridané príslušné antibiotikum. Pre krátkodobé uchovávanie buniek, ktoré boli kultivované na pevných pôdach, boli Petriho misky obalené parafilmom a uskladnené pri teplote 4 °C.

3.2.1.2 Kultivácia a uchovávanie *Staphylococcus aureus*

Bunky bakteriálneho kmeňa *S. aureus* boli kultivované na pevných pôdach (BHI agare, prípadne TSA agare) pri teplote 37 °C, 24 hodín. V prípade kultivácie v tekutom médiu boli bunky kultivované v BHI médiu alebo TSB médiu pri teplote 37 °C, 16-18 hodín za stáleho trepania pri 200 RPM. Kmene obsahujúce vektor boli kultivované vždy v prítomnosti selekčného antibiotika chloramfenikolu (CAM) v koncentrácii 25 µg/ ml. Pokiaľ nie je uvedené inak, kultivácia prebiehala vždy v prítomnosti induktora anhydratetracyklínu (AnhTet) v koncentrácii 100 ng/ml, ktorý je dôležitý pre indukciu bakteriálneho kmeňa s inducibilným promótorom. Pre krátkodobé uchovávanie buniek, ktoré boli kultivované na pevných pôdach, boli Petriho misky obalené parafilmom a uskladnené pri teplote 4 °C. Pre dlhodobejšie uchovávanie buniek pestovaných v tekutom médiu boli uchovávané pri teplote -80 °C v TSB médiu obsahujúcim 15% glycerol. Bunky pre Western blot analýzu a na mikroskopické pozorovanie (pokiaľ nie je uvedené inak) boli pripravené nasledujúcim spôsobom. Najskôr boli bunky vyočkované na BHI agar s CAM (25 µg/ ml) a kultivované cez noc pri teplote 37 °C v termostate. Na druhý deň bola z narastených buniek pripravená suspenzia buniek v 0,9 % fyziologickom roztoku (McFarland= 0,5-1). 500 µl tejto bunkovej suspenzie bolo zaočkované do 10 ml BHI média s CAM (25 µg/ ml) a takto pripravená kultúra bola kultivovaná za stáleho trepania pri 200 RPM.

3.2.1.3 Kultivácia a uchovávanie *Staphylococcus haemolyticus*

Bunky bakteriálneho kmeňa *S. haemolyticus* boli kultivované na pevných pôdach (BHI agar) pri teplote 37 °C, 24 hodín. V prípade kultivácie v tekutom médiu boli bunky kultivované v BHI médiu pri teplote 37 °C, 16-18 hodín za stáleho trepania pri 200 RPM. Bunky pre Western blot analýzu (pokiaľ nie je uvedené inak) boli pripravené nasledujúcim spôsobom. Bunky boli vyočkované na BHI agar a kultivované cez noc pri teplote 37 °C v termostate. Na druhý deň bola z narastených buniek pripravená suspenzia buniek v 0,9 % fyziologickom roztoku (McFarland= 0,5-1). 500 µl tejto bunkovej suspenzie bolo zaočkované do 10 ml BHI média a takto pripravená kultúra bola kultivovaná za stáleho trepania pri 37 °C/ 200 RPM.

3.2.2 PRÍPRAVA A TRANSFORMÁCIA KOMPETENTNÝCH BUNIEK

Transformácia je jednosmerný prenos cudzorodej DNA z jednej bunky do druhej. Pri transformácii sú kľúčové kompetentné bunky, ktoré sú schopné prijať cudzorodú DNA.

3.2.2.1 Príprava kompetentných buniek *E. coli* pre transformáciu teplotným šokom

Kmeň *E. coli* XL1-Blue, používaný v experimentálnej časti tejto diplomovej práce pre transformáciu teplotným šokom, bol pripravený nasledovným spôsobom:

1. Prvým krokom pri príprave kompetentných buniek bola príprava inokula. Inokulum bolo pripravené zaočkovaním kolónie *E. coli* do 2 ml LB média a kultiváciou pri 37 °C cez noc (16- 18 hodín) za stáleho trepania pri 200 RPM.
2. Ďalším krokom bola príprava bunkovej kultúry. Do 100 ml LB média, vytemperovaného na 37 °C, bolo zaočkované 1 ml inokula narasteneho cez noc.
3. Bunková suspenzia bola kultivovaná pri teplote 37 °C/ 200 RPM až do dosiahnutia OD₆₀₀ (optickej denzity) v rozmedzí od 0.4- 0.6.
4. Kultúra bola po dosiahnutí príslušnej OD₆₀₀ ihneď schladená v ľadovom kúpeli po dobu 15 minút a od tejto doby bola udržiavaná v chlade.
5. Bunková suspenzia bola prenesená do 50 ml vychladených sterilných skúmaviek a zcentrifugovaná pri 1 575 x g/ 10 minút/ 4 °C.

6. Po centrifugácii bol opatrne odstránený supernatant a bunky boli resuspendované v 30 ml 0,1 M CaCl₂ v destilovanej vode (dH₂O), ktorý bol vopred vychladený na ľade. Bunky boli inkubované 20 minút na ľade.
7. Po inkubácii boli bunky zcentrifugované pri 1 575 x g/ 10 minút/ 4 °C. Po centrifugácii bol opäť opatrne odstránený supernatant a bunky boli resuspendované v 2 ml pripraveného roztoku CaCl₂ s glycerolom.
8. Bunky boli inkubované 30 minút na ľade. Po inkubácii boli takto pripravené bunky rozdelené do alikvot po 200 µl do vychladených 1,5 ml sterilných mikroskúmaviek typu Eppendorf. Buď boli uchovávané pri teplote –80 °C, alebo boli okamžite použité pre transformáciu.

3.2.2.2 Transformácia kompetentných buniek *E. coli* teplotným šokom

1. K alikvot (200 µl) zamrazených alebo čerstvo pripravených kompetentných buniek *E. coli* bol pridaný 1 µl plazmidovej DNA a opatrne bola bunková suspenzia premiešaná.
2. Bunková suspenzia bola inkubovaná 30 minút na ľade.
3. Po inkubácii na ľade boli bunky v mikroskúmavke (1,5 ml) vystavené teplotnému šoku pri teplote 42 °C po dobu 45 sekúnd.
4. Následne bola suspenzia ihneď schladená na ľade po dobu 5 minút.
5. K suspenzii buniek bolo pridané 1 ml LB média vytemperovaného na teplotu 37 °C. Bunky boli inkubované pri teplote 37 °C po dobu 1 hodiny v termostate.
6. Po uplynutí jednej hodiny bola suspenzia buniek zcentrifugovaná pri 3 214 x g/ 1 minútu. Opatrne bolo odstránené LB médium tak, aby v mikroskúmavke ostalo približne 100 µl média so sedimentovanými bunkami, v ktorom boli resuspendované.
7. Resuspendované médium s bunkami bolo vyočkované na agarovú pôdu (LB agar), s prídavkom príslušného antibiotika pre selekciu transformantov.
8. Petriho misky boli inkubované cez noc pri teplote 37 °C.

3.2.2.3 Príprava kompetentných buniek *S. aureus* pre transformáciu elektroporáciou

1. Prvý deň bol rozočkovaný bakteriálny kmeň *S. aureus* na BHI agare, ktorý bol kultivovaný pri teplote 37 °C, cez noc v termostate.
2. Na ďalší deň bolo pripravené inokulum. Do 5 ml B2 média bola zaočkovaná 1 izolovaná kolónia buniek *S. aureus*, narastenej cez noc. Inokulum bolo kultivované za stáleho trepania pri teplote 37 °C/ 200 RPM cez noc.
3. Do 50 ml B2 média vytemperovaného na 37 °C bol zaočkovaný 1 ml cez noc kultivovaného inokula a bunková kultúra bola kultivovaná za stáleho trepania pri teplote 37 °C/ 200 RPM až do dosiahnutia požadovanej OD₆₀₀= 0.5- 0.8.
4. Po dosiahnutí prísušnej OD₆₀₀ bola kultúra centrifugovaná vo vychladenej centrifúge pri 2 057 x g/ 10 minút/ 4 °C.
5. Opatrne bol odstránený supernatant. Bunky boli resuspendované v 50 ml sterilnej deionizovanej vode a zcentrifugované pri 2 057 x g/ 10 minút/ 4 °C.
6. Po odstránení supernatantu boli bunky resuspendované v 20 ml 10% glycerolu a opäť zcentrifugované pri 2 057 x g/ 10 minút/ 4 °C
7. Opäť bol opatrne odstránený supernatant a bunky boli resuspendované v 5 ml 10% glycerolu. Bunková suspenzia bola inkubovaná 15 minút pri laboratórnej teplote.
8. Po inkubácii pri laboratórnej teplote boli bunky zcentrifugované pri 2 057 x g/ 15 minút/ 4 °C
9. Supernatant bol opatrne odstránený a bunky boli resuspendované v 800 µl 10% glycerolu
10. Takto pripravené kompetentné bunky boli rozdelené do alikvot po 50 µl do 1,5 ml mikroskúmaviek. Buď boli uchovávané pri teplote -80 °C, alebo boli okamžite použité na transformáciu elektroporáciou.

3.2.2.4 Transformácia kompetentných buniek *S. aureus* elektroporáciou

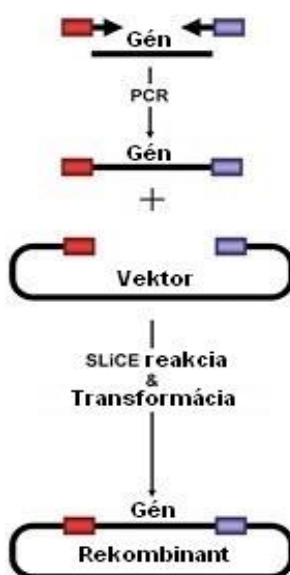
1. K alikvot (50 µl) zamrazených alebo čerstvo pripravených kompetentných buniek *S. aureus* bol pridaný 1 µl plazmidovej DNA (k alikvot buniek by DNA nemala byť pridaná v objeme väčšom než 5 µl) a opatrne bola celá suspenzia premiešaná.
2. Suspenzia buniek bola inkubovaná 30 minút pri laboratórnej teplote.

3. Po inkubácii bolo napipetovaných 100 µl bunkovej suspenzie do elektroporačnej kyvety (0,2 cm) a následne boli bunky vystavené elektrickému impulzu (1,8 kV) po dobu 2,5 milisekúnd.
4. Po elektrickom impulze bolo k bunkám okamžite pridané 1 ml SOB média. Bunky boli opatrne rozsuspendované a prenesené do mikroskúmavky.
5. Bunky boli inkubované po dobu 1 hodiny pri teplote 37 °C v termostate.
6. Po inkubácii boli bunky zcentrifugované pri 3 214 x g/1 minútu.
7. Po centrifugácii bolo odpipetované také množstvo supernatantu, aby v mikroskúmavke ostalo približne 100 µl média, v ktorom boli bunky opatrne resuspendované.
8. Bunková suspenzia bola vyočkovaná na TSA agar s prídavkom CAM (25 µg/ ml) ako selekčného antibiotika a inkubovaná v Petriho miske pri teplote 37 °C, 24 hodín v termostate.

3.2.3 PRÍPRAVA KONŠTRUKTOV

3.2.3.1 Príprava konštruktov klonovacou metódou SLiCE (Seamless Ligation Cloning Extract)

Princíp metódy SLiCE spočíva vo využití homológnej rekombinačnej aktivity v bunkových lyzátoch *E. coli* pre vnesenie DNA fragmentov do vektoru. Pozostával z nasledujúcich krokov (Obr. 20).



Obrázok 20 Schematické znázornenie klonovania metódou SLiCE (Zhang *et al.* 2011- upravené).

V prvom kroku reakcie bol vektor linearizovaný a klonovaný inzert bol amplifikovaný s použitím primerov, ktoré obsahovali 5' konce presahujúce časti komplementárne k vektoru, prostredníctvom PCR metódy.

V druhom kroku bolo potrebné odstrániť templát z PCR reakcie. K 45 μl PCR reakcie bolo pridaných 5 μl 10x koncentrovaného pufru č. 4 a 1 μl DpnI enzýmu, ktorý mal za úlohu špecificky rozštiepiť templátovú (metylovanú) DNA. Takto pripravená zmes bola inkubovaná pri teplote 37 °C cez noc v termostate.

Tretím krokom bola samotná *in vitro* SLiCE reakcia, ktorá bola pripravená do finálneho objemu 20 μl (Tab. 4) Pripravená vzorka bola inkubovaná po dobu dvoch hodín pri teplote 37 °C. Finálnym krokom bola transformácia kompetentných buniek reakčnou zmesou.

Tabuľka 4 Zloženie SLiCE reakcie

Reagencie	Množstvo na jednu reakciu
SLiCE extrakt	2 μl
10xT4 ligačný pufor	2 μl
PCR fragment	3,7 μl
Linearizovaný vektor	11,3 μl

3.2.4 METÓDY PRÁCE S DNA

3.2.4.1 Izolácia plazmidovej DNA

Na izoláciu plazmidovej DNA bola využívaná komerčne dostupná súprava Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega). Postup izolácie plazmidovej DNA bol nasledovný:

1. Prvý deň bol rozočkovaný bakteriálny kmeň na LB agar. Kultivácia prebiehala pri teplote 37 °C, cez noc v termostate.
2. Ďalší deň bolo pripravené inokulum. Do 3 ml LB média bola zaočkovaná 1 kolónia buniek *E. coli*, narastenej cez noc a takto pripravené inokulum bolo kultivované za stáleho trepania pri teplote 37 °C/ 200 RPM cez noc (16- 18 hodín).
3. 1 ml cez noc kultivovanej kultúry bolo prenesenej do mikroskúmavky a zcentrifugovanej pri 15 871 x g/ 1 minútu/ 4 °C.
4. Opatrne bol odstránený supernatant a bunky boli resuspendované v 250 μl resuspendačného roztoku

5. K tejto suspenzii bolo pridaných 250 μl lyzačného roztoku. V tomto kroku došlo k lýze buniek a uvoľneniu plazmidovej DNA.
6. Následne bolo k suspenzii pridaných 10 μl alkalického proteázy, ktorá inaktivovala proteíny.
7. Pripravená suspenzia bola inkubovaná 10 minút pri laboratórnej teplote.
8. Po inkubácii bolo k suspenzii pridaných 350 μl neutralizačného roztoku. Suspenzia bola premiešaná.
9. Po premiešaní bola vzorka zcentrifugovaná pri 15 871 x g/ 5 minút. Supernatant bol opatrne prepipetovaný do kolónky s membránou z kremičitého skla.
10. Pripravená kolónka bola inkubovaná 1 minútu pri laboratórnej teplote a opäť zcentrifugovaná pri 6 010 g/ 1 minútu.
11. Plazmidová DNA bola premytá v 500 μl premývacieho roztoku. Roztok bol zcentrifugovaný pri 6 010 x g/ 1 minútu. Znovu bolo pridaných 300 μl premývacieho roztoku a kolónka bola zcentrifugovaná pri 6 010 x g/ 2 minúty.
12. Kolónka bola nasadená na mikroskúmavku o objeme 1,5 ml. Na povrch kolóny bolo napipetovaných 50 μl sterilnej vody. Pripravená kolónka bola inkubovaná 1 minútu pri laboratórnej teplote a na záver bola zcentrifugovaná pri 6 010 x g/ 1 minútu.
13. Po centrifugácii bola kolónka odstránená a izolovaná plazmidová DNA bola uschovaná v mikroskúmavke.

3.2.4.2 Purifikácia PCR produktu

Pre purifikáciu PCR produktu bol použitý komerčne dostupný kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega). Princíp spočíva v naviazaní DNA na kolónku s membránou z kremičitého skla pri vysokej iontovej sile. Po purifikácii dôjde k uvoľneniu DNA do roztoku s nižšou iontovou silou (sterilnej destilovanej vody).

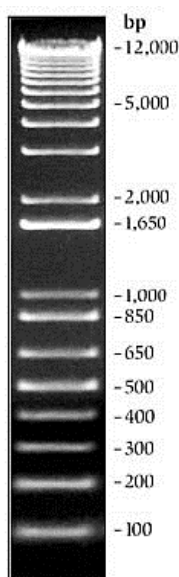
1. K finálnemu objemu získaných PCR produktov bol pridaný ekvivalentný objem membránovo- väzobného roztoku.
2. Produkty PCR boli prenesené do kolónky s membránou z kremičitého skla.
3. Po prenesení PCR produktov do kolónky boli inkubované po dobu 1 minúty pri laboratórnej teplote.
4. Po inkubácii boli kolónky zcentrifugované pri 9 391 x g/ 1 minútu.
5. Do kolóniek bolo pridaných 500 μl membránovo- premývacieho roztoku a opäť boli zcentrifugované pri 9 391 x g/ 1 minútu.

6. Po centrifugácii bolo znovu pridaných 300 μ l membránovo- premývacieho roztoku a kolónky boli zcentrifugované pri 9 391 x g/ 2 minúty.
7. Na povrch membrány bolo pridaných 50 μ l destilovanej vody.
8. Nasledovala inkubácia po dobu 1 minúty pri laboratórnej teplote.
9. Po inkubácii prebehla centrifugácia pri 9 391 x g/ 1 minútu.

3.2.4.3 Elektroforéza DNA v agarózovom géli

Elektroforéza je klasickou metódou, univerzálne používanou na rozdelenie makromolekúl. Princípom elektroforézy je pohyb nabitých makromolekúl v elektrickom poli, ktorého výsledkom je separácia fragmentov DNA na základe ich veľkostí. Rýchlosť pohybu jednotlivých foriem DNA v agarózovom géli závisí od veľkosti molekuly DNA, tvaru molekuly DNA, koncentrácie agarózového gélu a napätia.

Na rozdelenie fragmentov DNA bol v priebehu experimentálnej práce používaný 1% agarózový gél v 1x TAE pufri. Agarózu bolo nutné v pufri rozpustiť zahriatím v mikrovlnnej trúbe. Po dôkladnom rozpustení bola agaróza vychladená približne na teplotu 50 °C. Pre vizualizáciu DNA pod ultrafialovým (UV) svetlom, bolo pridané fluorescenčné interkalačné farbivo- 0,001% ethidium bromid (EtBr), ktoré po ožiarení oranžovo fluoreskuje. Analyzované vzorky boli pred nanesením na gél zmiešané s 10x vzorkovým pufrom a ako štandard bol použitý 1 Kb Plus DNA ladder (Obr. 21) v množstve 5 μ l. Fragmenty boli separované v aparátúre pri konštantnom napätí 3- 5 V/ cm.



Obrázok 21 1Kb Plus DNA ladder

(prevzaté www.induslab.com.br/media/catalog/product/cache/1/image/44307c3ee4561ed8fe9de16473295d8a/1/0/107_7018_1.jpg).

3.2.4.4. Sekvenovanie

Sekvenovanie DNA bolo prevádzané firmou GATC Biotech (Nemecko). Vzorky boli dodávané v mikroskúmavkách vo forme plazmidovej DNA v odporúčaných koncentráciách 50- 100 ng/μl v celkovom objeme 10 μl. K plazmidovej DNA bol pridaný primer (kap. 3.1.3 v Tab.1.) v odporúčanej koncentrácii 5 pmol/ μl. Vyhodnotenie sekvencií bolo následne prevedené použitím počítačového programu CLC Main Workbench 6.8.1.

3.2.5 POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA (PCR)

Polymerázová reťazová reakcia je jednou zo základných metód využívanej v molekulárnej biológii, ktorá umožňuje veľmi efektívne amplifikovať špecifické úseky DNA ohraničených oligonukleotidovými primermi v podmienkach *in vitro*.

3.2.5.1 Amplifikácia naklonovaného génu *vga(A)_{LC}* v pRMC2 (PCR 1)

Reakčná zmes pre amplifikáciu bola pripravená v celkovom objeme 50 μl a je uvedená v Tab. 5. Podmienky reakcie sú uvedené v Tab. 6. Prítomnosť PCR produktu bola analyzovaná pomocou DNA elektroforézy. Na gél bolo nanosené 10 μl reakčnej zmesi.

Tabuľka 5 Zloženie reakčnej zmesi

Zloženie reakčnej zmesi	Objem na jednu reakciu
dH ₂ O	35,8 μl
Phusion HF R. B.	10 μl
10 Mm dNTP	1 μl
templát	0,25 μl
forward primer (Vga_pRMC_invPCR_F)	1 μl
reverse primer (Vga_PGGS_pRMC_invPCR_R)	1 μl
phusion polymeráza	1 μl

Ako templátová DNA bol použitý plazmid pGBN044 (obsahuje *vga(A)_{LC}*).

Tabuľka 6 Podmienky PCR (1) reakcie

Teplota	Čas	Počet cyklov	Fáza
98 °C	1 minúta	1	Primárna denaturácia
98 °C	15 sekúnd	25	Denaturácia
57 °C	30 sekúnd		Nasadnutie primerov
72 °C	2 minúty		Elongácia
72 °C	3 minúty	1	Finálna elongácia
15 °C	5 minút		Chladienie

3.2.5.2 Amplifikácia génu kódujúceho fotokonvertibilný fluorescenčný proteín mEos2 (PCR 2)

Reakčná zmes pre amplifikáciu bola pripravená v celkovom objeme 50 μl a je uvedená v Tab. 7. Podmienky reakcie sú uvedené v Tab. 8. Prítomnosť PCR produktu bola analyzovaná pomocou DNA elektroforézy. Na gél bolo nanosené 10 μl reakčnej zmesi.

Tabuľka 7 Zloženie reakčnej zmesi

Zloženie reakčnej zmesi	Objem na jednu reakciu
dH ₂ O	35,8 μl
Phusion HF R. B. (Reaction Buffer)	10 μl
10 Mm dNTP	1 μl
templát	0,25 μl
forward primer (Vga_PGGGS_mEos2_F)	1 μl
reverse primer (pRMC2_mEos2_R)	1 μl
phusion polymeráza	1 μl

Ako templátová DNA bol použitý plazmid pET24dmEos (obsahuje fluorescenčný proteín mEos2).

Tabuľka 8 Podmienky PCR (2) reakcie

Teplota	Čas	Počet cyklov	Fáza
98 °C	1 minúta	1	Primárna denaturácia
98 °C	15 sekúnd	25	Denaturácia
67 °C	30 sekúnd		Nasadnutie primerov
72 °C	1 minúta		Elongácia
72 °C	3 minúty	1	Finálna elongácia
15 °C	5 minúta		Chladenie

3.2.5.3 Kolóniová PCR

Prostredníctvom tejto PCR reakcie bola overená správnosť klonovania génu kódujúceho proteín Vga(A)_{LC} fúzovaného s fluorescenčným proteínom mEos2 v pRMC2 vektore. Rozdiel v mechanizme tejto reakcie je, že namiesto vyizolovanej DNA bola pridaná pomocou sterilnej špičky kolónia z nakultivovaného testovaného kmeňa (ktorá predstavovala templát) do reakčnej zmesi v celkovom objeme 20 μl . Trebalo dať pozor na to, aby sa pri odoberaní kolónie testovaného kmeňa neodoberali aj kúsky agaru, ktoré by reakciu mohli kontaminovať alebo inhibovať. K amplifikácii bola použitá Taq- Purple DNA polymeráza (1 U/ μl ; Top-Bio). Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v Tab. 9. Podmienky reakcie sú uvedené v Tab. 10. Overenie PCR bolo analyzované pomocou DNA elektroforézy. Na gél bolo nanosené 10 μl reakčnej zmesi.

Tabuľka 9 Zloženie reakčnej zmesi

Zloženie reakčnej zmesi	Objem na jednu reakciu
dH ₂ O	16,4 µl
10x PCR blue buffer	2 µl
10 Mm dNTP	0,2 µl
templát	0,5 µl
forward primer	0,2 µl
reverse primer	0,2 µl
Taq purple polymeráza	0,5 µl

Boli použité dva sety primerov pre dve PCR reakcie. Primery boli špecifické pre danú reakciu a sú uvedené v kap. 3.1.3 v Tab.1.

Tabuľka 10 Podmienky PCR reakcie

Teplota	Čas	Počet cyklov
95 °C	3 minúty	23
95 °C	15 sekúnd	
45 °C	30 sekúnd	
72 °C	1 minúta	
15 °C	5 minút	

3.2.5.4 Kontrolná PCR pre overenie prítomnosti inzertu v plazmide pRMC2

Polymerázová reťazová reakcia bola vykonaná aj pre overenie inzertu u transformovaných kolónií *Staphylococcus aureus* RN4220. Použitými primermi boli Vga_PGGGS_mEos2_F a pRMC2_R, ktoré nasadajú na pRMC2 vektor v miestach ohraničujúcich vložený inzert. Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v Tab. 11 a podmienky PCR reakcie sú uvedené v Tab. 12.

Tabuľka 11 Zloženie reakčnej zmesi

Zloženie reakčnej zmesi	Objem na jednu reakciu
dH ₂ O	26,9 µl
10x PCR blue buffer	2 µl
10 Mm dNTP	0,2 µl
templát	0,5 µl
forward primer (Vga_PGGGS_mEos2_F)	0,2 µl
reverse primer (pRMC2_R)	0,2 µl
Taq purple polymeráza	0,5 µl

Templátom bola izolovaná kolónia z nakultivovaného testovaného kmeňa.

Tabuľka 12 Podmienky PCR reakcie

Teplota	Čas	Počet cyklov
95 °C	10 minút	
45 °C	2 minúty	Pridanie Taq purple polymerázy
95 °C	15 sekúnd	23
45 °C	30 sekúnd	
72 °C	1 minúta	
15 °C	15 sekúnd	

3.2.6 STANOVENIE CITLIVOSTI NA ANTIMIKROBIÁLNE LÁTKY

V experimentálnej časti tejto diplomovej práce bola stanovená citlivosť na antimikrobiálne látky kvalitatívne a kvantitatívne. Pre kvalitatívne stanovenie bola použitá disková difúzna metóda a pre kvantitatívne stanovenie bola použitá mikrodilučná metóda.

3.2.6.1 Mikrodilučná metóda

Testovanie mikrodilučnou metódou prebiehalo v 96- jamkových mikrotitračných platničkách s MH médiom s postupne sa zvyšujúcou koncentráciou testovaného antibiotika v rozmedzí 0,5- 32 µg/ml. Výsledkom tejto metódy bolo stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC). MIC antibiotika predstavuje najnižšiu koncentráciu antibiotika, ktorá inhibuje viditeľný rast bakteriálneho kmeňa v MH médiu.

1. Na prípravu inokula boli odobraté 2- 3 izolované bakteriálne kolónie narastené na TSA/ BHI agare s prídavkom CAM vo výslednej koncentrácii 25 µg/ml pre udržanie plazmidu a selekciu buniek *S. aureus* obsahujúcich plazmid pRMC2. Inokulum testovaného kmeňa bolo pripravené resuspendovaním kolónie v 2 ml fyziologického roztoku na výsledný zákal v rozmedzí od 0,5- 1 McFarland.
2. Do jednotlivých jamiek v 96- jamkovej mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 100 µl MH média opäť s prídavkom CAM. Ak vyžadoval experiment, bol pridaný aj induktor anhydratetracyklín vo výslednej koncentrácii 100 ng/ml, ktorý je dôležitý pre indukciu bakteriálneho kmeňa s inducibilným promótorom. Následne bolo pridané vypočítané množstvo testovaného antibiotika .
3. Na záver bolo k celej zmesi pridaných 5 µl pripraveného inokula, ktoré bolo opatrne premiešané v médiu za účelom homogénneho premiešania buniek.
4. Doštička bola po okrajoch obalená parafilmom z dôvodu prevencie vyschnutia, prípadne vniknutiu externého vzduchu a bola inkubovaná v termostate na 37 °C/ 24hodín.

V prípade potreby získania dát ohľadne rastu buniek pri OD₆₀₀, bola doštička vložená do spektrofotometra (Biotek Synergy HT) pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín a každých 10 minút bola zaznamenaná OD₆₀₀. MIC bola stanovená z nezávislých meraní, vždy v dvoch paralelách. Ako negatívna kontrola bol použitý kmeň *S. aureus* obsahujúci prázdny vektor pRMC2.

3.2.6.2 Disková difúzna metóda

Diskovou difúznou metódou bola stanovená citlivosť podľa toho, či vyšetrovaná baktéria v stanovenej koncentrácii buniek na agarovej pôde vytvorila zónu inhibície rastu okolo disku s určitou koncentráciou antibiotika po predpísanej dobe inkubácie. Pre stanovenie bol použitý Mueller- Hintonov (MH) agar.

1. Na prípravu inokula boli odobraté 2- 3 izolované bakteriálne kolónie narastené na TSA/ BHI agare s prídavkom CAM (25 µg/ ml), pre udržanie plazmidu a selekciu buniek *S. aureus* obsahujúcich plazmid pRMC2. Inokulum testovaného kmeňa bolo pripravené resuspendovaním kolónie v 2 ml fyziologického roztoku na výsledný zákal v rozmedzí od 1- 2 McFarland.
2. Pripravená suspenzia bola následne vyliala do pripravenej petriho misky s MH agarom (20 ml). Kývavými pohybmi misky bol rovnomerne pokrytý celý povrch agaru. Suspenzia sa nechala na 1 minútu vsiaknuť a prebytok bol z misky pomocou pipety odstránený. Kultivačná pôda sa nechala chvíľu osušiť.
3. Sterilnou ihlou boli na povrch agaru položené jednotlivé testovacie antibiotické disky vo vzdialenosti 1- 2 cm od okraja misky. Takto pripravené misky boli inkubované v termostate agarom nahor na 18- 24 hodín pri teplote 37 °C.
4. Po kultivácii boli odčítané priemery inhibičných zón.

3.2.7 METÓDY PRÁCE S PROTEÍNMI

3.2.7.1 Príprava vzoriek pre SDS- PAGE

1. Po rotačnej kultivácii testovaného bakteriálneho kmeňa bol odobratý 1 ml kultúry do mikroskúmavky a bunky boli zcentrifugované pri 15 871 x g/ 30 sekúnd.
2. Opatrne bol pomocou pipety odstránený supernatant a bunky boli resuspendované v 100 µl 1x PBS roztoku.

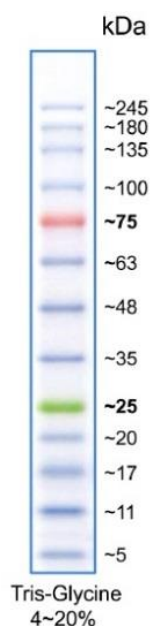
3. Bol pridaný lyzostafín v koncentrácii 10 mg/ ml za účelom lýzy buniek a uvoľnenia proteínov z bunky.
4. Takto pripravené vzorky boli inkubované v termostate pri teplote 37 °C/ 30 minút.
5. Po inkubácii bol ku vzorkám pridaný 2x SDS- PAGE vzorkový pufor v ekvivalentnom objeme.
6. Po tepelnej denaturácii pri teplote 98 °C po dobu 15 minút a po schladení boli vzorky pripravené na nanášanie do jamiek polyakrylamidového gélu.

3.2.7.2 SDS-PAGE proteínová elektroforéza

SDS- PAGE proteínová elektroforéza je metóda založená na rozdelení proteínov podľa veľkosti za pôsobenia elektrického prúdu. V experimentálnej časti tejto diplomovej práce bol vzhľadom na veľkosť študovaného proteínu pripravený 10% gél. Zloženie gélu je uvedené v Tabuľke 13. Pri skladaní aparatúry pre gél boli najskôr dôkladne očistené a odmastené sklička etanolom. Boli použité 1 mm sklička určené pre SDS- PAGE elektroforézu. Čo sa týka prípravy jednotlivých gélov, najprv bol pripravený separačný gél, ktorý sa prevrstvil cca 1 ml destilovanej vody za účelom odstránenia kyslíka, ktorý blokuje polymerizáciu gélu. Gél sa nechal približne 30 minút polymerovať. Po uplynutí tejto doby bola odstránená destilovaná voda a bol pripravený zaostrovací gél, ktorý bol nanesený nad separačný gél. Do separačného gélu bol vložený príslušný hrebienok. Pripravený gél sa nechal približne 30 minút polymerovať. Po polymerizácii gélu bola pripravená elektroforetická aparatúra, naplnená 1x SDS- PAGE pufrom. Do jednotlivých jamiek proteínového gélu bol nanesený proteínový štandard BlueElf Prestained Protein Marker (Obr. 22) v objeme 3- 5 μ l a vzorky o objeme 10 μ l. Elektroforéza spočiatku prebiehala pri napätí 90 V pre rozdelenie vzoriek v zaostrovacom géli, po prechode vzoriek do separačného gélu bolo napätie zvýšené na 120 V. Po skončení separácie proteínov bol gél vybraný spomedzi skiel a následne bol použitý buď na farbenie pomocou farbiaceho roztoku Comassie Brilliant Blue, alebo na analýzu metódou Western blot.

Tabuľka 13 Zloženie 10 % gélu pre SDS- PAGE proteínovú elektroforézu

Zloženie gélu	Separáčny gél 10 %	Zaostrovací gél 4 %
40 % akrylamid + 1,7 % bisAA	5 ml	666 µl
1,5 M Tris-Cl, pH= 8,8	5 ml	-
0,5 M Tris-Cl, pH= 6,8	-	1 250 µl
Destilovaná voda	9,4 ml	100 µl
5 % SDS	400 µl	2 984 µl
30 % APS	200 µl	50 µl
TEMED	20 µl	5 µl



Obrázok 22 BlueElf Prestained Protein Marker (prevzaté z www.jenabioscience.com/images/PDF/PS-105.pdf).

3.2.7.3 Farbenie SDS- PAGE gélu

1. Po ukončení SDS- PAGE elektroforézy boli gély prenesené do nádoby obsahujúcej farbiaci roztok Comassie Brilliant Blue a inkubované po dobu 15 minút na trepačke.
2. Po 15 minútach bol farbiaci roztok z nádoby vyliaty a gély boli následne odfarbované odfarbovacím roztokom po dobu 15 minút na kývačke pri laboratórnej teplote niekoľkokrát opakovane, až kým sa gél neodfarbil.
3. Odfarbený gél bol vložený do priesvitnej fólie a následne bol oskenovaný.

3.2.7.4 Western blot

Metódou Western blot bol v tejto práci detegovaný primárne proteín Vga(A)_{LC} v bunkovom lyzáte *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus haemolyticus*. Metóda bola použitá aj pri detekcii fúzneho proteínu Vga(A)_{LC} so zeleným fluorescenčným proteínom GFP a fotokonvertibilným fluorescenčným proteínom mEos2. Metóda využívala gélovú elektroforézu k separácii proteínov podľa ich veľkostí (SDS- PAGE). Následne boli proteíny prenesené z gélu na povrch PVDF (polyvinylidifluorid) membrány pomocou blotovacieho zariadenia Trans- Blot SD Semi- Dry Cell (Bio-Rad) pôsobením elektrického prúdu. Proteíny boli na povrchu membrány detegované špecifickými protilátkami.

Pred samotným prenesením proteínov z gélu na membránu bolo potrebné aktivovať PVDF membránu namočením na 10 sekúnd do metanolu a potom pomocou pinzety preniesť na 10 minút do prenosového pufru. V prenosnom pufri boli udržiavané aj dva filtračné papiere a polyakrylamidový gél. Trebalo dbať pozor na to, aby nedochádzalo k ich vyschnutiu. Prístroj je realizovaný ako sústava anódy (spodný diel) a katódy (horný diel), a keďže proteíny sú záporne nabité, tak boli prenesené z gélu smerom dolu t.j. na povrch membrány. Na blotovací prístroj bol teda postupne ukladajú filtračný papier, PVDF membrána, gél, filtračný papier. Pri skladaní bol braný ohľad na to, aby medzi jednotlivými vrstvami nevznikali vzduchové bubliny, ktoré by prenos proteínu mohli obmedziť. Prenos prebiehal za stáleho napätia 15 V po dobu 15 minút. Po ukončení prenosu bolo nutné povrch membrány tzv. zablokovať, čím sa zabránilo naviazaniu protilátky na nešpecifické miesta. Blokovanie bolo prevádzané umiestnením membrány do 5 % mlieka rozpusteného v 1x PBS roztoku a inkubáciou pri teplote 4 °C cez noc. Na ďalší deň bola membrána inkubovaná v 1 % mlieku rozpustenom v 1x PBS roztoku s primárnou protilátkou proti Vga(A)_{LC} (riedenie 1: 1000) po dobu 1 hodiny pri laboratórnej teplote. Nešpecificky naviazané protilátky boli z membrány odmyté štyrikrát po 15 minútach v 1x PBS roztoku. Potom bola membrána inkubovaná sekundárnou protilátkou (riedenie 1: 2000) znovu po dobu 1 hodiny pri laboratórnej teplote a premytá rovnakým spôsobom. Detekcia bola uskutočnená chemiluminiscenčným spôsobom s využitím 5 ml zmesi ImmobilomTM Western chemiluminiscent HRP Substrate (Merck) a signál bol vizualizovaný pomocou ChemiDocTMMMP (Bio- Rad).

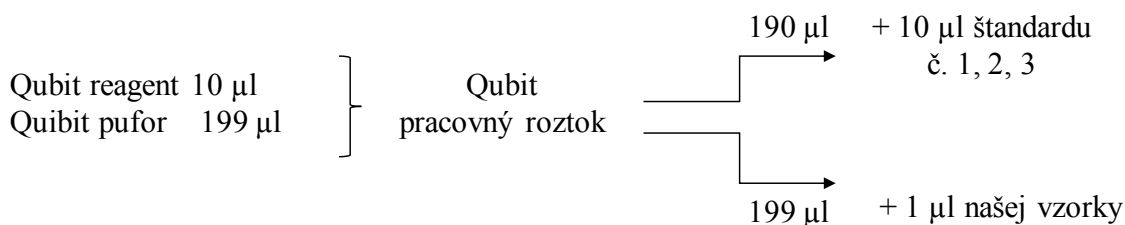
3.2.7.5 Príprava bunkových frakcií centrifugáciou

1. Bunková kultúra bola pripravená v 5 ml BHI média. Kultivácia bola za stáleho trepania pri teplote 37 °C/ 200 RPM po dobu 24 hodín.
2. Na druhý deň bolo zaočkované inokulum z predchádzajúcej kultúry do čerstvého BHI média v objeme 50 ml. Kultivácia bola za stáleho trepania pri teplote 37 °C/ 200 RPM až do požadovanej $OD_{600} = 0.7-0.8$.
3. Po kultivácii boli bunkové kultúry zcentrifugované pri 3 200 x g/ 4 °C/ 10 minút.
4. Po centrifugácii boli bunky zamrazené v tekutom dusíku a uskladnené pri teplote – 80 °C.
5. Na ďalší deň boli bunky resuspendované v 1 ml pripraveného pufru (kap. 3.1.5).
6. Vzorky boli prenesené do skúmavky so sklenenými guľčkami (0,1 mm priemer) v pomere 2:1 (vzorka : sklenené guľčky)
7. K dezintegrácii bol použitý FastPrep- 24TM 5G inštrument- 4 cykly po dobu 20 sekúnd. Medzi každým cyklom boli vzorky chladené na ľade po dobu 120 sekúnd.
8. Celkový lyzát bol oddelený od guľčiek centrifugáciou pri 500 x g/ 2 minúty/ 4 °C.
9. Po centrifugácii bol supernatant opatrne prepipetovaný do mikroskúmavky.
10. Bunkový debris bol odstránený centrifugáciou pri 16 000 x g/ 10 minút/ 4 °C. Bolo odpipetovaných 50 µl supernatantu (predstavoval bunkovú frakciu 16Ss). Pelet bol rozpustený v 50 µl močovine (predstavoval bunkovú frakciu 16Sp).
11. Membrány boli izolované centrifugáciou pri 30 000 x g/ 30 minút/ 4 °C. Bolo odpipetovaných 50 µl supernatantu (predstavoval bunkovú frakciu 30Ss). Pelet bol resuspendovaný v 50 µl močovine (predstavoval bunkovú frakciu 30Sp).
12. Ribozómy boli oddelené od cytoplazmy centrifugáciou pri 100 000 x g/ 1 hodinu. Bolo odpipetovaných 50 µl supernatantu (predstavoval bunkovú frakciu 100Ss). Pelet bol rozpustený v 50 µl močovine (predstavoval bunkovú frakciu 100Sp).
13. Ku každej vzorke bol pridaný ekvivalentný objem 2x SDS- PAGE vzorkového pufru a takto pripravené vzorky boli denaturované pri teplote 96 °C/ 15 minút
14. Objem nanesených vzoriek bol následne stiahnutý na koncentráciu proteínov pre rovnomerné nanášanie na gél pre SDS- PAGE elektroforézu (3.2.7.2).

3.2.7.6 Qubit assay

Qubit assay sa využíva spolu s Qubit fluorometrom na kvantifikáciu DNA, RNA a proteínov. Fluorometer využíva fluorescenčné farbivá na stanovenie koncentrácie nukleových kyselín a proteínov vo vzorke. Každé farbivo je špecifické pre jeden typ molekuly: DNA, RNA alebo proteín. Tieto farbivá majú extrémne nízku fluorescenciu, kým sa nenaviažu na určitú molekulu. UV spektrofotometer meria absorbanciu svetla pri 260 nm (pre DNA a RNA) alebo 280 nm (pre proteíny).

V tejto práci bola pomocou tohto testu stanovená koncentrácia proteínov vo vzorkách, ktoré boli pripravené spôsobom uvedeným v schéme (Obr. 23).



Obrázok 23

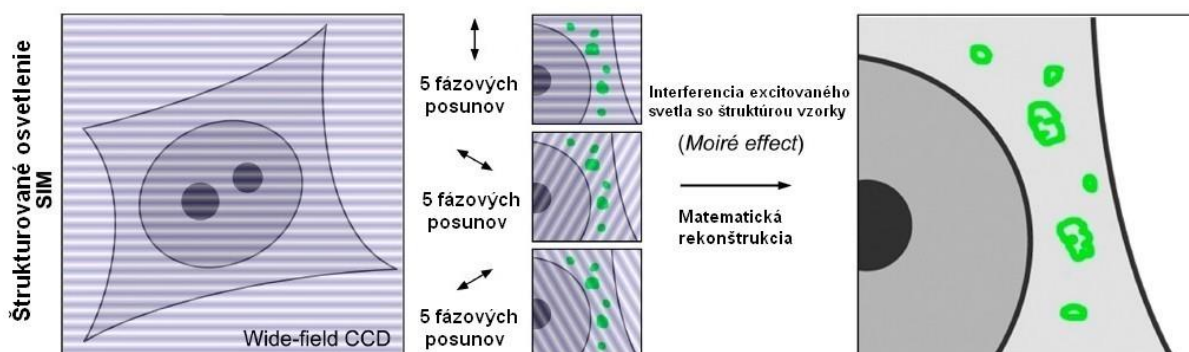
Po príprave boli vzorky premiešané na vortexe po dobu 2- 3 sekúnd a inkubované pri laboratórnej teplote/ 15 minút v tme. Po inkubácii boli vzorky opäť premiešané na vortexe po dobu 2- 3 sekúnd a následne bola zmeraná koncentrácia proteínov na Qubit fluorometri.

3.2.8 MIKROSKOPIA

Bunková biológia bola dlho založená len na svetelnej mikroskopii a zároveň tak obmedzená jej optickým rozlíšením (Schermelleh *et al.* 2010). Počas posledných dvoch desaťročí sa však do popredia dostali nové technológie, medzi nimi i fluorescenčné mikroskopické techniky, ktoré nám otvorili nové príležitosti na štúdium biologických štruktúr v detailoch. A práve z tohto dôvodu bola táto metóda zvolená v experimentálnej časti tejto práce. Pretože umožňuje sledovanie a zobrazovanie proteínov a ich dynamickej organizácie v nanometrovom rozlíšení nielen na fixovaných ale aj v živých bunkách (Godin *et al.* 2014).

3.2.8.1 Mikroskopia so štruktúrovaným osvetlením (SIM)

Superrezolučná mikroskopia je optická mikroskopia, ktorá nám umožňuje sledovať objekty s rozlíšením, ktoré je vyššie než je difrakčný limit. Difrakčný limit klasickej svetelnej mikroskopie neumožňuje odlíšiť dva body bližšie než 250 nm. SIM je kompatibilná s väčšinou štandardných fluoroforov. Princípom tejto mikroskopie je osvetlenie vzorky svetlom s pruhovaným vzorom vzniknutým difrakciou na mriežke (štrukturované osvetlenie). Pozícia a orientácia pruhovaného vzoru sa niekoľkokrát mení v rôznych smeroch a emitovaný fluorescenčný signál je zaznamenaný pre každú z týchto polôh. Interferenciou svetla s detailami vzorky vzniká tzv. *moiré* efekt. Obraz je detegovaný CCD kamerou a obsahuje tak informácie o vzorke s vysokou priestorovou frekvenciou. Získavame a zhromažďujeme nespracované data niekoľkých obrázkov v rôznych smeroch a v závere pomocou počítačového spracovania sa vytvorí rekonštruovaný obraz s vysokým laterálnym rozlíšením, dvojnásobným v xy osi v porovnaní s wide-field (WF) rozlíšením, t.j. približne 100 až 130 nm (Obr. 24) (Schermelleh *et al.* 2010; Godin *et al.* 2014).



Obrázok 24 Princíp vzniku rekonštruovaného mikroskopického obrazu metódou štruktúrovaného osvetlenia (Schermelleh *et al.* 2010- upravené).

3.2.8.2 Opracovanie krycích sklíčok na mikroskopovanie pre zvýšenie hydrofilného charakteru povrchu skla

Krycie sklíčka Zeiss (hrúbka NO 1 1/2; High Performance; 18 x 18 mm; 0, 170 +/- 0, 005 mm) pri superrezolučnej mikroskopii museli byť špeciálne opracované pre zvýšenie hydrofilného charakteru povrchu skla. Sklíčka boli vložené do Erlenmeyerovej banky a dvakrát premyté v dH₂O. Po premytí boli inkubované za stáleho trepania (200 RPM) 4 hodiny pri teplote 37 °C v 1 M HCl a po inkubácii boli sklíčka dôkladne premyté v dH₂O

až pokiaľ pH v roztoku nedosiahlo hodnotu 7,0. Nakoniec boli krátko premyté a uskladnené v 96 % EtOH.

3.2.8.3 Príprava buniek na mikroskopické pozorovanie

Po kultivácii bol 1 ml kultúry zcentrifugovaný pri 15 871 x g/ 1 minútu, opatrne bol odstránený supernatant a bunky boli premyté dvakrát v 1 ml v 1x PBS roztoku. Po jednotlivom premytí boli bunky zcentrifugované pri 15 971 x g/ 1 minútu a supernatant bol opatrne odstránený. Bunky boli následne rozsuspendované 10- 15 μ l FluoroBrite médiu, ktoré zabraňuje vybieleniu fluorescenčných proteínov a zároveň je bohaté na glukózu, čím vytváralo vhodné prostredie pre živé bunky. V prípade použitia fluorescenčných farieb, FL-VAN (fluorescenčný vankomycín, značenie bunkovej steny), FL-TEI (fluorescenčný teikoplanín, značenie bunkovej membrány) sa bunky premývali nie v 1x PBS roztoku, ale vo FluoroBrite médiu s prídavkom fluorescenčnej farby.

3.2.8.4 Príprava preparátu na mikroskopické pozorovanie

Krycie sklíčka, uskladnené v 96 % EtOH, sa nechali vysušiť na vzduchu alebo boli opálené nad kahanom. Po uschnutí bolo krycie sklíčko prilepené pomocou lepiacej pásky na plastový rámik s vyvrtanou dierkou v rozmeroch o priemere 13 mm a 5- 8 mm do hĺbky. Na krycie sklíčko bolo napipetované 10 μ l bunkovej suspenzie, ktorá bola prikrytá agarózou (1 % agaróza v PBS roztoku: 0,04 g agarózy, 40 ml PBS roztoku). Agaróza bola vyrezaná pomocou plastovej skúmavky, ktorej hrdlo malo rovnaký rozmer ako vyvrtaná dierka v plastovom rámiku. Diera s agarózou bola prelepená lepiacou páskou, aby sa zabránilo vyschnutiu vzorky. Takto pripravený preparát bol pripravený k mikroskopickému pozorovaniu (Obr. 25).



Obrázok 25 Preparát na mikroskopické pozorovanie.

3.2.8.5 Podmienky pre mikroskopické pozorovanie

Obrázky boli nasnímané buď v režime wide-field, v ktorom je celá vzorka vystavená svetelnému zdroju, alebo metódou SIM (Liu et al. 201). Objektív- Olympus so 60x zväčšením. Mikroskopické nastavenie pre pozorovanie jednotlivých fluorescenčných proteínov je uvedené v Tab. 14.

Tabuľka 14 Nastavenie pre mikroskopické pozorovanie

Fluorescenčný proteín	mEos2	GFP	eq-FP650
Excitácia	488 nm, 568 nm fotokonverzia pri 405 nm	488 nm	568 nm
	WF		SIM
Expozícia	50-70 (¹ 150)		170 (¹ 300)
Laser	10 %		1%
Vzdialenosť medzi vrstvami	0,250		0,125
Hrúbka vzorky	2,5-3		1,5
Veľkosť obrázku v pixeloch	512x512		256x256

¹ platí pre eq-FP650

Uvedený expozičný čas a miera excitácie boli väčšinou konštantné, menili sa iba v prípade nízkeho alebo slabého fluorescenčného signálu u pripravených vzoriek.

3.2.8.6 Spracovanie a analýza mikroskopických obrázkov

Mikroskopické obrázky boli následne zrekonštruované a dekonvulované v programe SoftWorx 6.5.2. Rekonštrukcia bola žiaduca u obrázkov vytvorených metódou SIM, ktorá sa niesla rizikom vzniku artefaktov. Dekonvulácia je matematické spracovanie obrazu, ktoré redukuje rozmazanie obrazu a vylepšuje kontrast a rozlíšenie. Rekonštrukcia aj dekonvulácia boli automaticky uskutočnené po zadaní príkazu do programu. Ďalšie spracovanie a analýza boli uskutočnené v programe FIJI ImageJ. V tomto programe bola použitá funkcia maximálnej Z- projekcie obrázkov (z- stack). Spôsob projekcie spočíva v zlúčení všetkých získaných rezov v Z- osi do jedného obrázku. Ďalej boli v tomto programe zlúčené obrázky z dvoch farebných kanálov do jedného obrázku, počítali, analyzovali bunky a merala sa intenzita fluorescencie v jednotlivých bunkách.

4 VÝSLEDKY

4.1 SUBCELULÁRNA LOKALIZÁCIA ARE Vga(A)_{LC} PROTEÍNU PROSTREDNÍCTVOM FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE

Pre pozorovanie subcelulárnej lokalizácie rezistentného proteínu Vga(A)_{LC} bolo zvolené použitie fluorescenčných proteínov, nakoľko pre stafylokoky nebol doposiaľ vyvinutý protokol pre úspešnú imunodetekciu intracelulárnych proteínov fluorescenčne značenými protilátkami. Výhodou použitia fluorescenčných proteínov oproti fluoroforam je, že fluorescenčné proteíny sú geneticky viazané ku proteínu nášho záujmu a sú často používané ako biologické markery, ktoré umožňujú vizualizáciu lokalizácie subcelulárnych proteínov, skúmanie génovej expresie, proteín-proteínových interakcií, proteínovej syntézy a degradácie (Endesfelder *et al.* 2011; Sattarzadeh *et al.* 2015; Kato *et al.* 2017). Nepatrnou nevýhodou je ich nižší jas alebo obmedzený fotónový výťažok. Fúzny proteín môže mať tiež zmenené vlastnosti, nemusí fungovať alebo nemusí byť správne v bunke lokalizovaný (Endesfelder *et al.* 2011).

Ako fluorescenčný proteín pre prípravu konštruktu exprimujúceho gén kódujúci Vga(A)_{LC} bol zvolený fotokonvertibilný mEos2, ktorý sa neskôr plánoval použiť aj na sledovanie jednotlivých molekúl. mEos2 je monomérený fotokonvertibilný fluorescenčný proteín, ktorý je schopný účinne sa skladať pri teplote 37 °C. Vyznačuje sa tým, že fotokonvertuje zo zeleného fluorescenčného spektra do červeného fluorescenčného spektra. V základnom stave je tento proteín zelený a po ožiarení UV svetlom pri vlnovej dĺžke 405 nm prechádza do veľmi fotostabilného červeného fluorescenčného stavu (McKinney *et al.* 2009; Baker *et al.* 2010; Sattarzadeh *et al.* 2015). Ako hostiteľský kmeň bol zvolený *Staphylococcus aureus* RN4220, pretože je ideálny pre molekulárno- genetickú manipuláciu.

V experimentálnej časti práce bola pozorovaná aj bunková lokalizácia fluorescenčného fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP, ktorý bol pripravený kolegom Mgr. Jakubom Lenartom. Zelený fluorescenčný proteín (GFP) pochádza z orgánu medúzy *Aequorea victoria* (Ohba *et al.*, 2013). GFP sa vyznačuje vysokou fotostabilitou a je najbežnejším fluorescenčným proteínom používaným v promótorových a proteínových fúznych konštruktoch (Chalfie 1995). Fúzny proteín GFP bol použitý za účelom

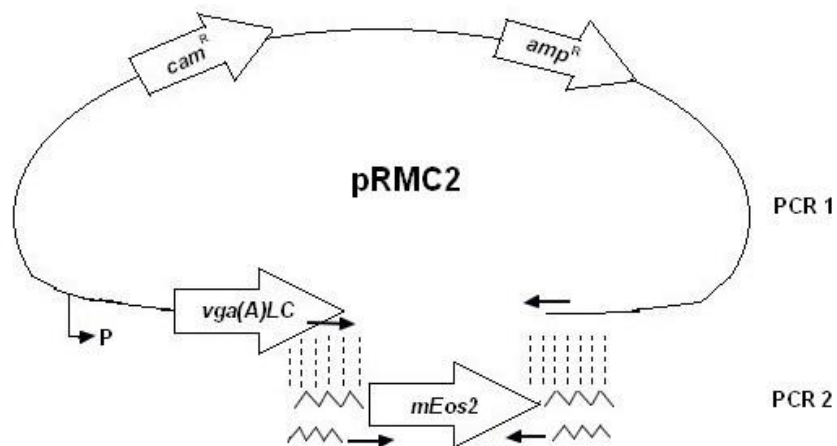
porovnávania možného vplyvu dvoch rôznych fluorescenčných proteínov na lokalizáciu Vga(A)_{LC}.

4.1.1 PRÍPRAVA KONŠTRUKTU PRE EXPRESIU PROTEÍNU V *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RN42220

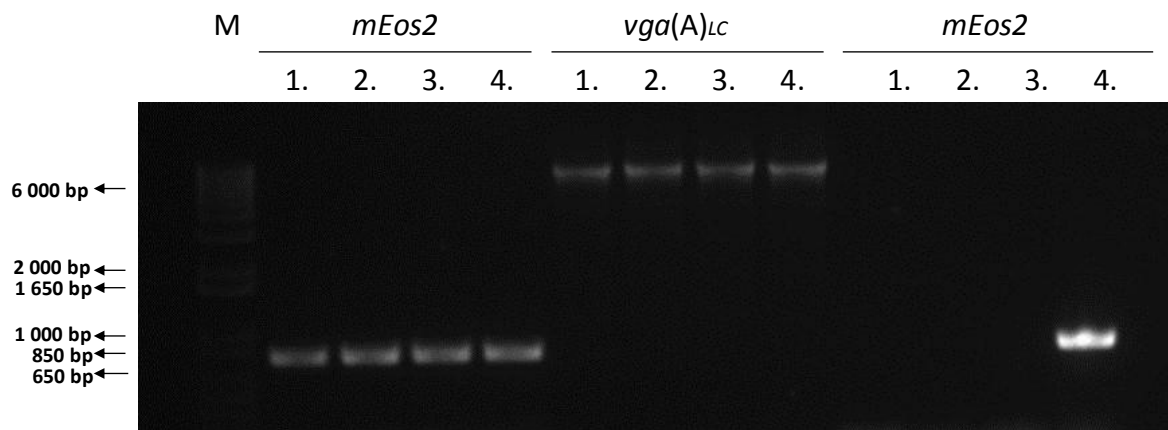
4.1.1.1 Príprava konštruktu Vga(A)_{LC}-mEos2

Prvým krokom pri príprave konštruktu bolo zvolenie si expresného vektoru pRMC2 s naklonovaným génom kódujúcim Vga(A)_{LC} proteín. pRMC2 obsahuje inducibilný promótor, indukovaný anhydratetracyklínom- homológ tetracyklínu. Výhodou voľby tohto vektoru je, že môžeme kontrolovať spúšťanie expresie vloženého génu. Okrem toho bol pre expresiu ARE proteínov úspešne použitý v našom laboratóriu už predtým (Vimberg, 2015). pRMC2 má dva počiatky replikácie, pre *E. coli* a pre *S. aureus* a selekčné gény pre ampicilínovú a chloramfenikolovú rezistenciu.

Pre prípravu konštruktu exprimujúceho gén kódujúci fúzny fluorescenčný proteín Vga(A)_{LC}-mEos2 bol vektor pRMC2 s naklonovaným génom *vga(A)_{LC}* (pGBN044) a klonovaný inzert s génom *mEos2* linearizovaný a amplifikovaný prostredníctvom PCR (kap. 3.2.5.1 a 3.2.5.2) (Obr. 26), s použitím špecifických primerov, ktoré obsahovali 5' konce presahujúce časti (35 nt) komplementárne k vektoru (kap. 3.1.3). Tieto primery obsahovali aj PGGGS aminokyselinovú sekvenciu, ktorá predstavovala flexibilný linker spájajúci študovaný proteín s fluorescenčným proteínom. Účelom flexibilného linkeru je snaha o redukciu negatívneho vplyvu na funkciu Vga(A)_{LC}. Po amplifikácii boli výsledné PCR produkty analyzované DNA elektroforézou (kap. 3.2.4.3) (Obr. 27) a purifikované komerčne dostupným kitom SV gel and PCR Clean-Up system (kap. 3.2.4.2). Ďalším krokom bolo odstránenie templátovej (metylovanej) DNA štiepením restriktčným enzýmom DpnI a následné prebehnutie SLiCE reakcie (kap. 3.2.3.1).



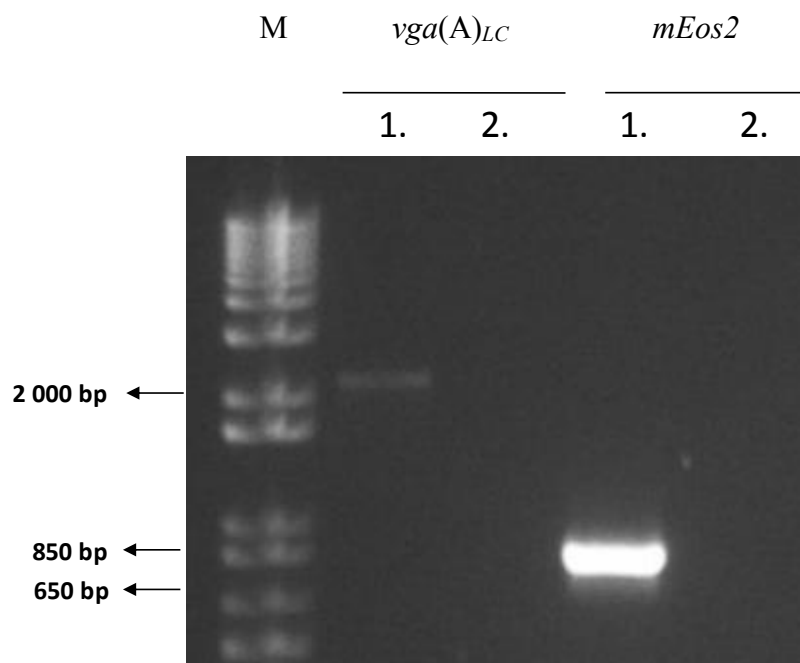
Obrázok 26 Schéma zobrazujúca klonovanie prostredníctvom metódy SLiCE. PCR 1: Amplifikácia naklonovaného génu *vga(A)_{LC}* v pRMC2, PCR 2: Amplifikácia génu kódujúceho fotokonzertibilný fluorescenčný proteín mEos2.



Obrázok 27 Analýza PCR produktov po amplifikácii DNA elektroforézou. Po PCR amplifikácii celého vektoru pRMC2 s naklonovaným génom *vga(A)_{LC}* boli získané 4 PCR produkty. Po PCR amplifikácii klonovaného inzertu bolo získaných 5 PCR produktov pre gén *mEos2*. Vysvetlivky: M- štandard molekulovej hmotnosti.

Na druhý deň bola SLiCE reakcia transformovaná teplotným šokom do kompetentných buniek *E. coli* XL1- Blue (kap. 3.2.2.2). Bunky boli po transformácii vysiate na LB agar so selekčným antibiotikom karbenicilínom (100 µg/ml). Ďalší deň boli dve narastené kolónie buniek *E. coli* analyzované pre prítomnosť vektoru obsahujúceho požadovaný inzert pomocou kolóniovej PCR (kap. 3.2.5.3) K amplifikácii boli použité 2 sady primerov pre dve PCR reakcie: I. pRMC2-F, mEos2-R (1,3 bp); II. *vga*_PGGS_mEos2-F, pRMC2-R (300 bp). PCR produkty boli analyzované na gélovej elektroforéze (kap. 3.2.4.3) (Obr. 28). Po overení správnosti konštruktu boli príslušné kolónie *E. coli*, pre účely izolácie plazmidovej DNA (kap. 3.2.4.1), zaočkované do 3 ml LB média s karbenicilínom

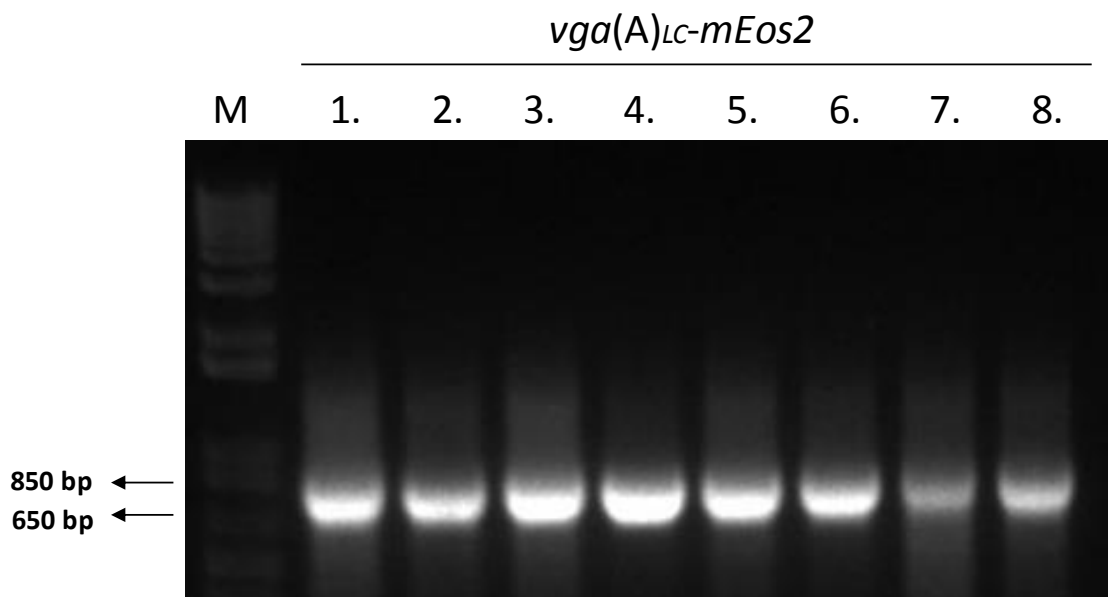
(100 µg/ml). Bunky boli cez noc kultivované pri teplote 37 °C za stáleho trepania pri otáčkach 200 RPM. Izolovaný plazmid bol odoslaný na sekvenačnú analýzu (kap. 3.2.4.4). Vložený fragment bol presekvenovaný z primerov forward pRMC2 a reverse pRMC2.



Obrázok 28 Overenie jednotlivých fragmentov pre *vga(A)_{LC}* v pRMC2 a *mEos2* v bunkách *E. coli* DNA elektroforézou. Vysvetlivky: 1- označenie prvej testovanej kolónie bunky *E. coli*; 2- označenie druhej testovanej kolónie bunky *E. coli*. Z analýzy vyplýva, že testovaná kolónia s číslom 1 obsahuje vložený vektor. M- štandard molekulovej hmotnosti.

4.1.1.2 Transformácia konštrukt do *Staphylococcus aureus* RN4220 a overenie transformantov

Pripravený konštrukt bol transformovaný elektroporáciou do kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 (kap. 3.2.2.4). Prítomnosť plazmidu (konštrukt) v bunkách bola overená pomocou kontrolnej PCR (kap. 3.2.5.4). K amplifikácii úseku obsahujúceho vložený gén boli použité primery *vga_PGGGS_mEos2-F* a *pRMC2-R*. Na Obr. 29 vidíme, že transformácia konštrukt do kmeňa *S. aureus* RN4220 bola úspešná. Otestované kolónie boli preočkované na TSA agar s CAM (25 µg/ml). Na ďalší deň boli vyrastené kolónie rozsuspendované v médiu pre uchovávanie buniek (kap. 3.1.4). Takto pripravené zásobné kmene boli uschovávané pri teplote -80 °C.



Obrázok 29 DNA elektroforéza kontrolnej PCR. Overenie prítomnosti plazmidu pRMC2 obsahujúceho fúzny proteín *vga(A)_{LC}-mEos2* v kmeni *Staphylococcus aureus* RN4220. M- štandard molekulovej hmotnosti.

4.1.2 OVERENIE FUNKČNOSTI FÚZNYCH PROTEÍNOV *Vga(A)_{LC}-mEos2* A *Vga(A)_{LC}-GFP* V KMENI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RN4220

4.1.2.1 Testovanie citlivosti RN4220 exprimujúceho fúzne proteíny *Vga(A)_{LC}-mEos2* a *Vga(A)_{LC}-GFP*

Pre testovanie citlivosti kmeňa *S. aureus* RN4220 exprimujúceho fúzny proteín *Vga(A)_{LC}-mEos2* a *Vga(A)_{LC}-GFP* na antibiotiká bola využitá mikrodilučná metóda (kap. 3.2.6.1). Stanovenie MIC mikrodilučnou metódou bolo uskutočnené v piatich nezávislých meraniach a to vždy v prítomnosti a v neprítomnosti induktora expresie fúznych proteínov AnhTet v koncentrácii 100 ng/ml. Každé meranie prebehlo v dvoch paralelách. V Tab. 15 je uvedená MIC, ktorá sa v týchto experimentálnych meraniach najviac opakovala.

Citlivosť kmeňa *S. aureus* RN4220 exprimujúceho *Vga(A)_{LC}-mEos2* z vektoru pRMC2 k LIN bola porovnávaná s kmeňom exprimujúcim *Vga(A)_{LC}* bez fluorescenčného proteínu naklonovaného taktiež do pRMC2. Ako negatívna kontrola bol použitý kmeň s prázdnyim vektorom pRMC2. Z výsledkov merania vyplýva, že fúzny proteín *Vga(A)_{LC}-mEos2* udeľuje rezistenciu k LIN. Aj keď jeho hodnota MIC bola 2 až 4x znížená než *Vga(A)_{LC}*, bol funkčný a pre ďalšie experimenty použiteľný. Kmeň s fúznym proteínom

Vga(A)_{LC}-GFP bol testovaný na citlivosť k LIN, ku CLI a k ERY. Jeho hladina udeľovania rezistencie bola len 2x znížená než Vga(A)_{LC}.

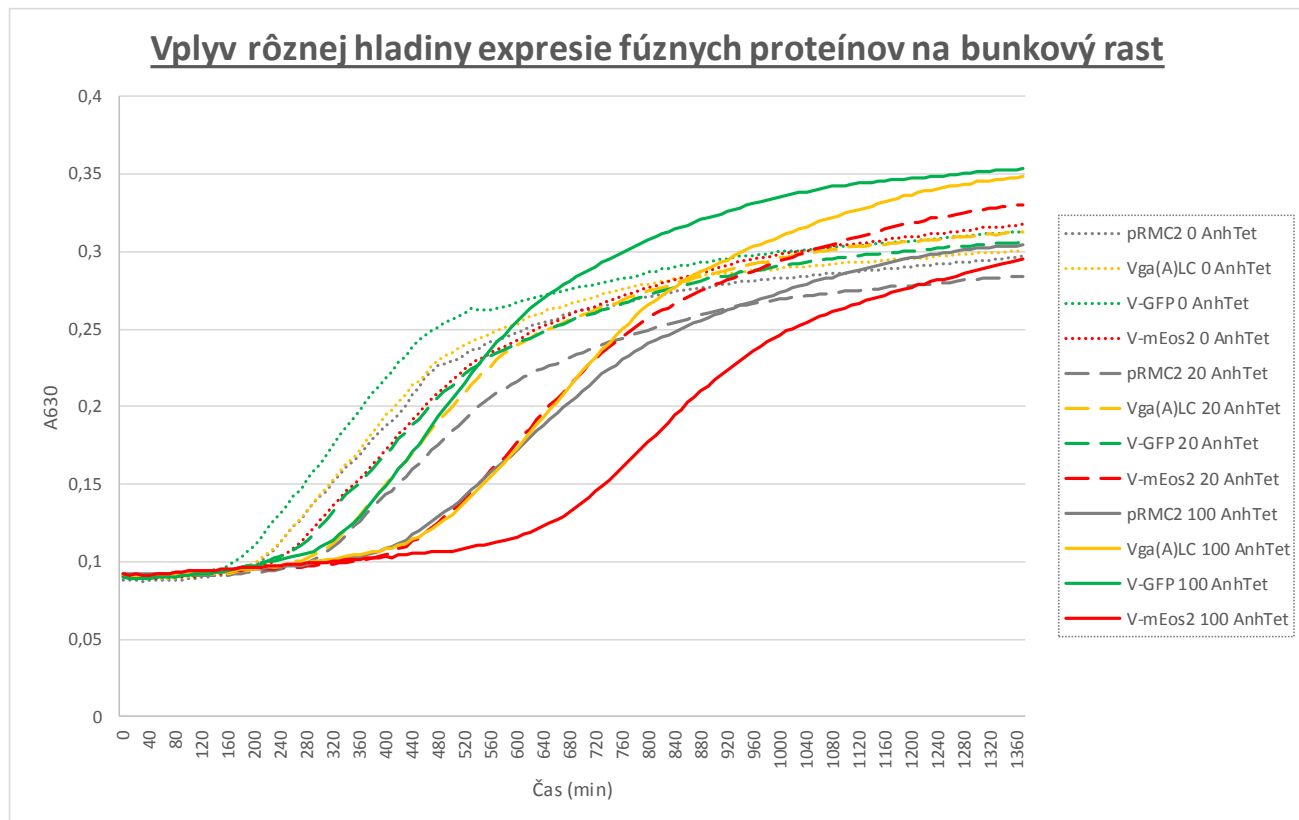
Tabuľka 15 Hodnoty MIC u *S. aureus* RN4220

S. aureus RN4220						
MIC (mg/l)	LIN		CLI		ERY	
AnhTet	-	+	-	+	-	+
pRMC2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Vga(A) _{LC}	4	32	0,5	2	0,5	0,5
Vga(A) _{LC} -GFP	2	16	0,5	2	0,5	0,5
Vga(A) _{LC} -mEos2	2	8-16				

4.1.2.2 Vplyv rôznej hladiny expresie fúzných proteínov na bunkový rast

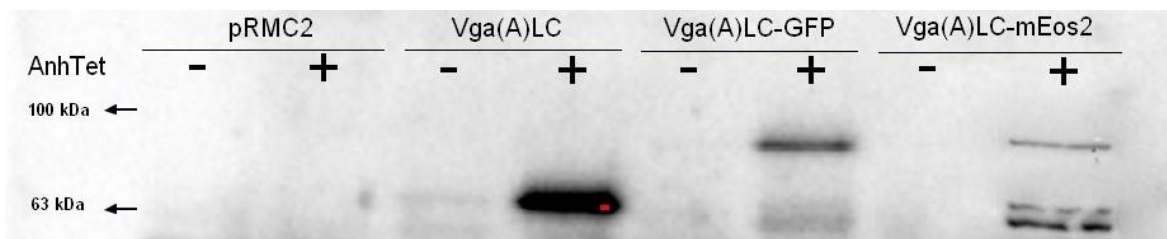
Sledovala som rast bunkovej kultúry kmeňa *S. aureus* RN4220 exprimujúci fúzny proteín Vga(A)_{LC}-mEos2 a *S. aureus* RN4220 exprimujúci fúzny proteín Vga(A)_{LC}-GFP v prítomnosti zvyšujúcej sa koncentrácie induktora (AnhTet 0-100 ng/ml). Rast kmeňov s fúznymi proteínmi bol porovnávaný s kmeňom exprimujúcim Vga(A)_{LC} bez fúzneho proteínu. Ako negatívna kontrola bol použitý *S. aureus* RN4220 s prázdny vektorom pRMC2. Testovanie bolo uskutočnené v dvoch paralelách pri koncentráciách AnhTet 0, 20, 100 ng/ml. Hodnoty OD pri 630 nm boli odčítané po dobu 24 hodín v 10 minútových intervaloch inkubácie v spektrofotometri pri teplote 37 °C (Graf 1). Z grafu je zrejmé, že zvyšujúca sa koncentrácia AnhTet predlžuje lag fázu rastu buniek i u kmeňa s prázdny vektorom.

Graf 1: negatívna kontrola- pRMC2; pozitívna kontrola- Vga(A)LC; fúzne proteíny V-GFP (Vga(A)_{LC}-GFP), V-mEos2 (Vga(A)_{LC}-mEos2).



4.1.2.3 Detekcia fúznych proteínov metódou Western blot

Pred samotnou fluorescenčnou mikroskopiou bolo nutné overiť, či sa proteíny mEos2 a GFP exprimujú v celej svojej dĺžke a či sú stabilné. Testovanými kmeňmi boli *S. aureus* RN4220: s prázdnyim vektorom pRMC2, s génmi kódujúcimi proteín Vga(A)_{LC}, Vga(A)_{LC}-GFP, Vga(A)_{LC}-mEos2. Experiment bol uskutočnený v prítomnosti i v neprítomnosti induktora AnhTet (100 ng/ml). Kultivácia buniek prebiehala podľa postupu uvedeného v kap. 3.2.1.2 až do dosiahnutia požadovanej OD₆₀₀ = 0.7- 0.8. Následne bol upravený objem nanesených vzoriek na rovnakú OD a bunky boli pripravené pre SDS - PAGE elektroforézu podľa kap. 3.2.7.2. a potom pre Western blot analýzu podľa kap. 3.2.7.4. Po detekcii na Obr. 30 vidíme, že sa oba fúzne proteíny Vga(A)_{LC}-GFP a Vga(A)_{LC}-mEos2 po indukciu AnhTet exprimovali, aj keď ich expresia bola približne o polovicu nižšia než expresia Vga(A)_{LC}. U Vga(A)_{LC}-mEos2 dochádzalo navyše k výraznej degradácii.



Obrázok 30 Porovnanie expresie fúzných proteínov Vga(A)_{LC}-GFP a Vga(A)_{LC}-mEos2 v kmeni *S. aureus* RN4220 s indukovaným promótorom pRMC2 (P_{xyl/tet}), pomocou Western blotu. Ako negatívna kontrola bol použitý prázdny vektor pRMC2. Ako pozitívna kontrola bol použitý Vga(A)_{LC}.

4.1.3 MIKROSKOPICKÉ POZOROVANIE BUNKOVEJ LOKALIZÁCIE FÚZNYCH PROTEÍNOV Vga(A)_{LC}-mEos2 A Vga(A)_{LC}-GFP V KMENI *S. AUREUS* RN4220

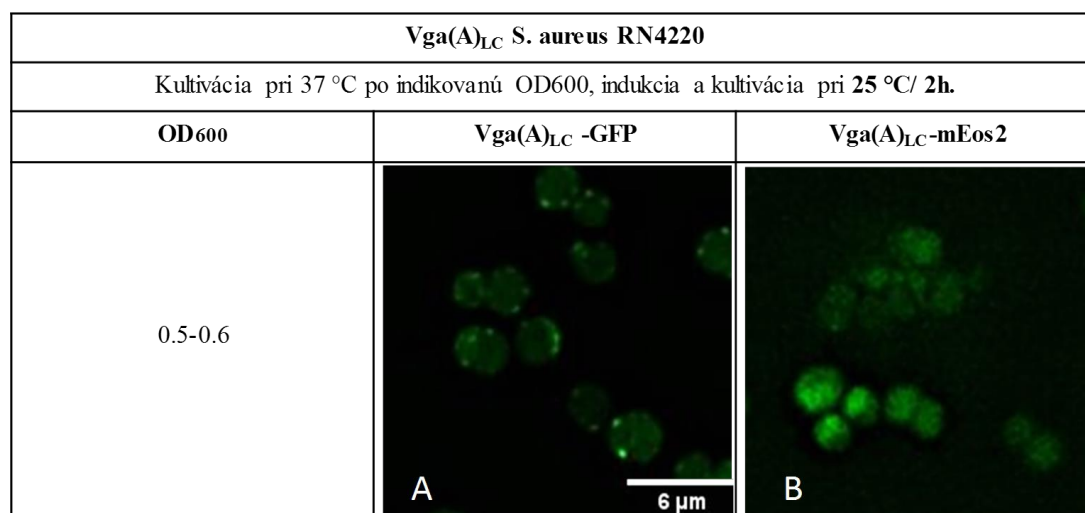
Po overení funkčnosti fúzných fluorescenčných proteínov Vga(A)_{LC}-mEos2 a Vga(A)_{LC}-GFP v kmeni *S. aureus* RN4220, boli podrobené mikroskopickému pozorovaniu. Bunky na mikroskopické pozorovanie boli kultivované podľa postupu uvedeného v kap. 3.2.1.2 a pripravené spôsobom uvedeným v kap. 3.2.8.3. Preparát pre mikroskopiu bol pripravený podľa kap. 3.2.8.4. Negatívnou kontrolou boli vzorky bez indukcie AnhTet.

Kultivácia buniek prebiehala až do požadovanej OD pri 600nm. Po jej dosiahnutí bola bunková kultúra zaindukovaná induktorom AnhTet v koncentrácii 100 ng/ml. Po indukcii boli bunkové kultúry následne presunuté na nižšiu kultivačnú teplotu 25 °C pri 200 RPM na dve hodiny pre expresiu proteínu. Pre expresiu proteínu bola použitá teplota, ktorá nie je ideálna pre rast buniek. Zníženú teplotu som použila z dôvodu snahy o zladenie podmienok mikroskopie a analýzy bunkových frakcií pomocou imodetekcie. Predtým bolo totiž v laboratóriu pozorované, že ARE proteíny majú tendenciu po rozbití buniek vypadávať, čo mohlo byť redukované práve expresiou pri zníženej teplote.

Z Panelu 1, ktorý porovnáva lokalizáciu fúzných proteínov Vga(A)_{LC}-GFP a Vga(A)_{LC}-mEos2 je zrejmé, že Vga(A)_{LC}-GFP bol za daných kultivačných podmienok lokalizovaný v blízkosti membrány v mnohopočetných ohniskách (Panel 1A), narozdiel od Vga(A)_{LC}-mEos2, ktorého lokalizácia bola čisto difúzna (Panel 1B). Ďalej bola overovaná schopnosť fotokonverzie fluorescenčného proteínu mEos2. Jednotlivé bunky boli označené (Panel 2A- modré šípky) a osvietené UV svetlom pri vlnovej dĺžke 405 nm, pri ktorej proteín fotokonvertoval (Panel 2B). Fotokonverzia fungovala, avšak fluorescenčný signál

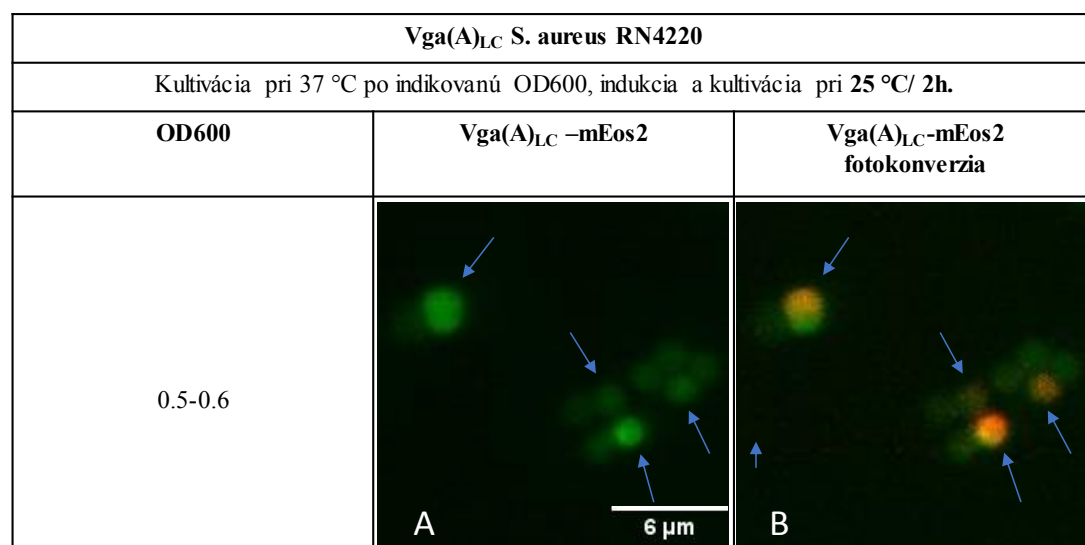
bol veľmi slabý. Na základe získaných výsledkov z testovania citlivostí, tento konštrukt fungoval 2-4x slabšie a dôvodom slabého fluorescenčného signálu bola pravdepodobne degradácia proteínu, ktorú odhalila WB analýza s tým, že hlavný signál mal rovnakú veľkosť ako Vga(A)_{LC}. To naznačuje, že bol pravdepodobne v bunkách fúzny proteín rozštiepený tak, že samotný Vga(A)_{LC} fungoval ako rezistentný proteín a difúzna distribúcia fluorescenčného signálu zodpovedala signálu mEos2. Ďalej sa tak behom práce pokračovalo len s fluorescenčným proteínom GFP.

Panel 1 Mikroskopické pozorovanie bunkovej lokalizácie fúznych proteínov Vga(A)_{LC}-mEos2 a Vga(A)_{LC}-GFP v kmeni *S. aureus* RN4220



Poznámka- Z dôvodu nízkeho signálu fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-mEos2 bola snímka získaná pri dlhšej expozícii 150 a s vyšším výkonom laseru (50 %).

Panel 2 Fotokonverzia Vga(A)_{LC}-mEos2 v kmeni *S. aureus* RN4220



Poznámka- Z dôvodu nízkeho signálu fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-mEos2 bola snímka získaná pri dlhšej expozícii a s vyšším výkonom laseru. Pre zelený kanál- exp. 150, laser 50 %, pre červený kanál- exp. 100, laser 30%. Modré šípky znázorňujú označené a osvietené bunky *S. aureus* RN4220 pri vlnovej dĺžke 405 nm.

4.1.4 MIKROSKOPICKÉ POZOROVANIE BUNKOVEJ LOKALIZÁCIE FÚZNEHO PROTEÍNU Vga(A)_{LC}-GFP V KMENI *S. AUREUS* RN4220

4.1.4.1 Vplyv kultivačnej teploty, rastovej fázy a doby expresie na bunkovú lokalizáciu Vga(A)_{LC}-GFP v RN4220

Mikroskopicky boli sledované zmeny v intracelulárnej distribúcii Vga(A)_{LC}-GFP za rôznych kultivačných podmienok a v rôznych rastových fázach. Najprv bolo testované či sa mení lokalizácia pokiaľ je expresia proteínu indukovaná v rôznych rastových fázach. Kultivačná teplota bola 25 °C, tak ako v predošlom experimente. Potom bolo testované ako sa lokalizácia zmení pri teplote 37 °C, ktorá je optimálna pre rast buniek a funkciu proteínu. V tomto prípade boli testované dve varianty, v prvej bola expresia indukovaná na začiatku kultivácie a v druhom prípade expresia prebiehala len 1 hodinu a bola indukovaná v priebehu kultivácie po dosiahnutí požadovanej OD₆₀₀.

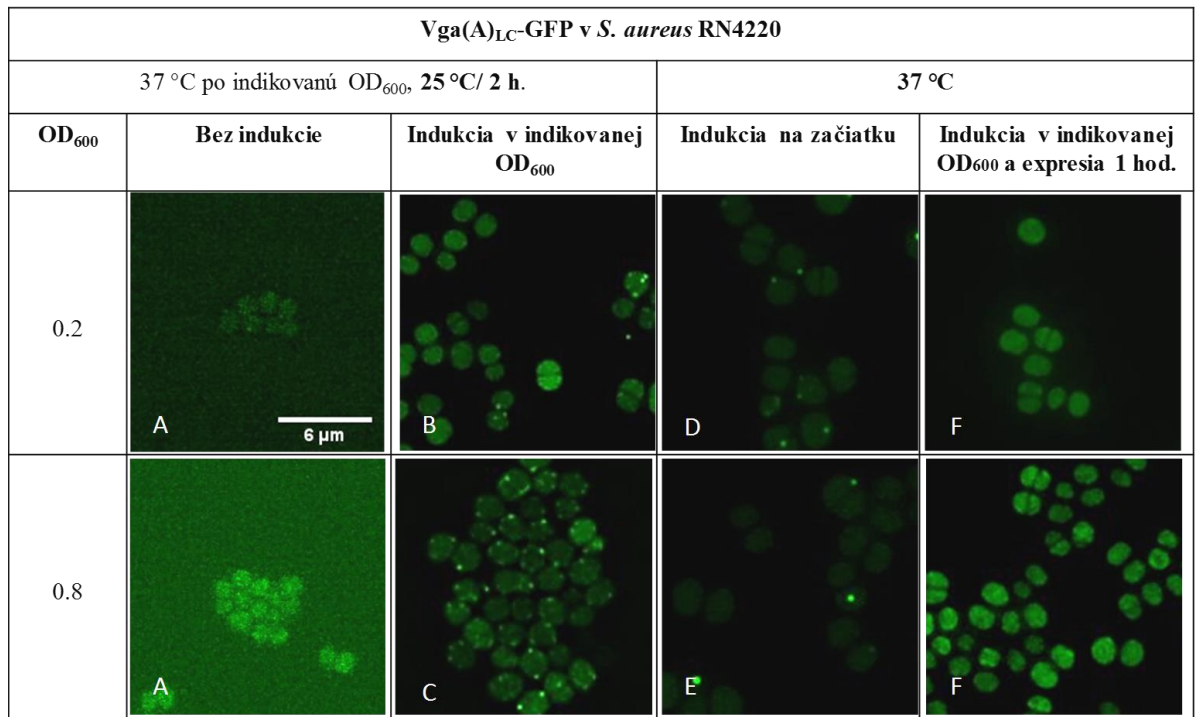
Po kultivácii pri teplote 25 °C, v závislosti od rastu buniek pri OD₆₀₀= 0.2, neboli zatial pozorované v bunkách výrazné mnohpočetné ohniská proteínu v blízkosti membrány. V bunkách však bolo vidieť syntézu septa, čo naznačovalo, že sú bunky na začiatku exponencionálnej fázy rastu (Panel 3B). Mnohpočetné ohniská boli pozorované až pri OD₆₀₀= 0.8, kedy sa so zvyšujúcim počtom buniek, zvýšil aj počet buniek s mnohpočetnými ohniskami proteínu blízko membrány (Panel 3C).

Naopak po kultivácii buniek pri teplote 37 °C a expresie indukovanej na začiatku kultivácie, bol proteín Vga(A)_{LC}-GFP lokalizovaný čiastočne difúzne, pričom sa tu objavovalo ohnisko s intenzívnou fluorescenciou, ktoré bolo v bunke vždy len jedno a zdalo sa byť opäť v blízkosti membrány (Panel 3D). Navyše boli pozorované aj zmeny v početnosti buniek s ohniskovou lokalizáciou proteínu. Pri OD₆₀₀= 0.8 došlo k úbytku buniek s ohniskom proteínu v blízkosti membrány (Panel 3E) (Graf 2). V prípade, že dĺžka expresie fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP po dosiahnutí nižšie uvedenej OD₆₀₀ prebiehala len po dobu jednej hodiny, nebolo pozorované takmer žiadne ohnisko proteínu v blízkosti membrány (Panel 3F). V prípade negatívnej kontroly (kultúry bez indukcie) bol signál veľmi nízky (Panel 3A). Rozdiel v spôsobe lokalizácie proteínu v bunke medzi dvomi rôznymi teplotnými podmienkami je detailnejšie zobrazený s vyšším rozlíšením prostredníctvom SIM (kap. 3.2.8.5) v Paneli 4. Na základe tohto experimentu môžeme tvrdiť, že lokalizácia proteínu Vga(A)_{LC} je závislá nielen od teplotných podmienok, času

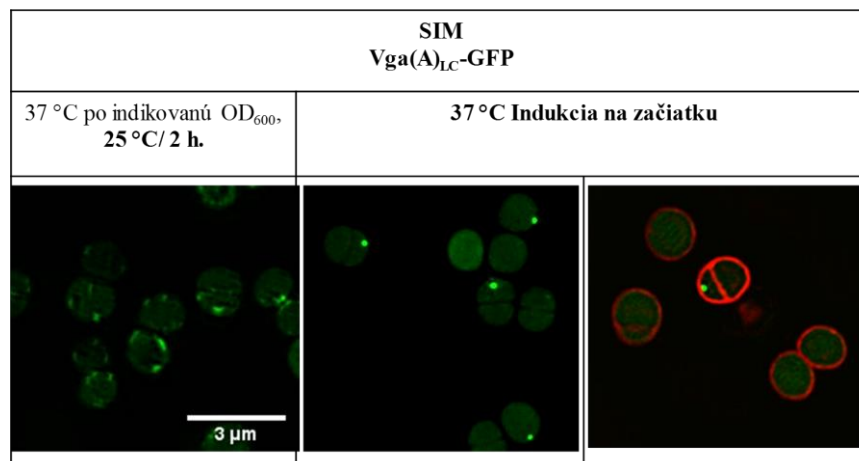
indukcie, ale aj od rastovej fázy a od toho, v ktorej rastovej fáze a ako dlho je proteín exprimovaný.

Nakoľko boli vidieť rozdiely v spôsobe distribúcie fúzneho proteínu v bunkách pri nižšej teplote a nie je možné ani testovať aktivitu proteínu pri takto nízkej teplote (pri 25 °C bunky nerastú). Bude teda istejšie pre ďalšie pozorovania používať teplotu, pri ktorej je možné kontrolovať aktivitu proteínu a, ktorých kultivačné podmienky nastávajú a sú rovnaké ako pri testovaní citlivosti.

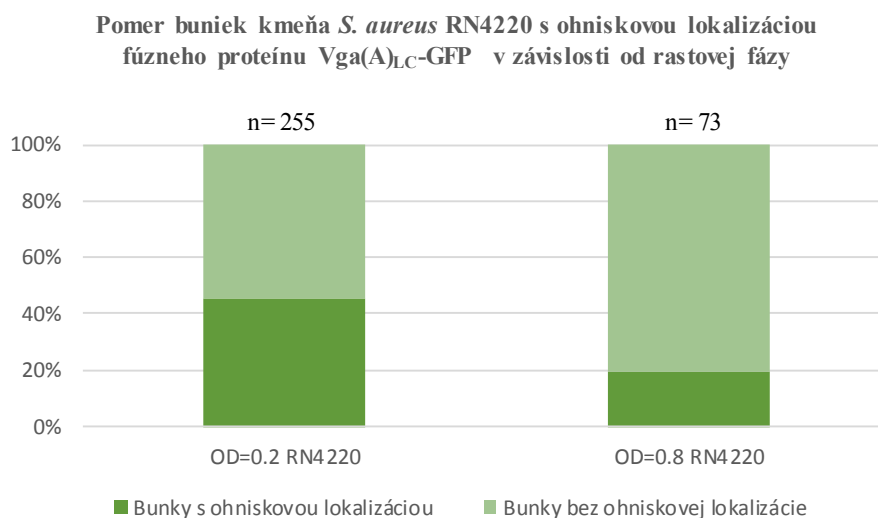
Panel 3 Vplyv kultivačnej teploty, rastovej fázy a doby expresie na bunkovú lokalizáciu Vga(A)_{LC}-GFP v RN4220: Snímky predstavujúce Z- stack maximálnych intenzít. (D,E,F).



Panel 4 Detailnejšie zobrazenie vplyvu teplotných podmienok na subcelulárnu lokalizáciu Vga(A)_{LC}-GFP v *S. aureus*: červenou značená bunková membrána fluorescenčným teikopláninom (FL-TEI).



Graf 2



4.1.5 Vga(A)_{LC}-GFP V KMENI *S. AUREUS* 8325-4 A *S. AUREUS* JE2

4.1.5.1 Testovanie citlivosti k antimikrobiálnym látkam u kmeňa *S. aureus* 8325-4 a *S. aureus* JE2

Lokalizácia fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP bola pozorovaná aj v derivátoch klinických izolátov *S. aureus*, ktoré máme v laboratóriu k dispozícii tiež. Narozdiel od laboratórneho kmeňa RN4220 sú tieto klinické deriváty prirodzenejším hostiteľom, pretože sú menej geneticky modifikované. Pre túto prácu boli zvolené dva kmene, *S. aureus* 8325-4 a *S. aureus* JE2.

U týchto kmeňov bola stanovená MIC mikrodilučnou metódou (kap. 3.2.6.1) v prítomnosti a v neprítomnosti induktora AnhTet (100 ng/ml). Negatívnou kontrolou bol prázdny vektor pRMC2 a pozitívnu kontrolou bol Vga(A)_{LC} bez fúzneho proteínu. Meranie prebehlo v dvoch paralelách. Rozdiel v miere udeľovania rezistencie medzi týmito troma kmeňmi z testovania citlivosti k antibiotikám mikrodilučnou metódou bolo, že Vga(A)_{LC}-GFP funguje v kmeňoch 8325-4 a JE2 o niečo lepšie než v kmeni RN4220 (Tab. 16 a Tab. 17). Výraznejšie rozdiely medzi týmito troma kmeňmi, sú však z testovania citlivosti k antibiotikám metódou DDT (3.2.6.2). Na Obr. 31 je u kmeňa RN4220 viditeľný náznak inhibičnej zóny okolo disku s CLI (nie je to úplná inhibičná zóna, pretože vo vnútri bol pozorovaný rast jednotlivých kolónií). To u kmeňov JE2 ani 8325-4 zrejme nie je, a u ktorého Vga(A)_{LC} je porovnateľný s Vga(A)_{LC}-GFP. Negatívnou kontrolou bol prázdny vektor pRMC2.

Okrem fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP bola testovaná citlivosť k antibiotikám mikrodilučnou metódou aj u ATP deficientnej mutaty Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP v kmeni *S. aureus* JE2 (Tab. 17). Mutácia spôsobuje neschopnosť hydrolyzovať ATP a v súlade s očakávaním neudeľovala rezistenciu. ATP deficientná mutanta bola v tejto práci tiež podrobená mikroskopickému pozorovaniu.

Tabuľka 16 Hodnoty MIC u *S. aureus* 8325-4

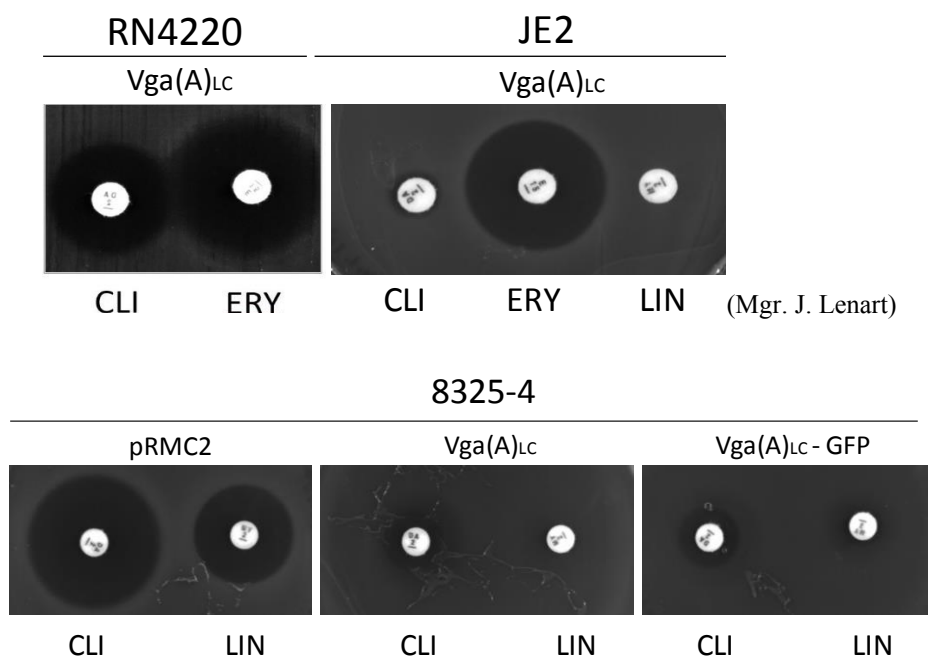
<i>S. aureus</i> 8325-4 (RN4220 ¹)						
MIC (mg/l)	LIN		CLI		ERY	
AnhTet	-	+	-	+	-	+
pRMC2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Vga(A) _{LC}	1	32	0,5	4 (2)	0,5	0,5
Vga(A) _{LC} -GFP	1	16	0,5	4 (2)	0,5	0,5

¹ hodnota MIC pre RN4220 pokiaľ sa líši

Tabuľka 17 Hodnoty MIC u *S. aureus* JE2

<i>S. aureus</i> JE2 (RN4220 ¹)						
MIC (mg/l)	LIN		CLI		ERY	
AnhTet	-	+	-	+	-	+
pRMC2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Vga(A) _{LC}	1	32	0,5	4 (2)	0,5	0,5
Vga(A) _{LC} -GFP	1	16	0,5	4 (2)	0,5	0,5
Vga(A) _{LC} EQ1+2-GFP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

¹ hodnota MIC pre RN4220 pokiaľ sa líši

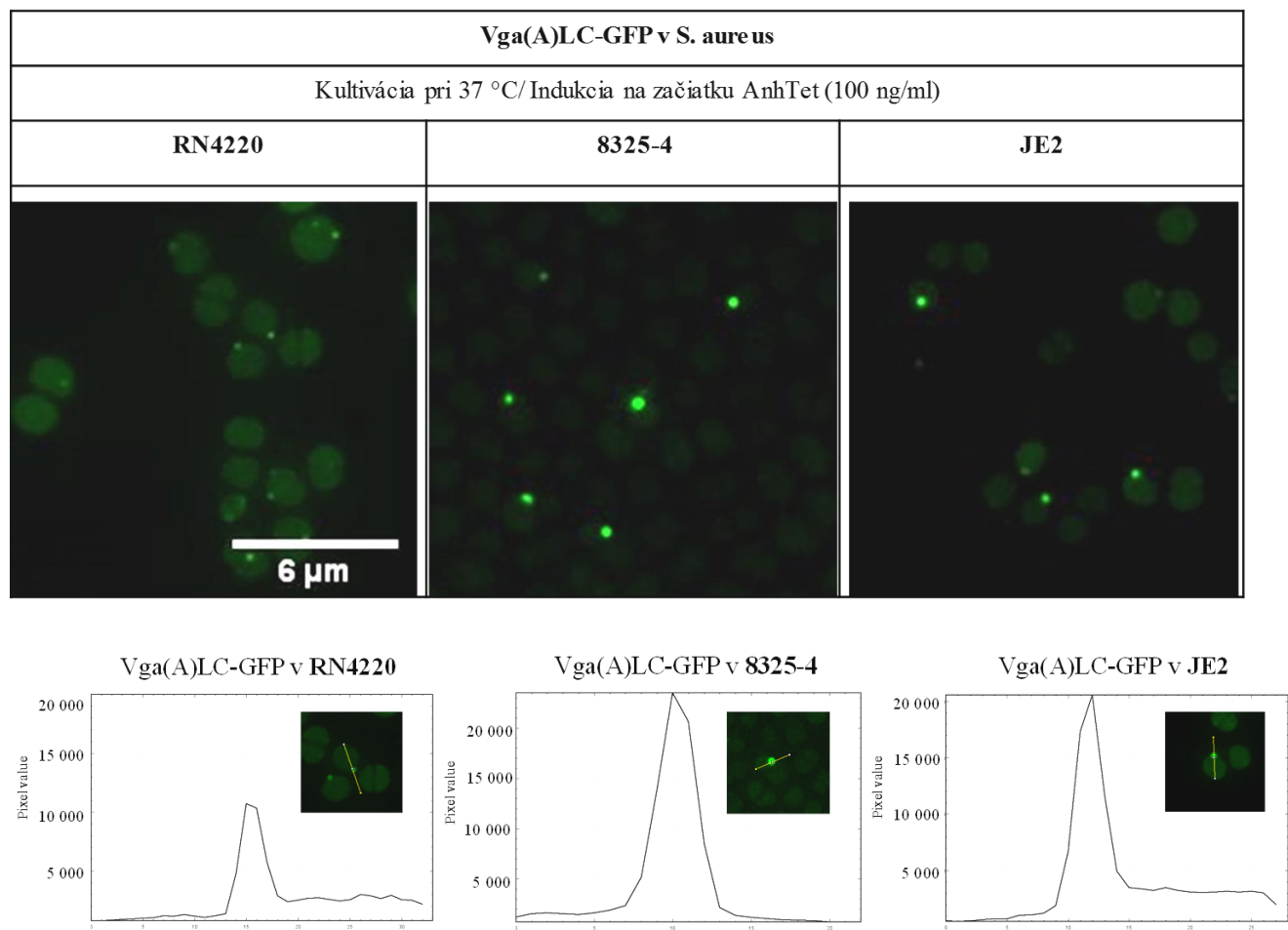


Obrázok 31 Porovnanie citlivosti DDT u troch rôznych kmeňov *S. aureus*. Na obrázku je zrejmy náznak inhibičnej zóny okolo disku s CLI u kmeňa RN4220 exprimujúceho Vga(A)_{LC}. Aj napriek tomu, že hodnoty MIC sú takmer porovnateľné pre všetky tri kmene, tento náznak inhibičnej zóny nie je pre JE2 ani 8325-4 zrejmy. (pRMC2- prázdny vektor, negatívna kontrola).

4.1.5.2 Mikroskopické pozorovanie a vplyv antibiotika na bunkovú lokalizáciu rezistentného proteínu Vga(A)_{LC}-GFP v kmeni *S. aureus* 8325-4 a *S. aureus* JE2

Pretože sa zdá, že proteín Vga(A)_{LC} funguje v kmeňoch 8325-4 a JE2 lepšie, bol fúzny proteín Vga(A)_{LC}-GFP v týchto kmeňoch podrobený mikroskopickému pozorovaniu. V porovnaní s RN4220 bolo vidieť inú distribúciu proteínu, ktorá je u kmeňa 8325-4 a JE2 menej difúzna a viac sústredená v ohnisku v blízkosti membrány (Panel 5), na čo poukazuje aj vyššia intenzita fluorescence v ohnisku v kmeni 8325-4 a JE2 (Obr. 32). Lepšia funkčnosť proteínu v týchto kmeňoch sa tak potvrdila aj mikroskopickým pozorovaním.

Panel 5 Vplyv rôznych kmeňov *S. aureus* (RN4220, 8325-4 a JE2) na bunkovú lokalizáciu fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP: Snímky predstavujú Z- stack maximálnych intenzít.



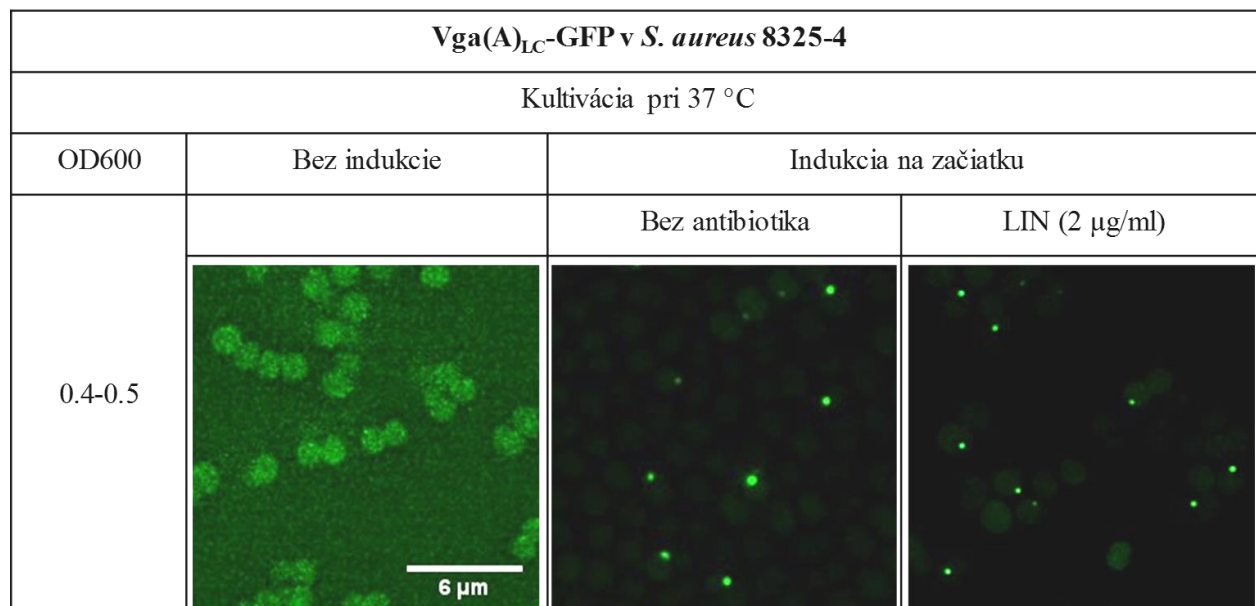
Obrázok 32 Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v ohnisku v rámci rôznych kmeňov *S. aureus*: RN4220, 8325-4 a JE2.

Testovanie vplyvu antibiotika na bunkovú lokalizáciu fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP bol tak ďalej pozorovaný už len u kmeňov *S. aureus* 8325-4 a JE2. Bunky boli kultivované podľa kap. 3.2.1.2 v prítomnosti LIN (2 µg/ml) od začiatku kultivácie. Indukcia génu pre expresiu proteínu bola uskutočnená tiež na začiatku kultivácie.

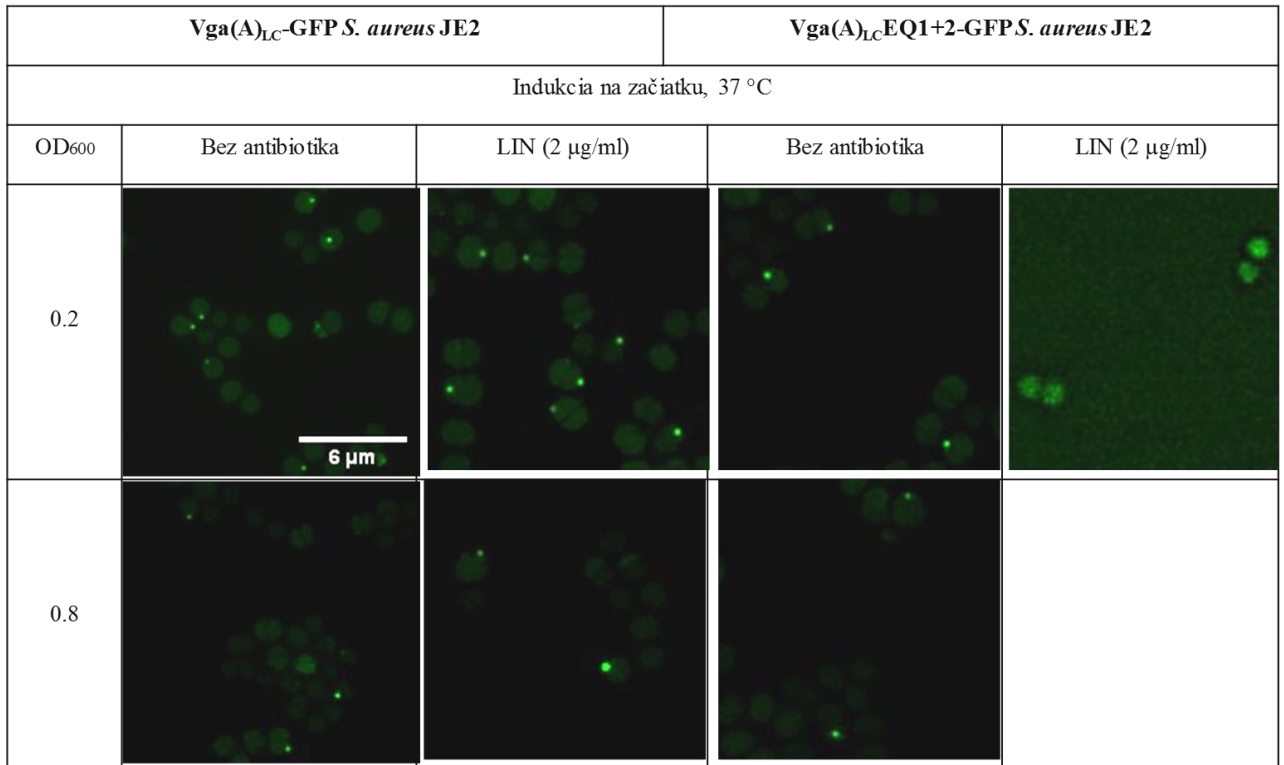
Lokalizácia proteínu sa v prítomnosti antibiotika (LIN) nezmenila tak ako vo frekvencii buniek s ohniskami na začiatku a na konci exponencionálnej fázy (Panel 6, 7), tak ani v intenzite fluoresenčného signálu v ohnisku (Obr. 33). Rovnako tak neboli pozorované žiadne rozdiely v lokalizácii mutantného kmeňa exprimujúcim Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP bez antibiotika. V prítomnosti antibiotika bol rast i expresia Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP značne inhibované, bunky nedorástli do OD₆₀₀= 0.8 a expresia fúzneho proteínu, ktorý sa vyskytoval len difúzne bola slabá z dôvodu, že dvojité mutanta neudeľuje rezistenciu.

V kmeni *S. aureus* 8325-4 a JE2 v neskoršej fáze rastu, na základe analýzy, opäť došlo k úbytku buniek s ohniskovou lokalizáciou proteínu v blízkosti membrány (Graf 3).

Panel 6 Vplyv antibiotika na subcelulárnu lokalizáciu Vga(A)_{LC}-GFP v *S. aureus* 8325-4: Snímky predstavujú Z- stack maximálnych intenzít.

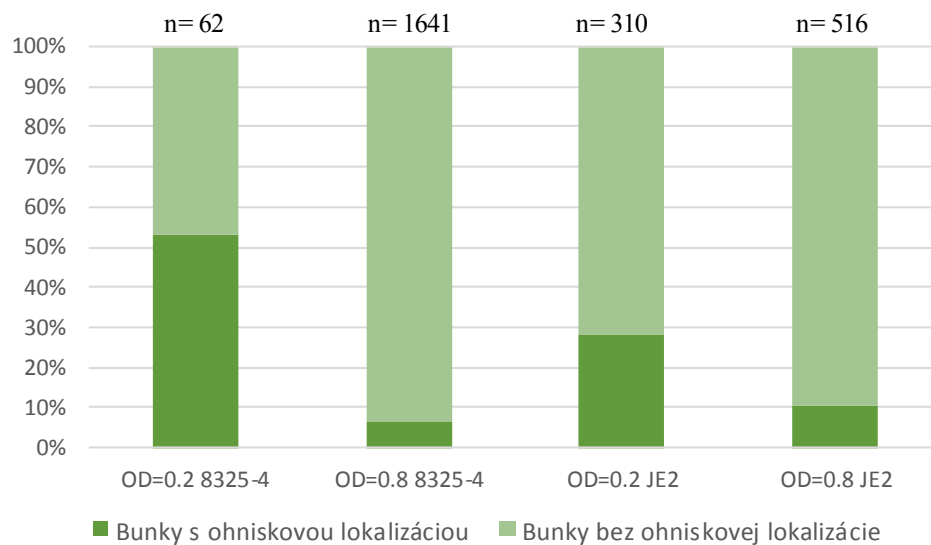


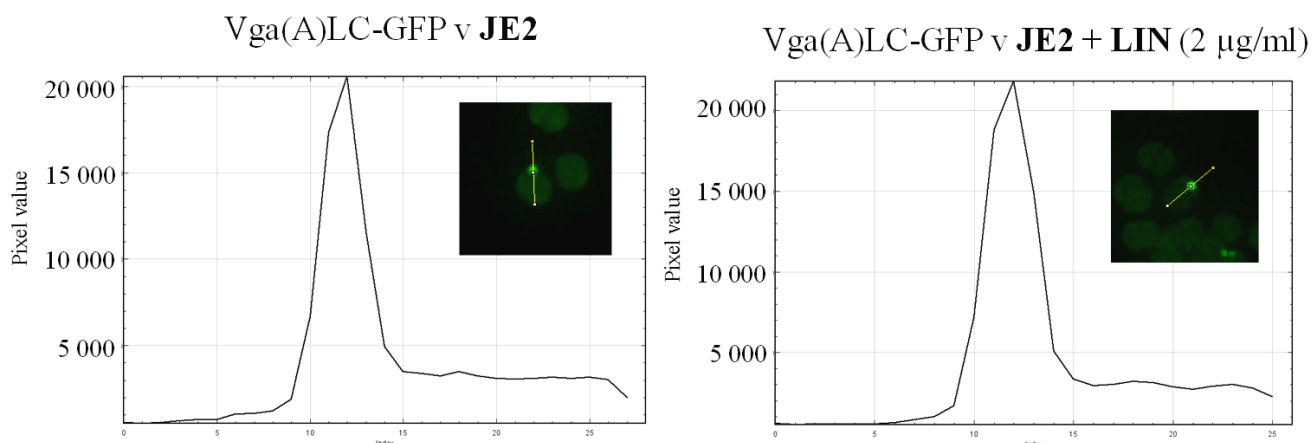
Panel 7 Vplyv antibiotika na subcelulárnu lokalizáciu Vga(A)_{LC}-GFP a Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP v *S. aureus* JE2: Snímky predstavujú Z- stack maximálnych intenzít.



Graf 3

Pomer buniek kmeňa *S. aureus* 8325-4 a JE2 s ohniskovou lokalizáciou fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP v závislosti od rastovej fázy





Obrázok 33 Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu Vga(A)_{LC} GFP v JE2 v ohnisku v závislosti od antibiotika.

4.1.5.3 Subcelulárna lokalizácia Vga(A)_{LC} a Vga(A)_{LC}-GFP proteínu pomocou centrifugácie a následnej imunodetekcie

Pre overenie mikroskopicky pozorovanej subcelulárnej lokalizácie fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP bola prevedená subcelulárna lokalizácia Vga(A)_{LC} a Vga(A)_{LC}-GFP po frakcionácii buniek centrifugáciou (kap. 3.2.7.5) prostredníctvom imunodetekcie (kap. 3.2.7.4). Ako kontroly boli použité klinický izolát 140 UL *S. haemolyticus* (Novotná & Janata 2006) a derivát klinického izolátu JE2 *S. aureus*, obe exprimujúce Vga(A)_{LC}.

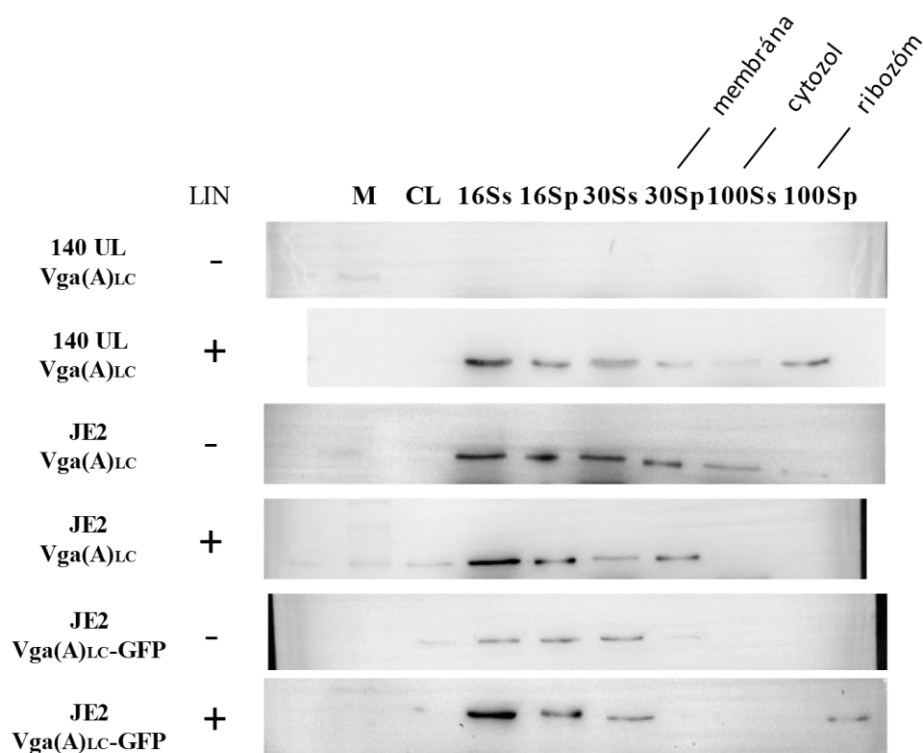
Bakteriálne kmene *S. aureus* boli kultivované podľa kap. 3.2.1.2. Kmeň *S. haemolyticus* bol kultivovaný podľa kap. 3.2.1.3. Jednotlivé bunkové kultúry boli kultivované v prítomnosti a v neprítomnosti LIN (4 µg/ml). Indukcia bola uskutočnená od začiatku kultivácie, v prípade 140 UL linkomycínom a v prípade JE2 anhydratetracyklínom. Získané bunkové lyzáty sa podrobili SDS- PAGE analýze podľa kap. 3.2.7.2 a Western blot analýze podľa kap. 3.2.7.4.

Zo získaných frakcií (Obr. 34) sú v rámci pozorovania lokalizácie rezistentného proteínu Vga(A)_{LC} najpodstatnejšie frakcie 30Sp (predstavujúcu membránovú frakciu), 100Ss (predstavujúcu cytozolicú frakciu) a 100Sp (predstavujúcu ribozomálnu frakciu). Z detekcie expresie proteínu metódou Western blot je zrejmé, že v prípade klinického izolátu 140 UL, ktorý predstavuje prirodzený kmeň s natívnym promótorom, v neprítomnosti LIN proteín Vga(A)_{LC} nebol indukovaný. Naopak v prítomnosti LIN bol proteín indukovaný a detegovaný v nižšej miere v membránovej frakcii, ale vo väčšej miere v ribozomálnej

frakcii. U kmeňa *S. aureus* JE2 exprimujúceho Vga(A)_{LC} v neprítomnosti LIN bol Vga(A)_{LC} opäť viac sústredený v membránovej frakcii, i keď slabá expresia proteínu bola detegovaná aj v ribozomálnej frakcii. V prítomnosti LIN sa zdá, že bol proteín len v membránovej frakcii, v ribozomálnej frakcii detegovaný vôbec nebol. U kmeňa *S. aureus* JE2 exprimujúceho Vga(A)_{LC}-GFP bol fúzny proteín v neprítomnosti LIN slabo detegovaný iba v membránovej frakcii a v prítomnosti antibiotika bol viac sústredený v ribozomálnej frakcii a veľmi slabo v membránovej frakcii.

Z výsledkov je tak zrejmé, že Vga(A)_{LC}-GFP sa vyskytoval v membránovej frakcii menej než Vga(A)_{LC} a v ribozomálnej frakcii bol proteín detegovaný len u 140 UL a u Vga(A)_{LC}-GFP v oboch prípadoch v prítomnosti antibiotík. Detekcia proteínu v ribozomálnej frakcii je tak v rozpore s pozorovaním Chesneau (2005), ale koreluje s tým, že funguje na ribozóme (Su *et al.* 2018).

S mikroskopickým pozorovaním uvedené výsledky korelujú len v prípade, že boli bunky kultivované bez LIN, kedy je proteín Vga(A)_{LC} pozorovaný blízko membrány a detegovaný v membránovej frakcii. V prítomnosti LIN sa korelácia vylučuje, keďže mikroskopicky narozdiel od imunodetekcie, proteín lokalizáciu nemení a je stále lokalizovaný v blízkosti membrány.



Obrázok 34 Subcelulárna lokalizácia Vga(A)_{LC} a Vga(A)_{LC}-GFP. Vysvetlivky: LIN- linkomycín, M- marker, CL- celkový lyzát, 16Sp- bunkový debris.

4.2 SUBCELULÁRNA LOKALIZÁCIA ARE Msr(A) PROTEÍNU PROSTREDNÍCTVOM FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE

V rámci tejto práce bol mikroskopicky pozorovaný okrem Vga(A)_{LC}, aj klinicky významný ARE ABC-F proteín- Msr(A). Msr(A) je rovnako prítomný u stafylokokov ako Vga(A)_{LC}. Narozdiel od Vga(A)_{LC} udeľuje rezistenciu k Mac a SgB a je druhou najčastejšou rezistenčnou determinantou udeľujúcou rezistenciu k ERY. Msr(A) proteín bol pre fluorescenčnú mikroskopiu fúzovaný s červeným fluorescenčným proteínom- eqFP650 a jeho lokalizácia bola pozorovaná v kmeni *S. aureus* 8325-4. Fluorescenčný proteín eqFP650 tzv. far-red je veľmi významný pri *in vivo* zobrazovaní. Je charakteristický jasnou infračervenou fluorescenciou, rýchlou maturáciou a vysokou fotostabilitou (Luker *et al.* 2015).

Konštrukt Msr(A)-eqFP650 bol pripravený dr. Vladimírom Vimbergom, ktorý na základe testovania citlivosti k antibiotikám zistil, že tento fúzny proteín nie je funkčný pri teplote 37 °C, ale pri nižšej teplote 30 °C (Tab. 18). Všetky experimenty boli teda vykonané pri tejto teplote.

Tabuľka 18 Hodnoty MIC u *S. aureus* 8325-4

S. aureus 8325-4				
MIC (mg/l)	ERY			
	37 °C		30 °C	
AnhTet (100 ng/ml)	-	+	-	+
Msr(A)	2	32	4	16-32
Msr(A)-eqFP650	0,5	0,5	0,5	8
Msr(A)EQ1+2	0,5	0,5	1	0,5
Msr(A)EQ1+2-eqFP650	0,5	0,5	0,5	kmeň nerástol

Mgr. V. Vimberg, Ph.D.

4.2.1 MIKROSKOPICKÉ POZOROVANIE BUNKOVEJ LOKALIZÁCIE REZISTENTNÉHO PROTEÍNU Msr(A) V KMENI *S. AUREUS* 8325-4

Mikroskopicky bola pozorovaná lokalizácia Msr(A)-eqFP650 v prítomnosti a v neprítomnosti antibiotika- ERY (2 $\mu\text{g/ml}$) v kultivačnom médiu a lokalizácia ATP deficientnej mutanty Msr(A)EQ1+2-eqFP650. Kultivačné podmienky pre mikroskopické pozorovanie Msr(A)-eqFP650 boli rovnaké ako v prípade Vga(A)_{LC}-GFP (kap. 3.2.1.2), líšili sa iba v teplote, ktorá u Msr(A) bola vykonaná pri 30 °C. Kultivácia prebiehala až do OD₆₀₀= 0.4- 0.5.

Kultivačné podmienky pre kmeň s hydrolyticky deficientnou mutantou EQ1+2 boli uskutočnené podľa postupu uvedeného v kap. 3.2.1.2. Nakoľko ale z výsledkov testovania citlivosti kmeň s Msr(A)EQ1+2-eqFP650 nerástol po indukcii expresie od začiatku kultivácie pri teplote 30 °C, bunky sa nechali najskôr narásť pri teplote 37 °C až do OD₆₀₀= 0.4-0.5. Po jej dosiahnutí bola následne bunková kultúra zaindukovaná induktorom AnhTet. Po indukcii boli bunkové kultúry následne presunuté na nižšiu kultivačnú teplotu 30 °C pri 200 RPM na dve hodiny pre expresiu proteínu.

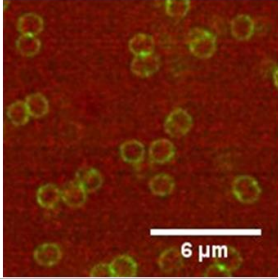
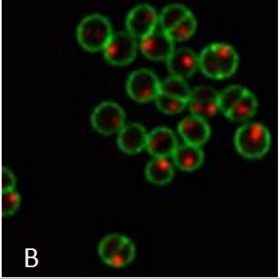
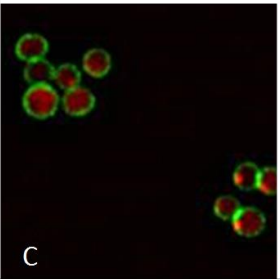
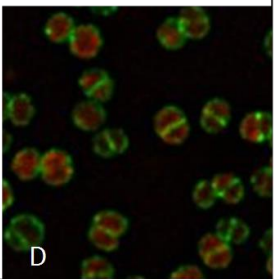
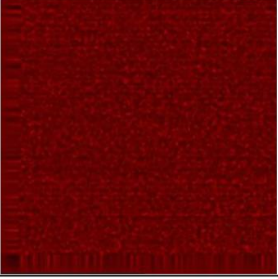
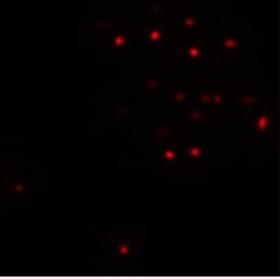
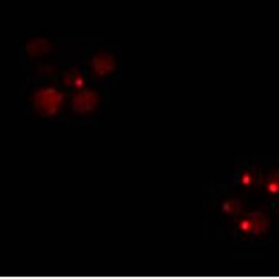
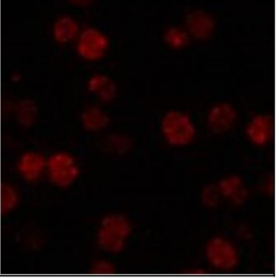
Narozdiel od Vga(A)_{LC}-GFP bolo v prípade Msr(A)-eqFP650 možné sledovať výrazný rozdiel vplyvu antibiotika na lokalizáciu proteínu. V neprítomnosti ERY bol proteín lokalizovaný v ohnisku blízko membrány (Panel 8B), pozorované ohnisko bolo v celej bunke len v jednom počte (Obr. 35). V prítomnosti ERY (2 $\mu\text{g/ml}$), sa proteín rozptýlil smerom dovnútra bunky (Panel 8C). Negatívnou kontrolou bola neindukovaná kultúra Msr(A)-eqFP650 *S. aureus* 8325-4, teda bez prítomnosti AnhTet (Panel 8A).

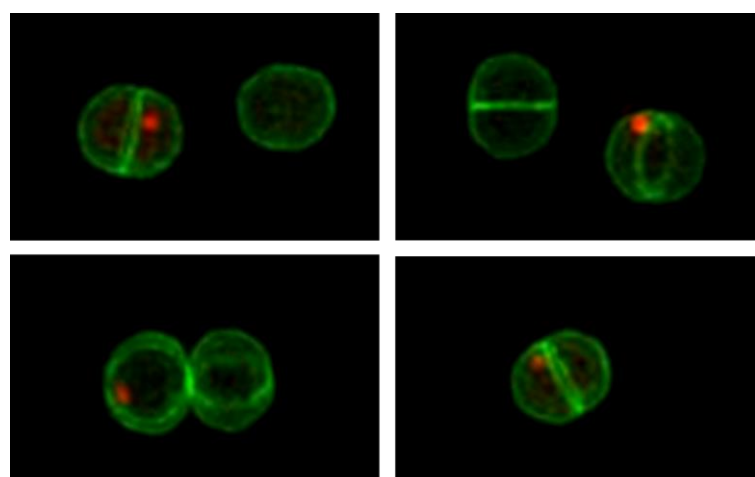
Lokalizácia ATP deficientnej mutanty Msr(A)EQ1+2-eqFP650 sa narozdiel od lokalizácie Vga(A)_{LC} EQ1+2-GFP, zmenila tiež a to difúzne dovnútra bunky (Panel 8D).

Vplyv ERY na lokalizáciu Msr(A)-eqFP650 bola sledovaná aj po ukončení kultivácie a teda i expresie. Antibiotikum bolo pridané do FluoroBrite média k bunkám a kultúra bola inkubovaná po dobu jednej hodiny pri izbovej teplote. Výsledkom pokusu bolo, že aj post-kultivačne po pridaní ERY do média došlo k difúzii proteínu do bunky (Panel 9C). Narozdiel od bunkovej kultúry, ku ktorej antibiotikum nebolo pridané (Panel 9A) a kultúry inkubovanej s CLI (Panel 9B) (Msr(A) neudeluje ku CLI rezistenciu), bola v oboch prípadoch lokalizácia proteínu v ohnisku blízko membrány. Vplyv ERY na bunkovú lokalizáciu fúzneho proteínu Msr(A)-eqFP650 je detailnejšie zobrazený s vyšším rozlíšením

prostredníctvom SIM (kap. 3.2.8.5) v Paneli 10. Intenzita fluorescence v ohnisku a v bunke v prítomnosti i v neprítomnosti ERY je zobrazená na Obr. 36.

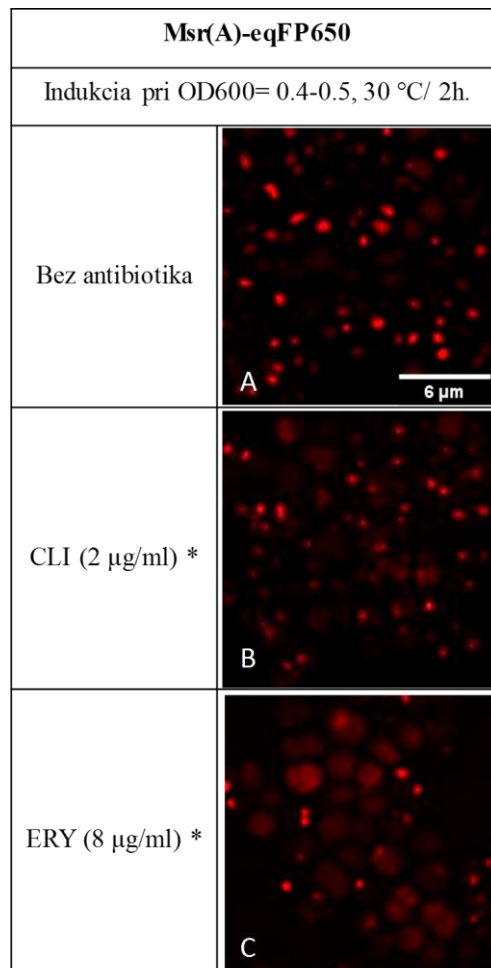
Panel 8 Vplyv antibiotika na subcelulárnu lokalizáciu Msr(A)-eqFP650: Zelene značená bunková stena s fluorescenčným vankomycínom (FL-VAN). Snímky predstavujú Z- stack maximálnych intenzít.

Msr(A)-eqFP650 v <i>S. aureus</i> 8325-4			Msr(A)EQ1+2-eqFP650 v <i>S. aureus</i> 8325-4	
37 °C po indikovanú OD600, 30 °C/2 h.				
OD ₆₀₀	Bez indukcie	Indukcia v indikovanej OD600		
		-	ERY (2 µg/ml)	AnhTet (100 ng/ml)
0.4-0.5				
				

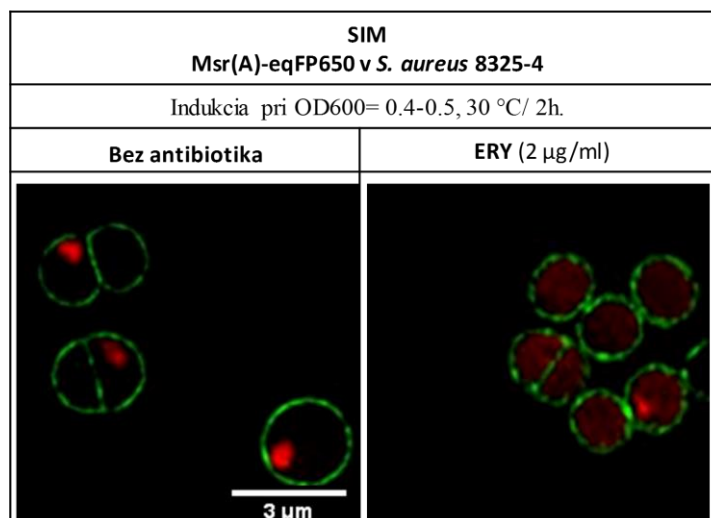


Obrázok 35 3D zobrazenie bunky s Msr(A)-eqFP650 lokalizovaným v ohnisku blízko membrány len v jednom počte. Zelene značená bunková stena FL-VAN (Mgr. G. Balíková- Novotná, Ph.D.).

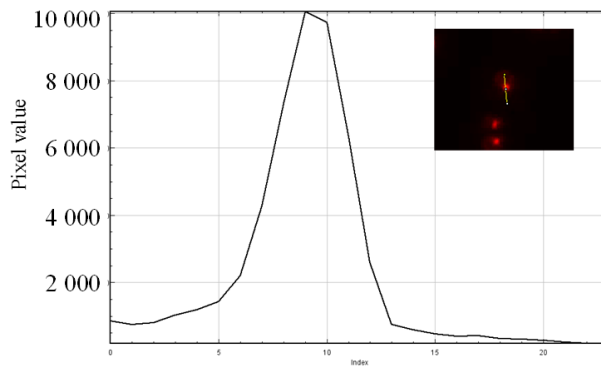
Panel 9 Antibiotikum pridané po kultivácii. * Antibiotikum bolo pridané do FluoroBrite média a inkubovalo sa 1 hodinu pri izbovej teplote. Snímky predstavujú Z- stack maximálnych intenzít.



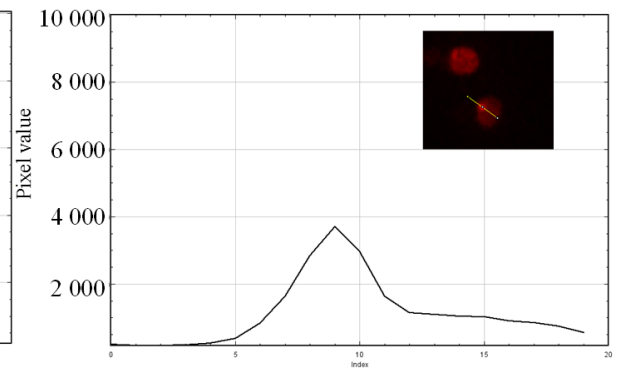
Panel 10 Detailnejšie zobrazenie vplyvu antibiotika na subcelulárnu lokalizáciu Msr(A)-eqFP650 v *S. aureus* 8325-4: zelene značená bunková stena s FL-VAN. Snímky predstavujú Z- stack maximálnych intenzít.



Msr(A)-eqFP650 v **8325-4**



Msr(A)- eqFP650 v **8325-4 + ERY (2 µg/ml)**



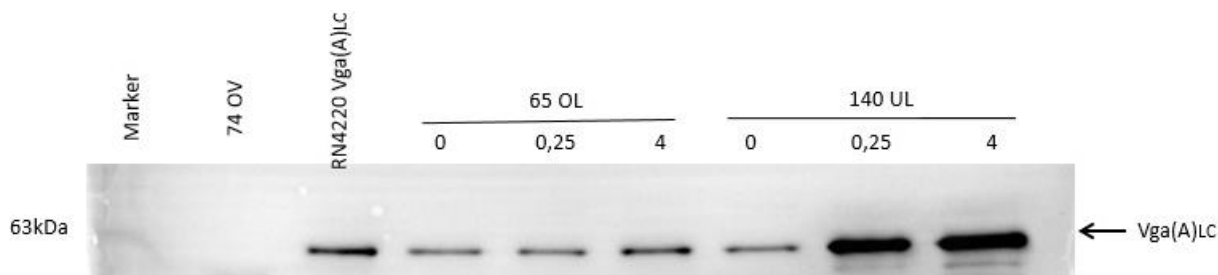
Obrázok 36 Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v ohnisku Msr(A)-eqFP650 8325-4 v závislosti od antibiotika.

4.3. *IN VIVO* EXPRESIA ARE PROTEÍNU Vga(A)_{LC} V KLINICKÝCH IZOLÁTOCH *STAPHYLOCOCCUS HAEMOLYTICUS*

Ako je v literárnom prehľade uvedené, blízkymi homológmi Vga(A) sú *lmo0919* z *Listeria monocytogenes* a *vmlR* prítomný u *B. subtilis* (Obr. 10, kap. 2.3). U *lmo0919* a *vmlR* sa zistilo, že ich regulácia je kontrolovaná riboregulátormi, ktoré spúšťajú expresiu génu v závislosti od prítomnosti špecifického antibiotika naviazaného na ribozóme mechanizmom označovaným ako transkripčná atenuácia. Pre Vga(A) bola prítomnosť atenuátoru iba predikovaná (Dar *et al.* 2016).

Zaujímalo ma tak, či indukcia expresie *vga(A)_{LC}* pozorovaná u kmeňa 140 UL (Obr. 34, kap. 4.1.5.3) je skutočne sprostredkovaná atenuáciou. Preto bola porovnávaná expresia Vga(A)_{LC} v závislosti od prítomnosti LIN u klinických izolátov *S. haemolyticus* 65 OL a 140 UL. *S. haemolyticus* 65 OL je kmeň, ktorý vedľa *vga(A)_{LC}* nesie taktiež rezistenčný gén *ermC*, ktorý je konštitutívne exprimovaný. V dôsledku toho sú v tomto kmeni ribozómy dimetylované v A2058 pozícii v 23S rRNA, čoho výsledkom je to, že tieto ribozómy neviažu LIN. Ako negatívna kontrola bol použitý klinický izolát *S. haemolyticus* 74 OV, ktorý neobsahuje Vga(A)_{LC} kódujúci gén a pozitívnu kontrolou bol *S. aureus* RN4220 exprimujúci Vga(A)_{LC}. Kultivácia buniek *S. haemolyticus* prebiehala podľa postupu uvedeného v kap. 3.2.1.3. Bunky boli zaindukované od začiatku kultivácie rôznou koncentráciou LIN (0; 0,25; 4 µg/ ml) a kultivované až do OD₆₀₀= 0.7-1. Bunky *S. aureus* RN4220 boli kultivované podľa postupu uvedeného v kap. 3.2.1.2, zaindukované AnhTet (100 ng/ ml). Po kultivácii bola upravená OD kultúr pre rovnomerné množstvo nanášania vzoriek a potom boli pripravené bunkové lyzáty pre SDS-PAGE analýzu (kap. 3.2.7.2). Po SDS-PAGE bola uskutočnená WB analýza (kap. 3.2.7.4).

Z výsledku (Obr. 37) vyplýva, že schopnosť indukcie skutočne aj v prípade Vga(A)_{LC} závisí od väzby antibiotika na ribozóm a nie od priamej väzby antibiotika na riboregulátor. V kmeni 65 OL *S. haemolyticus*, exprimujúcim ErmC, v ktorom je ribozóm rezistentný k LIN (LIN neviaže) z dôvodu metylácie A2058 v 23S rRNA, regulátor *vga(A)_{LC}* nereaguje na prítomnosť zvyšujúcej sa koncentrácie LIN. Naopak v prípade kmeňa 140 UL, ktorý obsahuje len rezistenčný gén *vga(A)_{LC}*, expresia proteínu reaguje na prítomnosť LIN naviazaného na ribozóm, na čo poukazuje zosilnejúca sa expresia pri zvyšujúcej sa koncentrácii LIN.

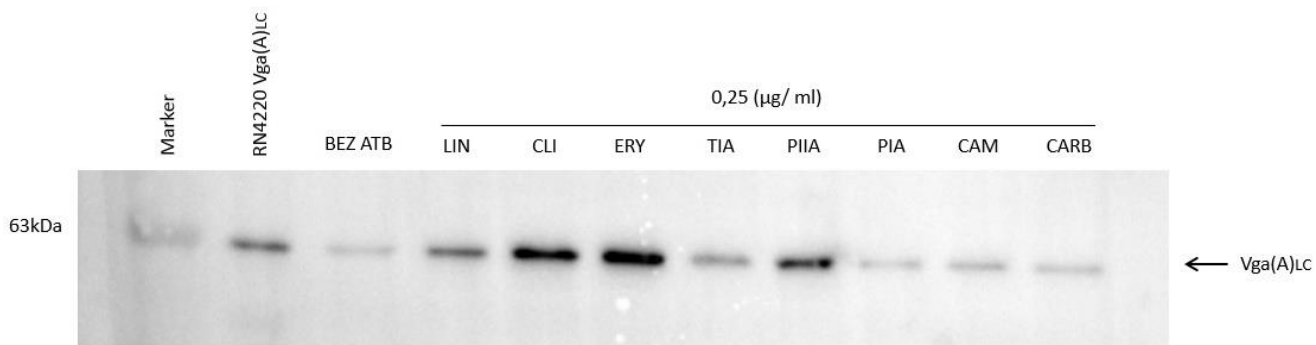


Obrázok 37 *In vivo* expresia Vga(A)_{LC} proteínu v klinických izolátoch *S. haemolyticus*. 65 OL s konštitutívne exprimujúcim *erm(C)* génom a 140 UL, ktoré boli zaindukované LIN pri 0; 0,25 a 4 µg/ml. Negatívna kontrola- 74 OV; klinický izolát, ktorý neobsahuje Vga(A)_{LC} kódujúci gén. Pozitívna kontrola- RN220 Vga(A)_{LC}; kmeň *S. aureus*, ktorý exprimuje gén kódujúci Vga(A)_{LC}.

Z komparatívnej analýzy 5' UTR sekvencie sa tiež ukázalo, že regulátory prítomné *lmo0919*, *vmlR* a *vga(A)LC* obsahujú tri aminokyseliny dlhý uORF. U ktorého sa predpokladá, že určuje špecifitu indukcie. U *lmo0919* je totiž expresia indukovaná iba LIN, nie však ERY, patriacim medzi Mac.

Zaujímalo ma, aké antibiotiká indukujú expresiu *vga(A)LC*. Bola sledovaná expresia Vga(A)_{LC} po indukcii rôznymi antibiotikami v subinhibičnej koncentrácii (0,25 µg/ml) pri teplote 37 °C. Kultivácia buniek prebiehala podľa kap. 3.2.1.3. Testovanými antibiotikami boli LIN, CLI, ERY, TIA, PIIA, PIA a karbencilín (CARB).

Výsledkom je, (Obr. 38) že expresia Vga(A)_{LC} je indukovaná linkozamidovými antibiotikami (LIN, CLI), streptogramínovými antibiotikami typu A (PIIA) a mierna expresia je aj pri indukcii TIA. Všetky spomínané antibiotiká sa viažu do ribozómu v blízkosti PTC, až s výnimkou ERY, ktorý ako už bolo uvedené sa viaže do ribozómu v mieste PET. Je teda prekvapením, že Vga(A)_{LC} je indukovaný aj erytromycínom.



Obrázok 38 Expresia Vga(A)_{LC} u *S. haemolyticus* po indukcii rôznymi antibiotikami v subinhibičnej koncentrácii (0,25 µg/ml). Pozitívna kontrola- RN220 Vga(A)_{LC}; kmeň *S. aureus*, ktorý exprimuje gén kódujúci Vga(A)_{LC}.

5 DISKUSIA

Predložená diplomová práca sa venuje otázke bunkovej lokalizácie ARE proteínov. Prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie bola sledovaná subcelulárna lokalizácia rezistentných fúznych proteínov Vga(A)_{LC}-mEos2, Vga(A)_{LC}-GFP a Msr(A)-eqFP650 v živých bunkách kmeňa *S. aureus*. Fluorescenčné proteíny boli zvolené z dôvodu, že pre stafylokoky nebol doposiaľ vyvinutý protokol pre úspešnú imunodetekciu intracelulárnych proteínov fluorescenčne značenými protilátkami.

Vga(A)_{LC} proteín bol pozorovaný v konštruktoch s dvomi rôznymi fluorescenčnými proteínmi, GFP a mEos2, v rámci ich porovnávania na možný vplyv lokalizácie Vga(A)_{LC} proteínu. Napriek tomu, že z výsledkov testovania funkčnosti u kmeňa exprimujúcim fúzny proteín Vga(A)_{LC}-mEos2, bola jeho rezistentná aktivita (8-16 µg/ml) o dva až štyrikrát nižšia než u WT kmeňa exprimujúcim Vga(A)_{LC} (16-32 µg/ml), zostávalo faktom, že rezistenciu k LIN udeľoval a bol funkčný. Avšak po WB analýze sa odhalilo, že proteín výrazne degraduje. Mikroskopicky pozorovaný slabý fluorescenčný signál Vga(A)_{LC}-mEos2 sa prisúdil k pozorovanej degradácii proteínu a jeho čisto difúzna lokalizácia pravdepodobne odpovedala fluorescenčnému signálu mEos2 bez Vga(A)_{LC}, a z toho dôvodu sa s ním v experimentálnej časti tejto práce ďalej nepokračovalo.

Z mikroskopického pozorovania bolo za rôznych kultivačných podmienok zistené, že lokalizácia proteínu je závislá od teplotných podmienok, rastovej fázy a od toho v ktorej rastovej fáze a ako dlho je proteín exprimovaný. Indukcia expresie proteínu a kultivácia buniek prebiehala pri dvoch teplotných podmienkach, 25 °C a 37 °C. Pri teplote 25 °C bol fúzny proteín Vga(A)_{LC}-GFP mnohopočetne distribuovaný v ohniskách v blízkosti membrány. Čo sa týka výskytu mnohopočetných ohnisk, tie boli výrazne pozorované pri OD₆₀₀= 0.8. Pri OD₆₀₀= 0.2 neboli výrazne pozorovateľné, za to však bolo možné pozorovať prítomnosť vznikajúcich sept. Čo potvrdzuje, že táto fáza rastu buniek predstavovala počiatočnú exponencionálnu fázu rastu.

Spôsob lokalizácie fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP sa však zmenil, keď boli bunky vystavené len teplote pri 37 °C a indukované od začiatku ich kultivácie. Lokalizácia fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP bola za týchto kultivačných podmienok čiastočne difúzna, ale s výskytom ohniska s intenzívnou fluorescenciou, ktoré bolo v bunke vždy len v jednom počte pravdepodobne na membráne, čo dosvedčuje WB analýza. Ohnisko bolo niekedy aj

v blízkosti septa. V početnosti buniek s ohniskom proteínu v rámci rastovej fázy bola situácia opačná než pri 25 °C, kedy v tomto prípade dlhšou kultiváciou ubúdalo buniek s ohniskom proteínu v blízkosti membrány. Pri expresii po dobu jednej hodiny dokonca nebolo vidieť takmer žiadne ohniská v bunkách. Čo značí, že pri dlhšej expresii sa proteínu pravdepodobne produkuje veľa, čím tak vznikajú pozorované ohniská.

Kultivačná teplota 25 °C pre expresiu proteínu bola zvolená z dôvodu snahy o zladenie podmienok mikroskopie a analýzy bunkových frakcií pomocou imodetekcie. Predtým bolo v laboratóriu pozorované, že ARE proteíny majú tendenciu po rozbití buniek vypadávať, čo mohlo byť redukované práve expresiou pri zníženej teplote. Keďže spôsob lokalizácie pri nižšej teplote bol iný než pri 37 °C a zároveň funkčnosť proteínu Vga(A)_{LC} pri tejto teplote nie je známa, nakoľko bunky pri takto nízkej teplote nerastú. Dôvodom mnohopočetnej distribúcie proteínu v ohniskách v blízkosti membrány, ktorá viac narastala v neskoršej fáze rastu buniek, môže byť, že 25 °C nie je úplne optimálnou fyziologickou teplotou a došlo k nadprodukcii proteínu v nerozpustnej forme a produkcii početných inklúzných teliesok v blízkosti membrány. Naopak, pri teplote 37 °C je za týchto kultivačných podmienok aktivita proteínu známa, nakoľko odrážajú podmienky pri ktorých sa stanovuje aj citlivosť k antibiotikám. Z tohto dôvodu sa tak v práci pokračovalo v kultivácii len pri teplote 37 °C.

Podstata pozorovaného ohniska len v jednom počte na bunku, ktoré sa vyskytuje aj v prípade sledovania lokalizácie Msr(A)-eqFP650 nie je známa. Vyskytuje sa v oboch prípadoch v blízkosti membrány. Fakt, že boli bunky mikroskopicky sledované metódou štruktúrovaného osvetlenia (SIM), pri ktorej je potrebná postrekonštrukcia obrázkov, ktorá je spojená s rizikom vzniku artefaktov, môže vyvolávať otázku, či sa nejedná o akýsi artefakt, avšak ohniská boli pozorované aj v režime wide field, pri ktorom je vznik artefaktov veľmi málo pravdepodobný. Ponúka sa vysvetlenie, že ohniská, predstavujú inklúzne telieska (nerozpustné zhluky rekombinantného proteínu, väčšinou charakteristické biologickou neaktivitou), ktoré sa tvoria napr. pri nesprávnom skladaní proteínov z dôvodu ich nadmernej či rýchlej produkcie. Avšak zvyšujúce sa dôkazy naznačujú, že prítomné agregáty v baktériách nemusia nevyhnutne znamenať stratu biologickej aktivity. Skupina Garcia- Fruitos (2005) ukázala, že agregáty sú aspoň čiastočne tvorené biologicky aktívnymi polypeptidmi. Iná štúdia, ktorá sa zaoberá proteínovými agregátmi (Lindner et al. 2008) zobrazila výsledky z mikroskopického pozorovania kolokalizácie malého heat-shock proteínu IbpA (inclusion body protein A) s proteínovými agregátmi vzniknuté pod vplyvom

určitého stresu u buniek *E. coli*. Proteín IbpA, ktorý lokalizuje nesprávne zložené proteíny, *S. aureus* nemá. Je ale možné, že má iné proteíny s podobnou funkciou. Vzniknuté proteínové agregáty vyzerajú nielen rovnako, ale sú aj umiestnené v bunke podobným spôsobom ako aj nami študované ARE proteíny. Pretože pohyb ohniska sa zriedka pozoruje, umiestnenie agregátov v bunke po rozdelení je určené ich umiestnením v materskej bunke. Umiestnenie proteínového agregátu bolo v $\frac{1}{4}$ alebo $\frac{3}{4}$, v strede bunky v blízkosti vznikajúceho septa (čo som spozorovala tiež), alebo v bunke prítomné vôbec neboli, keďže po rozdelení materskej bunky sa proteínový agregát môže nachádzať len v jednej z dcérskych buniek. S časom sa tak počet agregátov prítomných v bunkách v nasledujúcich generáciách znižuje, čo bolo v našom prípade pozorovateľné tiež. Je tak potrebné zistiť či sa jedná o inklúzne telieska alebo nie. Preukázať to či sa jedná o agregát je možné jednoducho prostredníctvom fázového kontrastu. Aj keď v priebehu tejto práce boli bunky fázovým kontrastom pozorované, nebolo možné z dôvodu nízkeho signálu pozorované štruktúry kolokalizovať s fluorescenčnými ohniskami. V prípade potvrdenia, že by išlo o proteínové agregáty, by sa následne izolovali a pomocou hmotnostnej spektrometrie detegovali, či ide o agregát len študovaných proteínov, alebo nie. Myslím si, ale že aj keby to boli inklúzne telieska, stále to môže mať v bunke nejakú funkciu. ABC-F proteíny so svojou štruktúrou sa môžu ťažko vyskytovať voľne v roztoku, pretože z nich vyčnieva linker. Je teda možné, že pokiaľ nie sú na ribozómoch, tak sa vyskytujú v týchto komplexoch. To je ale potrebné potvrdiť ďalšími experimentami.

Lokalizácia fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP je závislá aj od typu kmeňa. Lepšia funkčnosť proteínu v derivátoch klinických izolátov 8325-4 a JE2 bola preukázaná aj testovaním citlivosti k antibiotikám. Zatiaľ čo z testovania mikrodilučnou metódou boli hodnoty MIC u Vga(A)_{LC}-GFP v kmeňoch 8325-4 a JE2 iba o niečo lepšie než v kmeni RN4220. Výraznejšie rozdiely medzi týmito tromi kmeňmi boli z testovania citlivosti DDT. Kedy v kmeni RN4220 exprimujúcim Vga(A)_{LC} bol pozorovateľný náznak inhibičnej zóny okolo antibiotického disku s CLI. Vo vnútri inhibičnej zóny bol pozorovaný slabý rast bakteriálnych kolónií, ktorý pre kmene JE2 ani 8325-4 exprimujúcim Vga(A)_{LC}-GFP zrejmy nebol. Tieto bakteriálne kolónie však neboli známkou rezistentných mutant ani zmesnej kultúry (nepublikované údaje, J. Lenart). Vysvetlením tohto rozdielu je, že zhoršený rast okolo disku s antibiotikami sa pri testovaní citlivosti v bujóne nemôže prejaviť, pretože schopnejšie bunky pravdepodobne prerastú tie, ktoré rastú menej a rozdiely tak nie sú viditeľné. Lepšia funkčnosť proteínu v derivátoch klinických izolátov sa preukázala aj

mikroskopicky. Lokalizácia Vga(A)_{LC}-GFP v porovnaní s laboratórnym kmeňom RN4220, bola lepšie sústredená v blízkosti membrány (v ohnisku) a menej difúzne, na čo poukázala aj zvýšená intenzita fluorescencie sústredenej práve v ohnisku. Čo by mohlo znamenať, že prítomnosť ohniska blízko membrány má nejakú funkčnú súvislosť. Frekvencia výskytu ohniska v bunkách aj v týchto kmeňoch bola pri dlhšej kultivácii nižšia než na začiatku kultivácie. Tieto zistenia tak naznačujú, že pozorované ohnisko v bunke nepredstavuje inklúzne telieska vznikajúce v dôsledku neprirodzenej nadprodukcie proteínu z tetO promótoru, pri ktorej by zároveň pravdepodobne nebol pozorovaný ani nárast intenzity fluorescencie spojený s lepšiu aktivitou proteínu.

In vivo lokalizácia proteínu, ale nekorešponduje výsledkom po frakcionácii buniek centrifugáciou a následnou imunodetekciou. V neprítomnosti antibiotika linkomycínu bol Vga(A)_{LC}-GFP v kmeni *S. aureus* JE2 detegovaný v membránovej frakcii, v prítomnosti linkomycínu bol detegovaný v ribozomálnej frakcii. Čo znamená, že s mikroskopickým pozorovaním tieto výsledky korelujú len v prípade, že boli bunky kultivované bez antibiotika, kedy je fúzny proteín Vga(A)_{LC}-GFP blízko membrány. V prítomnosti antibiotika sa korelácia vylučuje, nakoľko mikroskopicky proteín lokalizáciu nemení a je stále v ohnisku blízko membrány. Jedným z vysvetlení môže byť (nakoľko ARE proteíny majú tendenciu vypadávať), že proteín vypadáva behom rôznych centrifugácií a kontaminuje tak pelety jednotlivých frakcií. V ribozomálnej frakcii ale bol okrem Vga(A)_{LC}-GFP v prítomnosti LIN detegovaný aj Vga(A)_{LC} exprimovaný v klinickom izoláte *S. haemolyticus* 140 UL. Táto detekcia proteínov v ribozomálnej frakcii je v rozpore s pozorovaním Chesneau (2005), ktorý detegoval Vga(A) proteín v klinickom izoláte *S. epidermidis* iba v membránovej frakcii, nie však v ribozomálnej. Rozdiel by mohlo vysvetlovať pozorovanie v prítomnosti antibiotika, ktoré bolo prítomné v pufri v priebehu frakcionácie, čo u Chesneau nebolo. Musím však zdôrazniť, že frakcionácia buniek a následná imunodetekcia proteínu Vga(A)_{LC} bola uskutočnená len raz z dôvodu nedostatku času a pre potvrdenie pozorovaných výsledkov je nutné experiment zopakovať.

V rámci tejto diplomovej práce boli mikroskopicky pozorované aj kmene exprimujúce mutované proteíny Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP a Msr(A)EQ1+2-eqFP650, ktoré sú deficientné v ATP-ázovovej aktivite. Tieto mutované proteíny nie sú schopné hydrolyzovať ATP. Na základe testovania citlivosti na antibiotiká mikrodilučnou metódou, Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP ani Msr(A)EQ1+2-eqFP650 nevykazovali rezistentnú aktivitu. Pre Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP bola hodnota MIC 0,5 µg/ml a v prípade kmeňa exprimujúceho EQ

mutantu Msr(A)EQ1+2-eqFP650, mal na rast buniek inhibičný účinok. Z tohto dôvodu bol kmeň s fúznym proteínom Msr(A)EQ1+2-eqFP650 najskôr kultivovaný pri teplote 37 °C, aby bunky narástli a po dosiahnutí požadovanej OD₆₀₀ bola expresia indukovaná a bunky pokračovali v kultivácii pri teplote 30 °C. Za takýchto podmienok bunky rástli, aj keď veľmi pomaly. Z mikroskopického pozorovania, v prípade dvojitej EQ mutanty Vga(A)_{LC}-GFP, neschopnosť hydrolyzy ATP nevedie opäť k žiadnym zmenám v jeho lokalizácii v bunke. Naopak u dvojitej EQ mutanty Msr(A)-eqFP650, ATPázová aktivita má vplyv na lokalizáciu fúzneho proteínu, ktorého fluorescenčný signál je difúzny v bunke. Predpokladá sa, že to odpovedá pevnej väzbe proteínu na ribozómoch, ktorá bola preukázaná u ABC-F ATP-deficientnej EQ1+2 EttA (Boel *et al.* 2014). V štúdií (Nunez-Samudio & Chesneau 2012) tiež sledovali lokalizáciu fúzneho proteínu prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie. Išlo o príbuzný ARE Msr(D) proteín. Proteín mali pripravený v konštrukte na C terminálnom konci, GFP-Msr(D) a na N terminálnom konci Msr(D)-GFP. V ich prípade narozdiel od nášho Vga(A)_{LC}-GFP, ktorý je funkčný na N konci, bol funkčný naopak proteín GFP-Msr(D) konštrukt, ktorého lokalizácia bola difúzna. Nefunkčný Msr(D)-GFP bol podľa ich vyjadrenia pre bunku toxický a prejavoval sa fokálnou lokalizáciou na membráne. Tieto výsledky pozorovania sú v úplnom kontraste s našim pozorovaním proteínov Vga(A)_{LC} a Msr(A). Avšak vysvetlením môže byť, že v ich prípade bol proteín pôvodne z streptokoka, ale pozorovaný v *E. coli*, takže v Gram negatívnej namiesto Gram pozitívnej baktérie. Pozorovanie teda nemusí odpovedať reálnej situácii, i keď bol proteín v *E. coli* čiastočne aktívny.

Sledovala som aj vplyv antibiotika ako na lokalizáciu fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP, tak aj na Msr(A)-eqFP650. Lokalizácia Vga(A)_{LC}-GFP sa v prítomnosti linkomycínu nijak výrazne nemenila a proteín bol umiestnený rovnako v ohnisku blízko membrány ako aj v neprítomnosti antibiotika. Odlišným výsledkom je ale pozorovanie vplyvu antibiotika na lokalizáciu fúzneho proteínu Msr(A)-eqFP650. V neprítomnosti antibiotika bol proteín lokalizovaný v ohnisku blízko membrány ako aj Vga(A)_{LC}-GFP, ale v prítomnosti antibiotika bola jeho lokalizácia v bunke difúzna, čo môže znamenať, že je proteín v cytozole alebo pravdepodobnejšie na ribozómoch. Čo potvrdzuje WB analýza, keď bol po pridaní antibiotika proteín detegovaný na ribozómoch, nie v cytozole.

Otázne je, prečo je lokalizácia fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP mikroskopicky narozdiel od Msr(A)-eqFP650 stále rovnaká a nezávislá od prítomnosti antibiotika či mutovaného proteínu Vga(A)_{LC}EQ1+2-GFP. Rozdiely v lokalizácii môžu reflektovať

rozdiely vo funkcii proteínu. Msr(A) i Vga(A) sa odlišujú antibiotickou špecifitou. Okrem toho u Msr(A) je v štruktúre prítomná malá doména ramena vsunutej do prvej časti NBD, ktorá u Vga(A)_{LC} úplne chýba. Rameno je totiž zodpovedné za regulačnú funkciu, čo sa ukázalo u ABCF EttA, interaguje s L1 veľkou ribozomálnou podjednotkou a obmedzuje dynamiku ribozómu podľa dostupnosti ATP (Boel *et al.* 2014). Možno to je dôvodom prečo u Msr(A) vidíme reakciu v odpovedi na antibiotikum či hydrolyticky inaktívneho proteínu. Nemožno, ale tiež vylúčiť, že dôvodom tejto rozdielnosti môžu byť podmienky expresie proteínu. Msr(A)-eqFP650 bol exprimovaný pri teplote 30 °C a Vga(A)_{LC}-GFP pri 25 °C a 37 °C. Pričom pri teplote 25 °C sa proteín ukladal v blízkosti membrány neprírodzene v spomínaných mnohopočetných ohniskách, kdežto pri 37 °C bola jeho lokalizácia v ohnisku blízko membrány rovnaká ako aj v prípade Msr(A)-eqFP650. Navyše v oboch prípadoch boli proteíny funkčné a vykazovali rezistentnú aktivitu. Nepredpokladám teda, žeby práve teplota pri 30 °C mala zásadný vplyv na zmenu jeho lokalizácie v prítomnosti antibiotika alebo ATP deficientnej mutanty. Rozdiely ale môžu byť dané vlastnosťami fúzaného fluorescenčného proteínu. Do budúcnosti tak bude nutné vymeniť zelený fluorescenčný proteín GFP za červený fluorescenčný proteín eqFP650 v konštruktoch s rezistentnými proteínmi.

Každopádne jedným z podstatných výsledkov tejto práce zostáva, že v prípade fúzneho proteínu Msr(A)-eqFP650 sa jeho lokalizácia vplyvom antibiotika mení. Z ohniska blízko membrány na difúzne (pravdepodobne na ribozómoch) v prítomnosti erytromycínu a to nielen v priebehu kultivácie, ale aj po ukončení kultivácie. Kedy bol erytromycín pridaný do FluoroBrite média k bunkám a inkubovaný po dobu jednej hodiny pri izbovej teplote. Lokalizácia sa v prípade inkubácie v neprítomnosti induktora anhydrotetracyklínu ani v prítomnosti klindamycínu, ku ktorému Msr(A) neudieľa rezistenciu, nezmenila. To znamená, že proteín reaguje zmenou lokalizácie len na antibiotikum, ku ktorému udeľuje rezistenciu. Tento experiment vylučuje možnosť, že sa lokalizácia zmenila z dôvodu napr. zníženej translácie vplyvom antibiotika. V prípade ale, že bola inkubácia len po dobu 15 minút, nebola pozorovaná výrazná zmena lokalizácie v prítomnosti ERY po kultivácii (nepublikované údaje), čo naznačuje, že jedna hodina je dlhá doba na začatie nového translačného cyklu. Na základe tohto pozorovania sa tak črtá hypotéza o duálnom mechanizme ARE ABC-F proteínov. Kedy pri absencii antibiotika je proteín umiestnený na membráne, prípadne v inklúznom teliesku, ktoré interaguje s membránou a akonáhle vstúpi antibiotikum do bakteriálnej bunky, je proteín z inklúzneho telieska aktivovaný a zareaguje

na antibiotikum translokáciou k ribozómu. Kde následne plní už preukázanú ochrannú funkciu ribozómu tým, že uvoľní naviazané antibiotikum na ribozóme, zmenou jeho konformácie (Su *et al.* 2018).

V ďalšej časti tejto diplomovej práce som porovnaním expresie $Vga(A)_{LC}$ v závislosti od prítomnosti linkomycínu u dvoch klinických izolátov ukázala, že indukcia expresie $vga(A)_{LC}$ je skutočne sprostredkovaná atenuáciou, tak ako bolo predikované v článku od Dar (2016). Testovaním *S. haemolyticus* 65 OL kmeňa s konštitutívne exprimujúcim *erm(C)* génom, ribozóm z dôvodu metylácie v A2058 pozícii v 23S rRNA neviazal antibiotikum a regulátor $vga(A)_{LC}$ tak nereagoval na zvyšujúcu sa koncentráciu linkomycínu. Naopak v kmeni 140 UL exprimujúcim iba $vga(A)_{LC}$, expresia proteínu $Vga(A)_{LC}$ reagovala na prítomnosť zvyšujúcej sa koncentrácie linkomycínu naviazaného na ribozóme.

Gén $vga(A)_{LC}$ prítomný u *S. aureus* je vzdialeným homológom génu *lmo0919* z *Listeria monocytogenes* (Chesneau *et al.* 2005) a *vmlR* u *B. subtilis*. Z komparatívnej analýzy 5' UTR sekvencie bolo predikované, že riboregulátor prítomný u *lmo0919*, ktorý obsahuje tri aminokyseliny dlhý uORF, je konzervovaný ako u *vmlR* u *Bacillus subtilis*, tak aj u $vga(A)_{LC}$. Z dôvodu takéhoto krátkeho uORF, tento riboregulátor špecificky reaguje na linkomycín a nereaguje na antibiotikum z inej triedy- erytromycín, ktorý patrí medzi makrolidy. K makrolidom je špecifický riboregulátor, ktorý obsahuje uORF zvyčajne dlhší než 10 aminokyselín. S dĺžkou uORF súvisí i väzba ATB do zásahového miesta. Linkozamidové antibiotiká sa viažu blízko PTC a teda vedú k zástave ribozómu po syntéze 1- 2 aminokyselín, zatiaľ čo makrolidové antibiotiká sa viažu vyššie, do PET a preto tak vyžadujú syntézu 6- 8 aminokyselín k tomu, než narastajúci polypeptidový reťazec bude interagovať s antibiotikom v PET (Dar *et al.* 2016) Zaujímalo ma tak, aké antibiotiká budú indukovať expresiu $vga(A)_{LC}$, ktorého aminokyselinová sekvencia uORF pozostáva z metionínu, izoleucínu a asparagínu (MIN). Proteín $Vga(A)_{LC}$ bol vystavený k subinhibičným koncentráciám rôznych antibiotík. Jeho expresia bola indukovaná linkozamidovými antibiotikami (linkomycín, klindamycín), streptogramínovými antibiotikami typu A (pristinamycín IIA) a mierna expresia bola aj pri indukcii tiamulínom. Všetky tieto spomínané antibiotiká sa viažu do ribozómu v blízkosti PTC a spôsobujú pravdepodobne zástavu ribozómu po pridaní 1-2 aminokyselín. Expresia $Vga(A)_{LC}$ je tak indukovaná špecificky antibiotikami viazanými na ribozóm, ku ktorým proteín udeľuje rezistenciu. Prekvapivým výsledkom však bola indukovaná expresia $Vga(A)_{LC}$

erytromycínom, ku ktorému tento tri aminokyseliny dlhý riboregulátor špecifický nie je. Predpokladalo sa, že by mohlo ísť o nejakú chybu pri vykonaní experimentu, napr. k nevedomej výmene antibiotika, avšak experiment bol následne zopakovaný ešte raz a výsledok bol totožný. Nie je jasné prečo tomu tak je a táto problematika tak zostáva predmetom ďalšieho výskumu.

6 SÚHRN

1. V rámci tejto diplomovej práce bol klonovacou metódou nezávislou na ligácii, SLiCE, pripravený konštrukt exprimujúci fúzny fluorescenčný proteín Vga(A)_{LC}- mEos2.
2. Funkčnosť proteínov Vga(A)_{LC}-mEos2 a Vga(A)_{LC}-GFP v kmeni *S. aureus* RN4220 bola overená testovaním ich citlivosti k antibiotikám, detekciou fúznych proteínov metódou Western blot a mikroskopiou. Pretože proteín Vga(A)_{LC}-mEos2 vykazoval výraznú degradáciu, pre ďalšie experimenty nebol použitý.
3. Vga(A)_{LC}-GFP bol detegovaný ako v ohniskách, tak difúzne, pričom lokalizácia bola závislá od teplotných podmienok, rastovej fázy, času indukcie a od toho v ktorej rastovej fáze a ako dlho bol proteín exprimovaný. Pri teplote 25 °C sa nesprávne produkoval blízko membrány v mnohopočetných ohniskách, pri teplote 37 °C bola jeho lokalizácia v ohnisku v jednom počte na bunku blízko membrány.
4. V derivátoch klinických izolátov *S. aureus* 8325-4 a JE2 bol fúzny proteín lepšie lokalizovaný s vyššou fluorescenčnou intenzitou v ohnisku blízko membrány, než v laboratórnom kmeni *S. aureus* RN4220. To koreluje s lepšou aktivitou Vga(A)_{LC} v týchto kmeňoch.
5. Prítomnosť antibiotika nemala vplyv na lokalizáciu fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP, ktorý sa vyskytoval stále blízko membrány. V prípade Msr(A)-eqFP650, prítomnosť antibiotika od začiatku kultivácie i po kultivácii zmenila jeho lokalizáciu z ohniskovej v blízkosti membrány na difúznu, pravdepodobne na ribozómoch. Rovnako tak bola zmenená aj u ATP deficientnej mutanty Msr(A)EQ1+2-eqFP650, čím sa tak črtá hypotéza o duálnom mechanizme ARE ABC-F proteínov.
6. *In vivo* lokalizácia nekorešpondovala lokalizácii Vga(A)_{LC}-GFP po centrifugácii a imunodetekcii, kedy v prítomnosti antibiotika bol fúzny proteín detegovaný v ribozomálnej frakcii. Detekcia fúzneho proteínu Vga(A)_{LC}-GFP v *S. aureus*

i Vga(A)_{LC} v klinickom izoláte *S. haemolyticus* je v rozpore s tým, čo pozoroval Chesneau, ale súhlasná s tým, že ARE proteíny fungujú na ribozóme.

7. Ukázala som, že expresia Vga(A)_{LC} je kontrolovaná v závislosti od prítomnosti špecifického antibiotika naviazaného na ribozóme mechanizmom označovaným ako transkripčná atenuácia a, že induktory expresie sú antibiotiká, ku ktorým (s výnimkou erytromycínu) proteín udeľuje rezistenciu.

7 LITERATÚRA

Alekshun M. N., Levy S. B. (2007): Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. **128**(6), 1037-1050.

Atkinson G. C., Hansen L. H. , Tenson T., Rasmussen A., Kirpekar F., Vester B. (2013): Distinction between the Cfr Methyltransferase Conferring Antibiotic Resistance and the Housekeeping RlmN Methyltransferase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **57**(8), 4019-4026.

Baker S. M., Buckheit R.W., Falk M. M. (2010): Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biology*. **11**(1), 1-9.

Ball A. P., Gray J. A., Murdoch J. M. (1979): Lincomycin and Clindamycin. *Antibacterial Drugs Today*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1978, 44-46.

Becker D. E. (2013): Antimicrobial Drugs. *Anesthesia Progress*. **60**(3), 111-123.

Biemans-Oldehinkel E., Doeven M. K., Poolman B. (2006): ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Letters*. **580**(4), 1023-1035.

Bockstael K., Aerschot A. (2009): Antimicrobial resistance in bacteria. *Open Medicine*. **4**(2), 141-155.

Boel G., Smith P. C., Ning W. *et al.* (2014): The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nature Structural & Molecular Biology*. **21**(2), 143-151.

Brown P., Dawson M. J. (2015): *A Perspective on the Next Generation of Antibacterial Agents Derived by Manipulation of Natural Products*. Elsevier, 2015, s. 135-184.

Byrgazov K., Vesper O., Moll I. (2013): Ribosome heterogeneity: another level of complexity in bacterial translation regulation. *Current Opinion in Microbiology*. **16**(2), 133-139.

Cocito C., Giambattista D. M., Nyssen E., Vannuffel P. (1997): Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **39**, 7-13.

- Contreras A., Vazquez D. (1977): Synergistic Interaction of the Streptogramins with the Ribosome. *European Journal of Biochemistry*. **74**(3), 549-551.
- Dar D., Sorek R. (2017): Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **36**, 111-117.
- Dar D., Shamir M., Mellin J. R., Koutero M., Stern-Ginossar N., Cossart P., SOREK R. (2016): Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria. *Science*. **352**(6282), 9822-9822.
- Davidson A. L., Dassa E., Orelle C., Chen J. (2008): Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **72**(2), 317-364.
- Endesfelder U., Malkusch S., Flottmann B., Mondry J., Liguzinsky P., Verveer J. P., Heilemann M. (2011): Chemically Induced Photoswitching of Fluorescent Probes—A General Concept for Super-Resolution Microscopy. *Molecules*. **16**(4), 3106-3118.
- Eyal Z., Matzov D., Kkrupkin M. *et al.* (2016): A novel pleuromutilin antibacterial compound, its binding mode and selectivity mechanism. *Scientific Reports*. **6**(1), 2045-2322.
- Gabashvili I. S., Gregory T. S., Valle M., Grassucci R., Worbs M., Wahl C. M., Dahlberg E. A., Frank J. (2001): The Polypeptide Tunnel System in the Ribosome and Its Gating in Erythromycin Resistance Mutants of L4 and L22. *Molecular Cell*. **8**(1), 181-188.
- Garcia-Fruitos E., Gonzalez-Montalban N., Morell M., Vera A., Ferraz R. M., Aris A. *et al.* (2005): Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact*, 4-27.
- Gaynor M., Mankin A. (2003): Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **3**(9), 949-960.
- Godin G. A., Lounis B., Cognet L. (2014): Super-resolution Microscopy Approaches for Live Cell Imaging. *Biophysical Journal*. **107**(8), 1777-1784.
- Gualerzi O. C., Pon L. C. (2002): Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry*. **29**(25), 5881-5889.

- Harms M. J., Schlunzen F., Fucini P., Bartels H., Yonath A. (2004): Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalbavancin and quinupristin. *BMC Biology*. **2**(1), 2-4.
- Haroche J., Allignet J., Buchrieser C., El Solh N. (2000): Characterization of a Variant of vga(A) Conferring Resistance to Streptogramin A and Related Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**(9), 2271-2275.
- Hartz D., Binkley J., Hollingsworth T., Gold L. (1990): Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by Escherichia coli IF3. *Genes & Development*. **4**(10), 1790-1800.
- Chalfie M. (1995): GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Photochemistry and Photobiology*. **62**(4), 651-656.
- Chen B., Boel G., Hashem Y. *et al.* (2014): EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nature Structural & Molecular Biology*. **21**(2), 152-159.
- Chesneau O., Ligeret H., Hosan-Aghaie N., Morvan A., Dassa E. (2005): Molecular Analysis of Resistance to Streptogramin A Compounds Conferred by the Vga Proteins of Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**(3), 973-980.
- Jacquet E., Girard J. M., Ramaen O., Pamlard O., Lévaïque H., Betton J. M., Dassa E., Chesneau O. (2008): ATP Hydrolysis and Pristinamycin IIA Inhibition of the Staphylococcus aureus Vga(A), a Dual ABC Protein Involved in Streptogramin A Resistance. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(37), 25332-25339.
- Kannan K., Kanabar P., Schryer D. *et al.* (2014): The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **111**(45), 15958-15963.
- Kannan K., Vázquez-Laslop N., Mankin S. A. (2012): Selective Protein Synthesis by Ribosomes with a Drug-Obstructed Exit Tunnel. *Cell*. **151**(3), 508-520.
- Kanoh S., Rubin K. B. (2010): Mechanisms of Action and Clinical Application of Macrolides as Immunomodulatory Medications. *Clinical Microbiology Reviews*. **23**(3), 590-615.

- Kato F., Nakamura M., Sugai M. (2017): The development of fluorescent protein tracing vectors for multicolor imaging of clinically isolated *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*. **7**(1), 2045-2322.
- Kerr I.D., Reynolds E. D., Cove H. J. :ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport?. *Biochemical Society Transactions*. **33**(5), 1000-2.
- Lancini G., Parenti F., Gallo G. G. (1995): *Antibiotics: a multidisciplinary approach*. Boston, MA: Springer US. ISBN 147579200X.
- Laursen B. S., Sorensen H. P., Mortensen K. K., Sperling-Petersen H. U. (2005): Initiation of protein synthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**, 101-123.
- Le Bouter A., Leclercq R., Cattoir V. (2011): Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus saprophyticus* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **37**(2), 118-123.
- Leclercq R. (2002): Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*. **34**(4), 482-492.
- Lenart J., Vimberg V., Vesela L., Janata J., Balikova Novotna G. (2015): Detailed Mutational Analysis of Vga(A) Interdomain Linker: Implication for Antibiotic Resistance Specificity and Mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **59**(2), 1360-1364.
- Licht A., Schneider E. (2011): ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Open Life Sciences*. **6**(5), 2391-5412.
- Li L., Feng W., Zhang Z., Xue H., Zhao X. (2015): Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Veterinary Research*. **11**(1).
- Lindner A. B., Madden R., Demarez A., Stewart E. J., Taddei F. (2008): Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**(8), 3076-3081.
- Linton J. K. (2007): Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*. **22**(2), 122-130.

- Locher K. P. (2009): Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **364**(1514), 239-245.
- Lubelski J., Konings . W., Driessen M. J. A. (2007): Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **71**(3), 463-476.
- Luker K.E., Pata P., Shemiakina I. I., *et al.* (2015): Comparative study reveals better far-red fluorescent protein for whole body imaging. *Scientific Reports*. **5**(1), 2045-2322.
- Mast Y., Wohlleben W. (2014): Streptogramins – Two are better than one!. *International Journal of Medical Microbiology*. **304**(1), 44-50.
- Mmkinney S. A., Murphy S. CH., Hazelwood L. K., Davidson W. M., Loger L. L. (2009): A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nature Methods*. **6**(2), 131-133.
- Mukhtar T. A., Koteva P. K., Hughes W. D., Wright D. G. (2001): Vgb from *Staphylococcus aureus* Inactivates Streptogramin B Antibiotics by an Elimination Mechanism Not Hydrolysis. *Biochemistry*. **40**(30), 8877-8886.
- Munita M. J., Arias A. C. (2016): Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*. American Society of Microbiology, s. 481-511.
- Murina V., Kasari M., Reith M., Hauryliuk V., Atkinson C. G. (2017): ABCF ATPases involved in protein synthesis, ribosome assembly and antibiotic resistance: structural and functional diversification across the tree of life, 1-29.
- Murina V., Kasari M., Hauryliuk V., Atkinson C. G. (2018): Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Research*. **46**(7), 3753-3763.
- Novak, R., & Shlaes, D.M. (2010): The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. *Current opinion in investigational drugs*, **11** 2, 182-91.

- Novotna G., Janata J. (2006): A New Evolutionary Variant of the Streptogramin A Resistance Protein, Vga(A)LC, from *Staphylococcus haemolyticus* with Shifted Substrate Specificity towards Lincosamides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**(12), 4070-4076.
- Nunez- Samudio V., Chesneau O. (2013): Functional interplay between the ATP binding cassette Msr(D) protein and the membrane facilitator superfamily Mef(E) transporter for macrolide resistance in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*. **164**(3), 226-235.
- Ohba Y., Fujioka Y., Nakada S., Tsuda M. (2013): Fluorescent Protein-Based Biosensors and Their Clinical Applications. *Fluorescence-Based Biosensors - From Concepts to Applications*. Elsevier, 2013, s. 313-348.
- Ramakrishnan V. (2002): Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell*. **108**(4), 557-572.
- Rees D. C., Johnson E., Lewinson O. (2009): ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **10**(3), 218-227.
- Roberts M. C. (2008): Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. **282**(2), 147-159.
- Salih M. A., Abdalla A. M., Masri M. A. R. (2014): Detection of Erythromycin Resistance Genes erm(A), erm(B), erm(C) and msr(A) in *Staphylococcus* Nasal carriers in Khartoum State. *Nature and Science* **12**(4): 106-110.
- Sattarzadeh A., Saberianfar R., Zipfel W. R., Menassa R., Hanson M. R. (2015): Green to red photoconversion of GFP for protein tracking in vivo. *Scientific Reports*. **5**(1), 2045-2322.
- Shaker A., Khaled A. et al. (2014): Plasmid-carried macrolides target site modification erm and efflux msr genes in some *Staphylococcus* spp. From lower respiratory tract infected patients. *Archives oc Clinical Microbiology* (5): 1-11.
- Sharkey L. K. R., Edwards A. T., O'Neill J. A. (2016): ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *MBio*. **7**(2), 2150-7511.
- Schermelleh L., Heintzmann R., Leonhardt H. (2010): A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*. **190**(2), 165-175.

- Schneider E. Hunke S. (1997): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**(1), 1-20.
- Schroeder M. R., Stephens S. D. (2016). Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **6**, 2235-2988.
- Sigh K. V., Weinstock G. M., Murray B. E. (2002): An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) Is Required for the Resistance of This Species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**(6), 1845-1850.
- Spížek J., Řezanka T. (2017): Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology*. **133**, 20-28.
- Su W., Kumar W., Ding Y. *et al.* (2018): Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **115**(20), 5157-5162.
- Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M. (2003): The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*. **330**(5), 1005-1014.
- Ter Beek J., Guskov A., Slotboom D. J. (2014): Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology*. **143**(4), 419-435.
- Theodoulou F. L., Kerr I. D. (2015): ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*. **43**(5), 1033-1040.
- Vannuffel P., Cocito C. (1996): Mechanism of Action of Streptogramins and Macrolides. *Drugs*. **51**, 20-30.
- Vasiliou V., Vasiliou K., Nebert D. W. (2008): Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*. **3**(3), 281- 290.
- Vester B., Douthwaite S. (2001): Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**(1), 1-12.
- Vimberg V., Xiong L., Bailey M., Tenson T., Mankin A. (2004): Peptide-mediated macrolide resistance reveals possible specific interactions in the nascent peptide exit tunnel. *Molecular Microbiology*. **54**(2), 376-385.

- Waller J.P. (1964): Fractionation of the ribosomal protein from Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*. **10**(2), 319.
- Wang Y., LV Y., Cai J. *et al.* (2015): A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **70**(8), 2182-2190.
- Wilson D. N. (2014): Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*. **12**(1), 35-48.
- Wilson D. N. (2016): The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance. *MBio*. **7**(3), 16-17.
- Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vornheim C., Hartsch T., Ramakrishnan V. (2000): Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **407**(6802), 327-339.
- Yonath A. (2005): ANTIBIOTICS TARGETING RIBOSOMES: Resistance, Selectivity, Synergism, and Cellular Regulation. *Annual Review of Biochemistry*. **74**(1), 649-679.
- Zucker F. H., Hershey J. W. B. (2002): Binding of Escherichia coli protein synthesis initiation factor IF1 to 30S ribosomal subunits measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*. **25**(12), 3682-3690.