

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla uvedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Eva Tesařová

**Povrchový růst a diferenciacie streptomycet na inertních
mikrokuličkách – morfologická a proteomová analýza**

**Streptomyces surface growth and differentiation followed on inert
micro-beads – morphological and proteome analysis.**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Jaroslav Weiser, CSc.

Praha 2011

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, 29. srpna 2011

Podpis

Na prvním místě děkuji svému školiteli RNDr. Jaroslavu Weiserovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, podnětné konzultace, velkou trpělivost a všestrannou pomoc, kterou mi během mojí práce poskytl. Velké poděkování patří všem členům Laboratoře mikrobiální proteomiky za časté rady a velmi příjemné pracovní prostředí. Děkuji také RNDr. Oldřichu Benadovi, CSc. a RNDr. Olze Kofroňové, CSc. za provedení skenovací elektronové mikroskopie kultur streptomycet.

Ráda bych také poděkovala svým rodičům, že mi umožnili studium na vysoké škole a podporovali mě po celou dobu mého studia.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2009 - 2011, podporovaná grantem č.IAA500200913 poskytnutým Dr. J. Weiserovi Grantovou agenturou Akademie věd České Republiky v Laboratoři mikrobiální proteomiky v MBÚ AV ČR.

ABSTRAKT

Streptomycety jsou vláknité, Gram-pozitivní bakterie, které jsou producenty více než 70 % všech prakticky využívaných antibiotik. Jsou zajímavé svým poměrně komplikovaným životním cyklem (morfologická diferenciací), který ústí ve vznik dormantních spor odolných vůči nepříznivým podmínkám a umožňujícím dlouhodobé přežití organismu. Jejich přirozeným prostředím je hlavně půda. V laboratorních podmínkách jsou pěstované na pevném agaru a v tekutém médiu. V naší laboratoři byl vyvinut nový dvoufázový kultivační systém, který umožňuje reprodukovatelnou a kvantitativní přípravu vzorků pro proteomickou, transkriptomickou a metabolickou analýzu diferenciací streptomycet. Tento systém je tvořen inertními mikrokuličkami a kapalným médiem. V naší studii byly použity dva druhy mikrokuliček – skleněné a zirkoniové. Sledovali jsme povrchový růst a diferenciaci streptomycet na těchto dvou druzích mikrokuliček optickou a elektronovou mikroskopií (SEM). Zjistili jsme podstatně větší nárůst streptomycet a vyšší produkci antibiotik na skleněných mikrokuličkách. Dalším rozdílem byl i tvar a velikost kolonií. V další části jsme se snažili pomocí srovnávací proteomiky identifikovat proteiny, které se podílejí na rozpoznání a přichycení vegetativních hyf na rozdílné povrchy. Ve třech experimentech a prostřednictvím kvalitativní a kvantitativní analýzy bylo vyhodnoceno několik unikátních proteinů, které by mohly mít vliv pro růst na skleněných a zirkoniových mikrokuličkách.

Klíčová slova: streptomycety, dvoufázový kultivační systém, srovnávací proteomika, dvourozměrná elektroforéza, skleněné a zirkoniové mikrokuličky, SEM, granaticin

ABSTRACT

Streptomyces, filamentous Gram-positive bacteria are producers of more than 70% of antibiotics used in human therapy and agriculture. They are remarkable because of their complex life cycle (morphological differentiation) which leads to a formation of dormant spores able to survive unfavorable living conditions and allowing long-term survival of the organism. Soil represents their mostly natural living environment. In laboratory conditions they are cultivated in liquid media or on agar. We have developed in our laboratory two phase cultivation system which allows quantitative and reproducible preparation of samples for proteomic, transcriptomic and metabolomic analyses of Streptomyces differentiation. The system is composed of inert micro-beads submerged in liquid medium. We used two types of micro-beads in our studies, glass and zirconia/silica beads. We followed the surface growth and differentiation of Streptomyces on both types of beads using optical and electron microscopy (SEM) techniques. We observed major growth and higher antibiotic production on glass beads. Another difference we observed was in size and shape of colonies. In further research, using comparative proteomics, we attempted to identify proteins which might be responsible for recognition and adhesion of Streptomyces to diverse surfaces. In three groups of experiments, using qualitative and quantitative analyses, we have evaluated several groups of proteins connected with the growth on glass and zirconia beads.

Key words: Streptomyces, two-phase cultivation system, comparative proteomics, 2D-electrophoresis, glass beads, zirconia beads, SEM, granaticin

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1. Streptomycety	13
2.1.1. Morfologická diference	14
2.1.2. Produkce sekundárních metabolitů	17
2.1.3. Metody kultivace	20
2.1.4. Streptomycetová kolonie	23
2.2. Bakteriální biofilmy	24
2.3. Proteomové studie u Streptomycet	26
3. MATERIÁL A METODY	31
3.1. Materiál	31
3.1.1. Bakteriální kmeny	31
3.1.2. Kultivační média	31
3.1.3. Pufry a roztoky	32
3.1.3.1. Pufry a roztoky pro izolaci proteinů	32
3.1.3.2. Pufry a roztoky pro dvourozměrnou elektroforézu	33
3.1.3.3. Roztoky pro barvení stříbrem	35
3.1.4. Chemikálie a kity	36
3.1.5. Přístroje	38
3.1.6. Mikrokuličky	39
3.2. Metody kultivace	39
3.2.1. Kultivace <i>Streptomyces granaticolor</i> v tekutém médiu	39
3.2.2. Kultivace <i>Streptomyces granaticolor</i> na mikro-kuličkách	39
3.2.3. Příprava glycerolové konzervy	40
3.3. Mikroskopie	41
3.3.1. Binokulární lupa	41
3.3.2. Optická mikroskopie	41
3.3.3. Rastrovací elektronová mikroskopie	41

3.3.3.1. Příprava vzorků	41
3.4. Dvourozměrná elektroforéza (2DE)	42
3.4.1. Příprava proteinových vzorků	43
3.4.2. Isoelektrická fokusace	44
3.4.3. SDS elektroforéza	44
3.4.4. Barvení a sušení gelů	45
3.4.5. Snímání a digitalizace gelových obrazů	45
3.4.6. Počítačová analýza gelových obrazů	45
3.4.7. Statistické analýzy	46
3.5. Kvantifikace produkce granaticinu	46
4. VÝSLEDKY	48
4.1. Morfologická a biochemická diferenciacie streptomycet na mikrokuličkách	48
4.1.1. Srovnání sporulace a tvorby pigmentovaných antibiotik streptomycet na skleněných a zirkoniových kuličkách	48
4.1.2. Tvorba kolonií streptomycet na různých površích	49
4.1.3. Morfologická analýza diferenciacie <i>S.ambofaciens</i> a <i>S.granaticolor</i>	51
4.1.4. Produkce pigmentových antibiotik na skleněných a zirkoniových kuličkách	54
4.2. Proteomová analýza kultur <i>S.granaticolor</i> rostoucích na skleněných a zirkoniových mikrokuličkách	57
4.2.1. Srovnání růstu <i>S.granaticolor</i> na skleněných a zirkoniových kuličkách – SEM analýza	57
4.2.2. Srovnání proteomů kultur <i>S.granaticolor</i> rostoucích 6 h (raná vegetativní fáze) v tekuté půdě a na skleněných a zirkoniových kuličkách	59
4.2.2.1. Srovnání proteomů kultur z tekuté půdy a skleněných kuliček (experiment A)	59
4.2.2.1.1. Kvalitativní analýza	59
4.2.2.1.2. Kvantitativní analýza	63

4.2.2.2. Srovnání proteomů kultur z tekuté půdy a zirkoniových kuliček (experiment B).....	66
4.2.2.2.1. Kvalitativní analýza	66
4.2.2.2.2. Kvantitativní analýza	70
4.2.2.3. Srovnání proteomů kultur ze skleněných a zirkoniových kuliček (experiment C).....	73
4.2.2.3.1. Kvalitativní analýza	73
4.2.2.3.2. Kvantitativní analýza	75
4.2.2.4. Souhrnná analýza proteinových experimentů A, B a C	78
4.2.2.4.1. Souhrn kvalitativních a kvantitativních rozdílů v experimentech A, B a C	78
4.2.2.4.2. Průniky množin proteinů identifikovaných kvalitativní a kvantitativní analýzou při srovnání proteomů z kultivací <i>S.granaticolor</i> v tekuté půdě a na skleněných a zirkoniových kuličkách (experimenty A, B a C)	79
4.2.2.4.2.1. Kvalitativní analýza	79
4.2.2.4.2.2. Kvantitativní analýza	79
4.3. Vliv materiálu mikrokuliček na proteinový profil při jejich použití k rozbíjení buněk – proteomová analýza	83
4.3.1. Kvalitativní analýza	83
4.3.2. Kvantitativní analýza.....	84
5. DISKUZE	87
6. SOUHRN	94
7. SEZNAM LITERATURY	96

SEZNAM ZKRATEK

GTP	guanosin-5'-trifosfát
GC	guanin, cytosine
DNA	deoxyribonukleová kyselina
TCA	Kyselina trichloroctová
DTT	dithiothreitol
SDS	dodecylsulfát sodný
APS	persíran amonný
IAA	iodacetamid
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
2DE	dvourozměrná elektroforéza
<i>S.granaticolor</i>	Streptomyces granaticolor
<i>S.coelicolor</i>	Streptomyces coelicolor
<i>S.ambofaciens</i>	Streptomyces ambofaciens
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
<i>B.subtilis</i>	Bacillus subtilis
PAGE	polyakrilamidová gelová elektroforéza
OD	optická denzita
pI	izoelektrický bod
ppGpp	guanosin 5' difosfát 3' difosfát
TEMED	N, N, N', N'- tetramethylendiamin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	bovinní sérum albumin
kDa	kilodalton
SSP	číslo skvrny
SD	směrodatná odchylka
Mr	molekulová hmotnost
CHAPS	3 - [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate

1. ÚVOD

Streptomycety jsou saprofytické, vláknité, gram-pozitivní bakterie, obývající ekosystémy půdy a mořské sedimenty. Jsou charakteristické vysokým zastoupením GC párů v lineárním genomu, jeho velikostí (2,5x větší než *E.coli*) a schopností diferenciací během životního cyklu. O jejich schopnost produkce mnoha důležitých antibiotik a dalších užitečných sekundárních metabolitů se zajímají akademici a jsou využívány mnoha farmaceutickými společnostmi. Morfologická diferenciací související s primárním metabolismem a produkcí sekundárních metabolitů je složitý proces, proto je důležité streptomycety zkoumat nejlépe za podmínek, které napodobují jejich přirozené prostředí co nejvíce je to možné.

Pěstování streptomycet na agarových miskách v laboratorních podmínkách přináší několik nevýhod. Agarové půdy nesimulují charakteristické částice půdního ekosystému a kromě toho, nelze dobře přizpůsobit složení média v průběhu kultivace, nebo provést kvantitativní analýzu sekundárních metabolitů a studovat signalizační procesy při diferenciaci buněk. Odebírání mycelia, které proniká agarem je obtížné a nikdy kvantitativní. S problémem získání velkých homogenních vzorků diferencovaných streptomycet reprodukovatelným způsobem se setkáváme ve všech transkriptomických a proteomických studiích.

Zde jsme používali nový dvoufázový kultivační systém vyvinutý pro účely proteomových studií diferenciací streptomycet (NGUYEN *et al.* 2005). Tento systém využívá jako oporu pro růst skleněné nebo zirkoniové mikrokuličky a jako dynamickou složku běžná kapalná živná média využívaná pro submersní kultivaci streptomycet. Velikost kuliček je vybraná tak, aby co nejlépe napodobovala zrnka písku nebo částičky zeminy v přirozených stanovištích streptomycet. Systém dovoluje snadné rozbíjení buněk s využitím skleněných (zirkoniových) mikrokuliček a reprodukovatelnou přípravu dostatečného množství proteinových vzorků pro proteomové analýzy.

Cílem této diplomové práce bylo srovnat kultivaci na skleněných a zirkoniových mikrokuličkách u třech kmenů streptomycet (*S.granaticolor*, *S.coelicolor*, *S.ambofaciens*). Provést morfologickou analýzu u všech kmenů streptomycet. Zjistit, zda se liší produkce granaticinu při růstu na skleněných nebo zirkoniových mikrokuličkách u *S. granaticolor*. Pomocí srovnávací proteomiky identifikovat

proteiny, které se mohou podílet na rozpoznání a přichycení vegetativních hyf na rozdílné povrchy. Zjistit, zda při rozbíjení buněk má nějaký vliv materiál mikrokuliček na jejich proteinový profil.

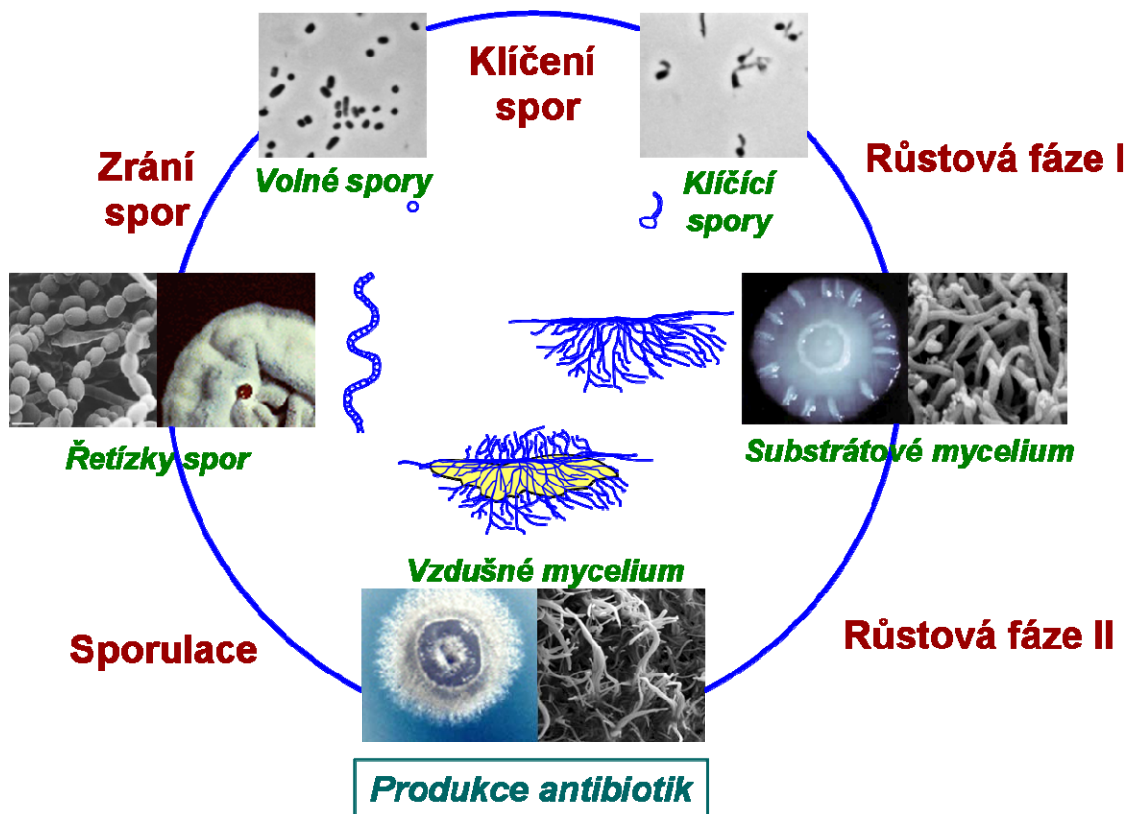
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Streptomycety

Významný rod Gram pozitivní *Streptomyces* GC-bohaté bakterie patří do řádu *Actinomycetales*. *Streptomyces* mají jméno odvozené od latinského *streptos* = zvrásnělý nebo ohnutý a *myces* = houby, což odráží jejich morfologii podobnou vláknitým houbám a zvrásnělý tvar jejich vzdušných hyf diferencovaných na řetízky spor. Jsou to striktní aerobové obývající hlavně půdní ekosystémy, kde reprezentují přibližně 10 % z celkové půdní mikroflory (JANSSEN 2006). I když většina streptomycet žije jako saprofyty v půdě, tak také úspěšně obývají širokou škálu dalších suchozemských i vodních prostředí. Některé kmeny jsou rostlinnými nebo živočišnými patogeny. (BUTTNER a FLARCH 2009). Streptomycety hrají důležitou roli při procesech mineralizace v přírodě (MANTECA a SANCHEZ 2009). Jejich růstová dispozice spojená s činností množství extracelulárních hydrolytických enzymů, jim pomáhá získat přístup k živinám v nerozpustných organických polymerech v půdě (CHATER 2006).

Streptomycety také procházejí složitým životním cyklem s výraznými morfologicky a biochemicky definovanými fázemi (viz Obr. 2.1). Vegetativní růst probíhá v rané fázi po vyklíčení spor ve formě multi–genomových hyf substrátového mycelia (růstová fáze I). V druhé fázi dochází ke tvorbě vzdušných hyf zároveň s biosynézou antibiotik (růstová fáze II). Ve třetí fázi, v reakci na nepříznivé podmínky dochází k septaci vzdušného mycelia a tvorbě spor. Pokud jsou přírodní podmínky opět příznivé, dochází ke klíčení spor a reiniciaci vegetativního růstu substrátového mycelia (CHATER 2006).

Mnoho druhů streptomycet je dobře známo jako významní producenti antibiotik, která mají rozhodující úlohu v boji proti bakteriálním infekcím. Více než polovina našich současných antibiotik je produkována druhy z rodu *Streptomyces*.



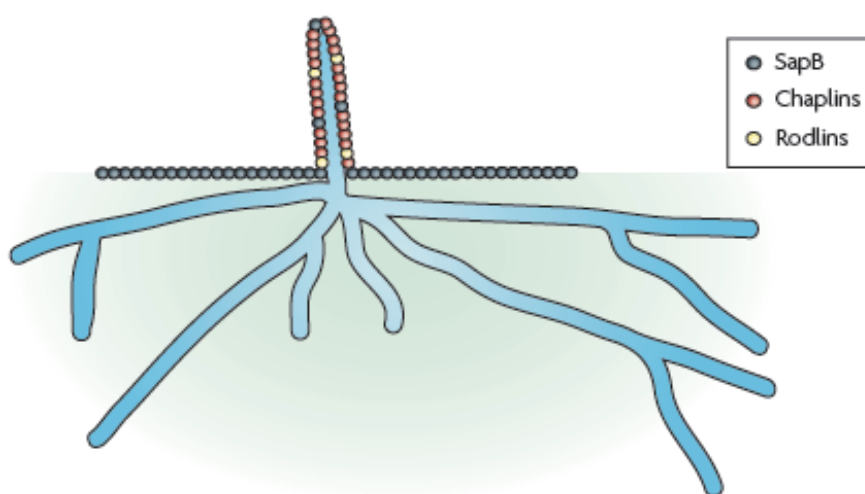
Obr. 2.1: Schéma životního cyklu streptomycet.

2.1.1. Morfologická diferenciacce

Životní cyklus streptomycet začíná klíčením spor a tvorbou rozvětvených sítí vegetativních hyf nazvaných substrátové mycelium (NODWELL a LOSICK 1998). K růstu dochází prostřednictvím rozšíření růstového vrcholu a zahájením nového větvení a tím ke vzniku nového buněčného prostoru. Prodloužení vrcholu u streptomycet není závislé (jako u *E.coli* či *B.subtilis*) na produktu genu *MreB* a syntéza buněčné stěny nastává u hyfálních vrcholů, spíše než podél bočních stěn. Ačkoliv všechny genomy streptomycet, které jsou dosud osekvenované obsahují dva *MreB* geny, studium *Streptomyces coelicolor* ukázalo, že tyto geny mají jen malý dopad na prodlužování růstového vrcholu u vegetativního mycelia, ale podílejí se zejména na tvorbě vzdušných hyf a spor (MAZZA *et al.* 2006). Zahájení prodlužování růstového vrcholu při větvení hyf vyžaduje výběr a označení místa, kde růst započne, a tak je definována nová osa buněčné polarity. Enzymy, které jsou zapojeny do exportu a tvorby peptidoglykanu pak musí být přítomné na tomto místě aby mohlo dojít zahájení růstu a vytváření nového hyfálního vrcholu. Bylo prokázáno, že produkt genu *DivIVA* se nahromadí v místě na boční stěně před viditelným výrůstkem, a že nová větev se pak

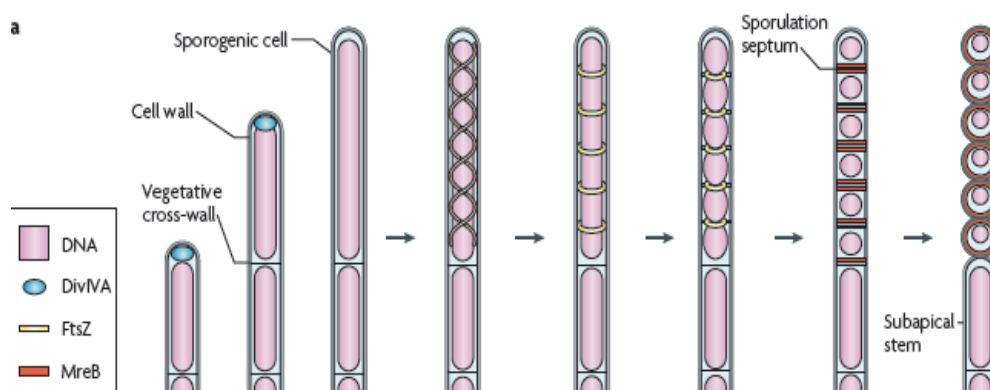
vytváří z tohoto místa (FLARDH 2003), (BUTTNER a FLARCH 2009). *DivIVA* je růstový marker, který spustí tvorbu nových míst pro růst buněčné stěny, případně reguluje přísun enzymů syntézy buněčné stěny (SCHERR a NGUYEN 2009). Hyfy rostou podle rozšíření vrcholu a větví se do vegetativního (= substrátového) mycelia, které roste napříč a hluboko do substrátu, což dává podnět ke vzniku vegetativních kolonií.

V reakci na vyčerpání živin a jiných signálů dochází k růstu vzdušných hyf (BUTTNER a FLARCH 2009). Porušení povrchového napětí mezi vodním prostředím a substrátem a růst vzdušné hyfy do vzduchu umožňuje malý hydrofobní peptid SapB. Ten tvoří povrch vzdušných hyf a přispívá k jejich vzpřimování (KELEMEN a BUTTNER 1998), ale není produkován v minimálním médiu. Přesto zde dochází k produkci vzdušných hyf, což naznačuje, že existuje SapB nezávislá dráha pro tvorbu vzdušného mycelia. Tato SapB nezávislá dráha je zprostředkována funkcí proteinů hydrofobního pláště: chaplinů a rodlinů. Exprese *chp* genů (chaplíny) je aktivována před tvorbou vzdušného mycelia na bohatém i chudém médiu. Kmeny, které mají odstraněno všech 8 genů kódujících chaplíny netvoří vzdušné mycelium na minimálním mediu a ve velmi omezené podobě na bohatém mediu. Další část povrchových vrstev vzdušného mycelia tvoří rodliny (viz. Obr.2.2) (BUTTNER a FLARCH 2009), Dva homologní proteiny Rdl A a Rdl B jsou zapojeny do tvorby rodlet vrstvy na povrchu vzdušných hyf (u *S. coelicolor* a *S.lividans*). *Rdl* (rodliny) geny jsou exprimovány v rostoucích vzdušných hyfách, ale ne ve sporách (MIKULIK *et al.* 2002).



Obr.2.2: Schéma umístění hydrofobních povrchových proteinů při tvorbě vzdušného mycelia streptomycet. (BUTTNER a FLARCH 2009)

Poté, co jsou vzdušné hyfy vztyčeny, mohou se zapojit do vývojového programu, který zahrnuje reorganizaci několika základních růstových a buněčných procesů vedoucích k diferenciaci apikální buňky do řetězce spor. Vzdušné hyfy rostou ve špičce a v prodloužení a nesou apikální sestavy proteinů DivIVA. Tvoření apikální sporogenní buňky zahrnuje zastavení růstu. Protein FtsZ, který se procesu účastní, se sestavuje do šroubovicových vláken, která se přeměňují do pravidelně rozmístěných Z prstenců, které pak řídí tvorbu sporových sept. Po dokončení septa, prespory vytvoří silné stěny spor, které vyžadují přítomnost „bakteriálního aktinu“ MreB. Zpočátku, se MreB lokalizuje v místě uzavření septa, ale pak se objevuje v okolí vznikajících spor (viz Obr.2.3). MreB7 zajišťuje správné sestavení stěny spory (BUTTNER a FLARCH 2009).



Obr.2.3: Schéma realizace biologických procesů vedoucích k diferenciaci vzdušných hyf do spor streptomycet. (BUTTNER a FLARCH 2009)

Výsledná bílá chmýřovitá vrstva vzdušných hyf funguje na povrchu kolonie jako plodící orgán, což umožňuje rozptýlení zralých spor a tím dokončení životního cyklu (NODWELL a LOSICK 1998).

Při nepříznivých životních podmínkách, jako je nedostatek esenciálních živin, využívají bakterie tzv. „stringentní“ kontrolu exprese mnohých genů a enzymů. „Stringentní odpověď“, jak se tento proces nazývá, je jednou z nejdůležitějších adaptací, kterými bakterie přežívají drsné podmínky. Mnohé studie ukázaly, že stringentní odpověď závisí na změně hladiny hyperfosforylovaného guanozinnukleotidu, guanozintetrafosfátu ppGpp, který je syntetizovaný jako odpověď na navázání nenabitě tRNA na ribozomální místo A. Tato molekula hraje podstatnou úlohu v mnohých biologických jevech, které nastávají po dobu pozdní růstové fáze. Sporulace nastává když

koncentrace sloučeniny, která kontroluje sporulaci (tj. GTP a nebo sloučeniny, která kontroluje jeho syntézu) se sníží tak, aby dostatečně zpomalila a nebo zabránila růstu a indukovala tím sporulaci. Sporulace není vyvolána přímo ppGpp, ale je nepřímým důsledkem stringentní odpovědi způsobené snížením hladiny GTP (OCHI 2007).

Protože se v substrátovém myceliu vyskytuje buněčné dělení pouze sporadicky, jednotlivá vlákna obvykle obsahují desítky nebo stovky chromozomů. U *S. coelicolor* 24 – 36 hodin po klíčení, začnou kolonie tvořit vzdušné hyfy, ve kterých probíhá synchronně dělení buněk a dochází ke vzniku jednojaderných spor (NODWELL a LOSICK 1998). Přepínač z prodlužování do dělení buněk vyžaduje přítomnost produktů genů *whiA* a *whiB* (BUTTNER a FLARCH 2009). Metabolické změny, které doprovázejí proces morfologické diferenciacce mají za následek tvorbu mnoha užitečných sekundárních metabolitů. Většina antibiotik používaných v humánní medicíně i v zemědělství, stejně jako léky s protinádorovou, protiplísňovou a imunosupresivní aktivitou jsou získávané z různých druhů streptomycet (GEHRING *et al.* 2004).

2.1.2. Produkce sekundárních metabolitů

Streptomycety jsou bakterie s unikátní kapacitou pro produkci množství rozmanitých a komplexních sekundárních metabolitů, z nichž některé mají důležitou úlohu v medicíně a veterinární vědě. Streptomycety se ukázaly jako jeden z nejvyužívanějších zdrojů těchto sekundárních metabolitů. V literatuře je uváděno, že asi 6000 antibiotik bylo identifikováno od bakterií z řádu *Actinomycetales*, z nich pak asi 5000 bylo zjištěno od bakterií rodu *Streptomyces* (HODGSON 2000). Antibiotika produkovaná streptomycetami tedy představují nadpoloviční většinu ze všech 9000 doposud známých antibiotik ze všech organismů. Tato neuvěřitelná rozmanitost biologicky aktivních přírodních produktů je důvodem proč streptomycety hrají velmi důležitou úlohu ve farmaceutickém průmyslu a proč přírodní produkty fermentace jsou druhým největším finančním přínosem v biotechnologickém průmyslu, hned po pivovarnictví. Stejně jako je vysoký biotechnologický zájem o přírodní produkty streptomycet s antibiotickými, protirakovinnými a imunosupresivními vlastnostmi je také vysoká poptávka po různých průmyslově využitelných enzymech produkovaných streptomycetami (např. glukózo – izomeráza) (HODGSON 2000), (CHOI 2010).

Stejně jako morfologická diferenciacce, tak i sekundární metabolismus je ovlivňován podmínkami životního prostředí, což znamená, že tyto procesy mohou být

řízeny stejnými signálními drahami. Streptomycety mají několik proteinových kináz eukaryotického typu, z nichž některé regulují i sekundární metabolismus. Autofosforylace schopná protein kináza AfsK je prvním příkladem, u níž bylo prokázáno, že má vliv na sekundární metabolismus. Tato kináza fosforyluje protein AfsR, který jako transkripční regulátor ovlivňuje jak biosyntézu antibiotik, tak i morfologickou diferenciaci u *S. coelicolor*. Srovnávací studie ukázaly, že AfsK – AfsR systém je široce rozšířený u streptomycet a ovlivňuje sekundární metabolismus a morfologickou diferenciaci i u dalších druhů streptomycet (UMEYAMA *et al.* 2002).

Hlavním kontrolním bodem pro nástup sekundárního metabolismu při růstu na pevné půdě je lytické odstranění vegetativního mycelia a vysoká koncentrace N-acetylglukosaminu po jeho autolytické degradaci a obvykle se shoduje s nástupem morfologické diferenciaci při povrchovém růstu kultury (RIGALI *et al.* 2008). Sekundární metabolismus v tekuté kultuře je pak obecně omezen na stacionární fázi buněčného růstu (CHOI 2010).

V několika studiích u streptomycet byla zaznamenána korelace mezi syntézou ppGpp a nástupem produkce antibiotik, což vedlo k tvrzení, že ppGpp hraje ústřední roli pro zahájení biosyntézy antibiotik. CHAKRABURTTY a BIBB zkoumali vztah mezi syntézou ppGpp a tvorbou undecylprodigiosinu a actinorhodinu u *S.coelicolor*. Za podmínek hladovění na zdroj dusíku zaznamenali pozitivní korelaci mezi výskytem ppGpp a transkripcí dráhy aktivátorů specifických genů pro tato dvě antibiotika a dále to, že *relA* je nutný pro transkripci *redD* regulátoru důležitého pro produkci undecylprodigiosinu. Zvýšení ppGpp tedy hraje důležitou úlohu v začátku produkce antibiotik (CHAKRABURTTY a BIBB 1997).

Geny zapojené v biosyntéze antibiotik jsou uspořádány do kompaktních shluků obsahujících geny pro řadu syntetických a modifikujících enzymů, které tvoří kompletní metabolické dráhy na jejichž konci je funkční antibiotikum. Shluky genů obsahují často i geny poskytující organismu resistenci k vlastnímu antibiotiku a odolnost vůči exogenním antibiotikům. Shluky obsahují regulační geny, které koordinují expresi dalších genů obsažených v biosyntetické dráze (HUTCHINSON 1998). Iniclace produkce antibiotika, často nazývaná také fyziologická či biochemická diferenciaci, obvykle nastává po skončení vegetativního růstu a přechodu do stadia morfologické diferenciaci reprezentovaného tvorbou vzdušného mycelia.

Řada metabolitů primárního metabolismu slouží jako prekuzory při tvorbě antibiotik, například acetyl koenzym A je prekurzorem pro polyketidová antibiotika.

Blokování metabolického toku na úrovni citrát syntázy tak může dovolit využití acetyl-CoA ke zvýšení fermentačního výkonu při produkci polyketidového antibiotika. Citrát syntáza působí na křižovatce glykolytické a TCA dráhy a ovlivňuje morfologický vývoj a biosyntézu antibiotika (VIOLLIER *et al.* 2001).

S. coelicolor produkuje polyketidové antibiotikum actinorhodin vícestupňovou dráhou zahrnující enzymy kódované geny, které jsou seskupeny v jednom shluku. Do něj jsou vloženy geny pro export actinorhodinu, z nichž dva *actR* a *actA* se podobají klasické *tetR* - *tetA* represor – efluxní pumpě, kódované genovými páry pro rezistenci k tetracyklinu. Za tvorbu modrého pigmentovaného antibiotika actinorhodinu je odpovědný gen *actII-ORF1*. Produktem tohoto genu je protein homologní s TetR. Streptomycety produkují mnoho sekundárních metabolitů, které zahrnují aromatická benzoisochromanequinon polyketidová antibiotika. Actinorhodin je převážně intracelulární šesti prstencový benzoisochromanequinone, který je převeden na finální g-actinorhodin během nebo po exportu z buňky (TAHLAN *et al.* 2007). Biosyntéza mnoha různých druhů antibiotik a dalších sekundárních metabolitů se řídí dostupností fosfátů. Produkce těchto látek se objevuje většinou v médiích s nízkým obsahem fosfátů. Nedávno bylo prokázáno, že fosfátová kontrola biosyntézy antibiotika u *Streptomyces lividans* a *S. coelicolor* je zprostředkována dvousložkovým systémem PhoR-PhoP, který řídí syntézu alkalické fosfatázy (*phoA*). Protein PhoR je standardní membránové čidlo kinázy, PhoP patří do skupiny DNA – vazebných regulátorů. Negativní kontrola která působí anorganickým fosfátem na biosyntézu antibiotik a dalších sekundárních metabolitů byla známá po mnoho let. Za poslední čtyři desetiletí bylo prokázáno, že značné množství antibiotik a sekundárních metabolitů je negativně regulováno fosfátem. Patří mezi ně streptomycin, kyselina klavulanová, cefalosporin, cephamycin C a mnoho dalších sekundárních metabolitů. Je zajímavé, že anorganický fosfát v kultivačním médiu řídí syntézu velkého množství sekundárních metabolitů, které patří k různým biosyntetickým skupinám jako například makrolidy, tetracykliny, antracykliny, aminoglykosidy a jiné (MARTIN 2004). Z biosyntetického pohledu mají tyto skupiny metabolitů velmi málo společného, kromě toho, že jsou všechny postradatelnými „sekundárními“ metabolity. Negativní vliv anorganického fosfátu na biosyntézu sekundárních metabolitů je pozorován v širokém spektru mikroorganismů včetně proteobacterií, Gram pozitivních bakterií a vláknitých hub a pravděpodobně má významnou ekologickou roli. Když koncentrace fosforu v kultivačním médiu klesne, bakterie zvýší produkci různých metabolitů, které mohou sloužit jako „zbraně“ proti

jiným mikroorganismům nebo jako biochemické signály umožňující přežití ve zhoršených nutričních podmínkách (MARTIN 2004). Několik výzkumných skupin předložilo důkazy ukazující, že tvorba methylenomycinu, actinorhodinu a undecylprodigiosinu v kulturách *S.coelicolor* je snížena vysokou koncentrací fosfátů (MARTIN 2004).

Organismy produkující antibiotika se většinou musí chránit proti těmto toxickým látkám minimálně během produkční fáze. V případě producentů xenotoxických antibiotik to problém ve skutečnosti není, protože v produkující buňce neexistuje žádné cílové místo pro takové antibiotikum. Nicméně organismy produkující autotoxická antibiotika mají vypracované rezistenční mechanismy k překonání toxických účinků svých vlastních produktů. U producentů antibiotik bylo popsáno několik rezistenčních mechanismů. Poměrně častý a účinný mechanismus rezistence je modifikace cílového místa antibiotika.

U mnoha antibiotik produkovaných aktinomycetami je součástí shluku genů zajišťujících jejich produkci alespoň jeden ABC transportní systém, který zajišťuje rezistenci producenta vůči antibiotiku tím, že ho exportuje mimo buňku. Doposud byly popsány tři druhy antibiotických ABC transportérů. Typický ABC transportér je složen ze dvou částí: hydrofilní a hydrofóbní podjednotky (MENDEZ a SALAS 1998).

Další cestou je pak modifikace nebo inaktivace vlastního antibiotika. Streptomycety jsou schopny produkovat několik antibiotických látek s různou chemickou strukturou najednou a proto jsou většinou vybaveny řadou rezistenčních systémů pracujících s různou specificitou na odlišných principech (BARKER 1999).

2.1.3. Metody kultivace

V laboratorních podmínkách jsou streptomycety obvykle kultivovány v tekuté půdě nebo na pevném agarovém médiu. V tekutém médiu vykazují streptomycety charakteristickou diauxickou růstovou křivku (NOVOTNA *et al.* 2003), na níž lze podobně jako při sledování růstu na pevné půdě rozlišit 4 růstové fáze, ačkoli vzdušné hyfy se v tekutém médiu netvoří a většina druhů (včetně *S. coelicolor*) sporuluje pouze na pevném médiu. Klasický model pro morfologický vývoj streptomycet souvisí proto s růstem na pevné půdě. Zcela životaschopné vegetativní mycelium roste na povrchu a uvnitř agaru, až projde programovaným buněčným procesem smrti, kdy hyfy diferencují v reprodukční (vzdušné) mycelium a na konci cyklu se tvoří řetězce spor ([ANGEL MANTECA, 2010](#)).

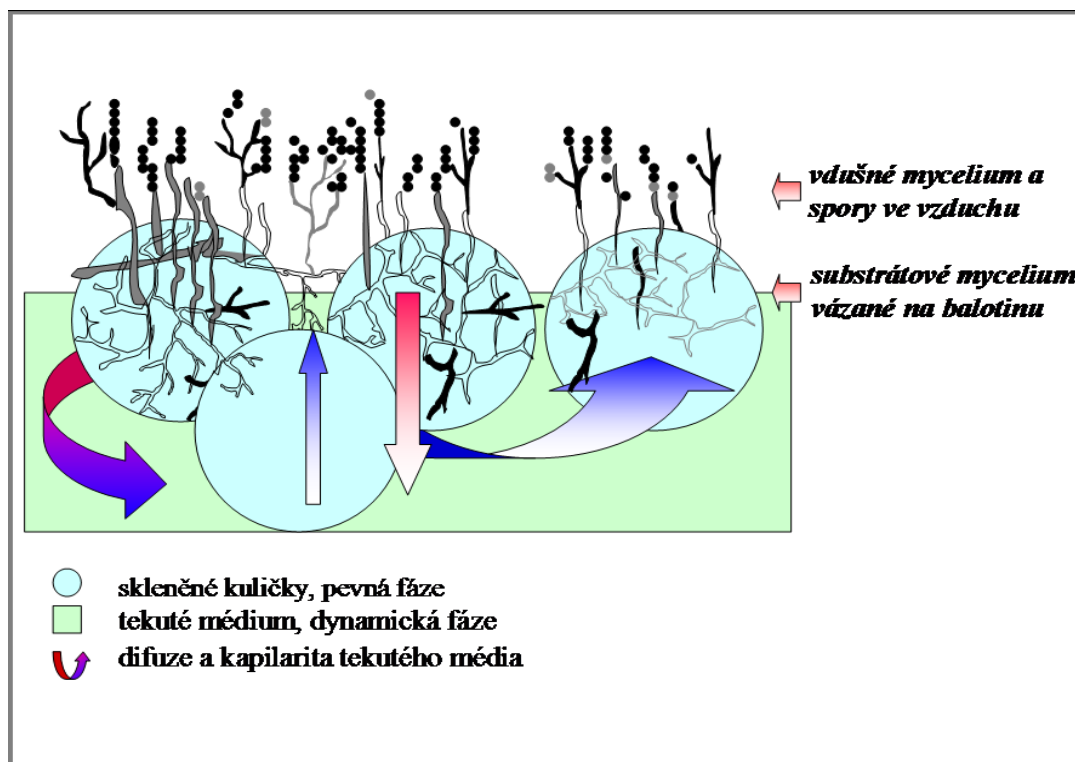
Nicméně nejčastější přirozené životní prostředí streptomycet, kterým je půda neodpovídá přesně ani jedné z laboratorních kultivačních metod (NGUYEN *et al.* 2005). Streptomycety za příznivých růstových podmínek, pro které je především důležitý dostatek vláhy osidlují organické zbytky rostlin a živočichů, ze kterých pomocí celé škály extracelulárních enzymů získávají dostatek potřebných živin (HODGSON 2000). Za těchto podmínek však rostou s podstatně delší generační dobou než v laboratorních podmínkách (HODGSON 2000).

Vegetativní způsob růstu ve formě mycelia umožňuje růstovým vrcholům dosáhnout i relativně vzdálenějších míst s dostatkem živin. Avšak v situaci, kdy dochází k vysychání půdy, a tím extracelulární enzymy rozkládající organické polymery na jejich jednotlivé stavební kameny přestávají fungovat, spouští se buněčný vývojový program, který vede k tvorbě spor, jež s pomocí vody a větru mohou osídlit podstatně vzdálenější životní prostor s příznivějšími podmínkami.

Drtivá většina poznatků o fungování streptomycet na molekulárně genetické a biochemické úrovni byla získána z kultur rostoucích v tekuté půdě nebo na agaru i přes výše zmíněná omezení těchto postupů. Nové molekulárně biologické přístupy studia fyziologie streptomycet z oblasti „omických“ disciplín, zejména transkriptomika a proteomika vyžadují i nové techniky kultivace v laboratoři (NGUYEN *et al.* 2005). Důležité je zkoumat morfologickou a biochemickou diferenciaci streptomycet nejlépe za podmínek, které napodobují přirozené prostředí, co nejlépe je to možné. Pro mnoho druhů streptomycet se morfologická diferenciace vyskytuje pouze na pevném povrchu, kde existuje povrchové rozhraní voda/vzduch. Streptomycety byly tedy pěstovány na agarových miskách, někdy pokrytých vrstvou celofánu, s cílem usnadnit sběr buněk. Nicméně tento způsob přináší několik základních nevýhod. Agarové gely nesimulují charakteristické částice půdního ekosystému. Kromě toho agar neumožňuje snadnou obměnu složení média v průběhu kultivace, nebo kvantitativní analýzu sekundárních metabolitů a signalizačních procesů při diferenciaci buněk. Odebírání mycelia, které proniká agarem je obtížné a nikdy kvantitativní. I přes minimalizování problému tím, že pěstujeme kulturu na celofánu pokrývajícím agar, mohou mycelia některých druhů prorůst celofánem a současně ho metabolizovat. S problémem získání velkých homogenních vzorků diferencovaných streptomycet reprodukovatelným způsobem se setkáváme ve všech transkriptomických a proteomických studiích (NGUYEN *et al.* 2005).

V naší laboratoři byl vyvinut nový dvoufázový systém pěstování streptomycet na skleněných kuličkách (balotina) (viz. Obr. 2.4) (NGUYEN *et al.* 2005). Kultivační systém byl vyvinut tak, aby umožnil studium diferenciacie streptomycet, metodami molekulární biologie a zejména pak tzv. globálními technikami, jako je transkriptomika a proteomika. Systém je založen na pevné fázi, tvořené skleněnými nebo zirkoniovými kuličkami, jež napodobují částice v půdě, jílu, písku a jiných přírodních stanovištích streptomycet. Kuličky jsou ponořené do kapalného média, které umožňuje snadnou úpravu, nebo výměnu živin a růstových faktorů, stejně jako radioaktivní značení proteinů. Použití skleněných kuliček umožnilo vytvořit jednoduchou a levnou techniku pro sekvenční sledování antibiotické produkce, značení diferencovaných buněk a rozpad mycelia. Díky dvoufázovému kultivačnímu systému je zjednodušený i úkol sběru mycelia či analýzy sekundárních metabolitů, buď odstraněním kapalné fáze obsahující metabolity nebo pomocí extrakce intracelulárních metabolitů z homogenátu buněk po jejich rozbití. Navíc použité mikrokuličky mohou být s výhodou využity při rozbíjení buněčné biomasy a to buď mechanickým třením (účinně rozbíjí i spory) nebo v nejrůznějších třepacích zařízeních (NGUYEN *et al.* 2005).

Řada druhů streptomycet včetně *S. coelicolor* A3(2), *Streptomyces aurofaciens* CCM3239, *Streptomyces granaticolor* ajn. procházelo morfologickou diferenciací a produkovalo pigmenty, když byly kultivovány v tomto dvoufázovém kultivačním systému (NGUYEN *et al.* 2005).



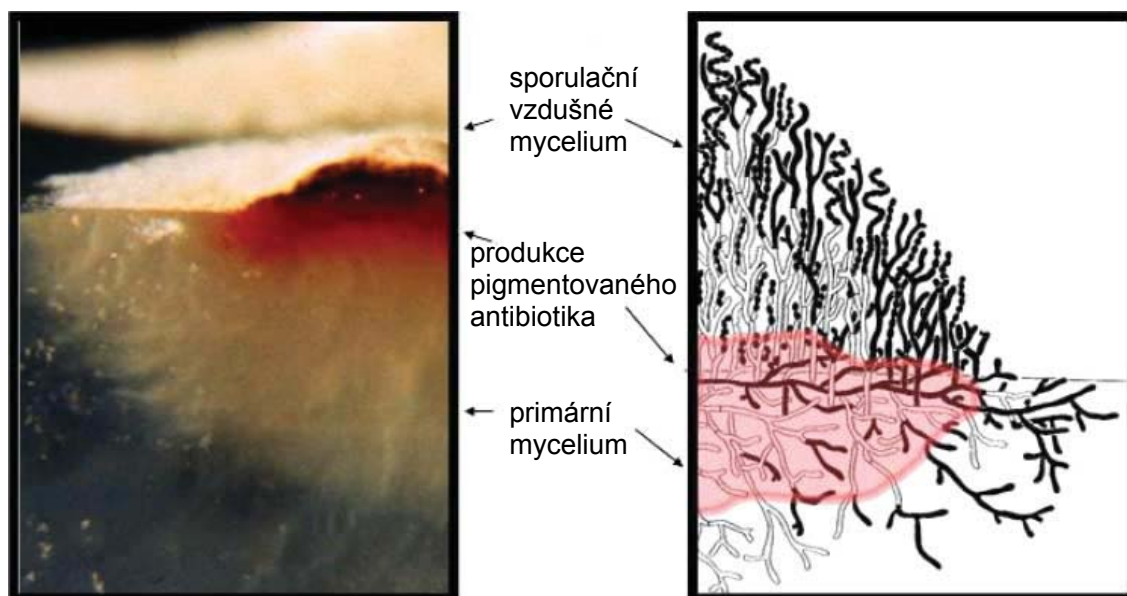
Obr.2.4: Schéma dvoufázového kultivačního systému využívajícího mikrokuličky

2.1.4. Streptomycetová kolonie

Saprofytní mikroorganismy typu streptomycet, které získávají živiny hydrolýzou nerozpustných organických polymerů v půdě si vyvinuly při tvorbě kolonií formu myceliálního růstu, která umožňuje získávání živin v poměrně širokém okolí kolonie. Tento způsob růstu však vyžaduje produkci značného počtu extracelulárních hydrolytických enzymů v poměrně vysokých koncentracích. Hyfy tvořící kolonii substrátového mycelia nejsou pohyblivé, ale mohou se rozrůstat do větších vzdáleností, nebo prorůstat organickým materiálem (HODGSON 2000). V závislosti na druhu bakterie a typu prostředí, ve kterém žije, je kolonie více či méně přichycena k podkladu. V okamžiku, kdy dojde k vyčerpání živin, v místě kolonie spouští mikroorganismy schopné myceliálního růstu různé mechanismy umožňující přesun buněk do míst s vyšší koncentrací živin. Některé aktinomycety, například nokardie, dovedou tento problém řešit fragmentací mycelia, jiné, jako *Actinoplanes*, vytváří pohyblivé zoospory. Streptomycety a řada dalších aktinomycet vytváří hydrofobní exospory, které se roznášejí do okolí kapkami vody, které se tvoří na povrchu kolonie a nebo později po vyschnutí i větrem (CHATER 1998).

Existují jasné experimentální důkazy o tom, že při vyrůstání vzdušných hyf dochází k rozrušení a hydrolýze substrátového mycelia, které se tak stává pro

diferencující vlákna zdrojem živin a stavebních kamenů pro stavbu potřebných buněčných makromolekul (viz Obr.2.5) (MANTECA *et al.* 2005). Vytvořené spory mají podstatně nižší tepelnou odolnost a méně odolávají pH změnám, na rozdíl od endospor bacilů. To nasvědčuje tomu, že spíše než jako stadium pro přežití nepříznivých podmínek slouží jako způsob rozšíření streptomycet v přírodě (HODGSON 2000).



Obr.2.5: Svislý řez kolonií streptomycet, fotografie kolonie rostoucí na agaru. Obrázek vpravo ukazuje, jak produkce antibiotika v dolní části kolonie může chránit živiny uvolněné z mrtvých buněk (bílé mycelium), aby mohly podporovat vzdušný růst a sporulaci – živé buňky jsou zobrazeny jako černé (CHATER 2006).

Způsob myceliálního růstu kolonie, která je tvořena hustou sítí vegetativních vláken, připomíná formování bakteriálních biofilmů na nejrůznějších organických i anorganických površích. Stejně jako u biofilmů je možno předpokládat, že i streptomycety mají vypracované mechanismy, kterými mohou jednotlivé druhy povrchů rozpoznávat a aktivně se k nim přichytit.

2.2. Bakteriální biofilmy

Tvorba biofilmu je univerzální strategií bakteriálního přežívání. Biofilmy jsou všudypřítomné. Biofilmy mohou být tvořeny jedním nebo více druhy bakterií. Odhaduje se, že například zubní biofilm obsahuje až 500 různých bakteriálních taxonů (MAH a O'TOOLE 2001). Nyní je dobře známo, že přítomné bakterie v biofilmu se chovají zcela jinak než jejich planktonní forma. Zejména jsou organismy v biofilmu mnohem více rezistentní na antimikrobiální látky, než jsou při planktonním růstu. Buňky existující

v biofilmu se mohou stát 10 – 1000x odolnější vůči účinkům antimikrobiálních látek. Mechanismy podílející se u biofilmů na rezistenci bakterií k antimikrobiálním látkám jsou složité a ještě ne zcela objasněné (VILAIN 2003). Tyto mechanismy zahrnují fyzikální nebo chemické difúzní bariéry, pomalý růst biofilmu z důvodu omezeného přístupu živin, aktivaci obecné stresové reakce a vznik specifického fenotypu biofilmu (MAH a O'TOOLE 2001). Jednou z charakteristických vlastností biofilmů je tvorba tzv. mezibuněčné hmoty, ta se skládá převážně z extracelulárního polysacharidu nebo matice glykokalyxu, ve které jsou bakteriální buňky uloženy (DAVIES *et al.* 1998). Tato matrice, mimo jiných funkcí má zabraňovat přístupu antibiotik k bakteriálním buňkám rostoucím v biofilmu. Ovšem podle studií MAH a kol. bylo zjištěno, že exopolysacharidová matrice netvoří neproniknutelnou bariéru proti šíření antimikrobiálních látek a musí být proto na místě ještě další mechanismy umožňující přežití buněk v biofilmu vystavenému vlivu antibakteriálních látek. Dalším ochranným mechanismem je zpomalení růstu bakterií, ke kterému dochází při přechodu z exponenciální fáze a je obecně doprovázeno zvýšením odolnosti proti antibiotikům. Mimo to jsou buňky chráněny před škodlivými účinky teplotního šoku, šoku z chladu, změn pH a mnoha jiných chemických látek. Jedním z centrálních regulátorů této odpovědi je alternativní σ faktor, RpoS. Původní myšlenka byla, že je exprimován pouze ve stacionární fázi. Nicméně nedávné studie ukazují, že exprese RpoS je spouštěna zejména při vysoké hustotě rostoucích buněk (MAH a O'TOOLE 2001).

Ve smíšených biofilmech, tvořených více zástupci bakteriálních druhů, se bakterie distribuují podle toho, která skupina může přežít nejlépe v konkrétním mikroprostředí a také na základě symbiotických vztahů mezi skupinami bakterií. Bakterie tak ve vícedruhovém biofilmu nejsou náhodně distribuovány ale spíše organizovány tak, aby to nejlépe vyhovovalo potřebám každého druhu (KOLTER a WATNICK 2000).

Při osidlování různých povrchů jsou exprimovány soubory genů, které přichycení bakterií podporují. Pokud je bakterie v médiu bohatém na živiny, tak se uchytí na jakýkoliv povrch, který je k dispozici. Zatímco pokud je v médiu chudém na živiny, bakterie se přednostně připojí na výživný povrch (KOLTER a WATNICK 2000). Tato adaptace zajišťuje, že bakterie maximalizují přístup k živinám v prostředí chudém na živiny.

Bakterie také mezi sebou určitým způsobem komunikují. Mezibuněčná komunikace mezi bakteriemi je obecně prováděna bakteriálními produkty, které jsou

schopny se šířit od jedné buňky a vstoupit na území jiných buněk. Je těžké si představit toto jako účinný prostředek komunikace mezi planktonními bakteriemi, ale je ideální jako způsob mezibuněčné signalizace pro bakterie v biofilmu (KOLTER a WATNICK 2000). V této signalizaci, která reaguje na hustotu bakteriální kultury v tvořících se biofilmech a nazývá se „quorum sensing“, se uplatňují malé molekuly známé jako acyl – homoserinové laktony (acyl – HSLS). Při dostatečné hustotě buněk dosáhnou produkované signály potřebné koncentrace pro genovou aktivaci. Význam acyl – HSLS v jednotlivých druzích biofilmů byl jasně prokázán. U *Pseudomonas aeruginosa* je acyl – HSLS zodpovědný za definování separace mezi bakteriálními sloupy v třídimenzionální struktuře biofilmu. Studie DAVIESE a kol. ukazují, že mezibuněčná signalizace je nezbytná pro diferenciaci jednotlivých buněk *P.aeruginosa* do komplexní vícebuněčné struktury (DAVIES *et al.* 1998) (KOLTER a WATNICK 2000). Méně známo je o mezibuněčné komunikaci ve vícedruhovém biofilmu. Tyto signály mohou hrát důležitou roli zejména v příznivém prostředí, kde jsou povrchy silně kolonizovány a jednotlivé populace bakterií soupeří o uchycení. Tyto signály by mohly změnit rozdělení specifického bakteriálního druhu v biofilmu, měnit expresi proteinů v sousedních buňkách, zavádět nové genetické vlastnosti do sousedních buněk nebo lákat a začleňovat další bakterie do biofilmu (KOLTER a WATNICK 2000).

Jednou z výhod bakterií rostoucích v biofilmu je možnost získat přenosné genetické elementy, zvýšenou možností horizontálního přenosu v biofilmech. Díky tomu je biofilm ideálním prostředím pro vznik nových patogenů, pro získávání antibiotické rezistence, faktorů virulence a dalších schopností pro lepší přežití v životním prostředí (KOLTER a WATNICK 2000).

Je možné pouze spekulovat, které z popsaných mechanismů se uplatňují v životě substrátových hyf ve streptomycetové kolonii. Rozhodně je možné očekávat, že struktura streptomycetové kolonie buňky chrání před účinky antibakteriálních látek produkovaných jinými konkurenčními druhy streptomycet stejně jako struktura kolonie patrně usnadňuje komunikaci mezi jednotlivými vlákny a přenos genetické informace.

2.3. Proteomové studie u streptomycet

Znalost úplné genetické informace daného organismu (genomu), získaná sekvenováním deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a určením funkce jednotlivých genů, je nepochybně velkým pokrokem, který umožní hlouběji proniknout do molekulární podstaty funkce živých systémů, což zřejmě povede i k léčbě dosud těžko překonatelných chorob. Genomika, odvětví orientující se na „přečtení“ genomu, je však pouze jedním z prostředků k naplnění těchto cílů. Genetická informace totiž hovoří především o dědičně převzatých schopnostech organismu. Proteiny, které jsou skutečnými činiteli buněčných procesů, však musí být z úrovně DNA nejprve přepsány a přeloženy, přičemž jejich syntéza a degradace (a následně jejich reálná funkce) závisí na mnoha podstatných regulačních faktorech. Pro soubor všech buněčných proteinů se v roce 1995 ujal pojem proteom jako komplementární soubor proteinů k souboru genů (genomu). Název vznikl z anglické definice „PROTEin complement able to be encoded by a given geonOME“ nebo „PROTEin equivalent of a genOME“ (WILKINS *et al.* 1996). Zatímco genom je pojmem statickým, v podstatě konstantním, proteom je pojmem dynamickým; koncentrace jednotlivých druhů proteinů se (na rozdíl od jejich genů) mění podle aktuálních potřeb organismu. Studium proteomu je proto perspektivní přístup pro výzkum základních buněčných procesů, jakými jsou diferenciace, proliferace, apoptóza a další (BOUCHAL a KUČERA 2003) (VÁŇA a ŠMARDÁ 2004). Proteomika je jednou z nově vzniklých disciplín komplexní molekulární biologie. Prodělala dynamický vývoj, který čerpá z neobyčejného rozmachu genomiky. Ten v současné době přinesl znalost kompletní sekvence genomů několika stovek prokaryotních a eukaryotních organismů. Komplexní molekulární biologie přináší další rozměr do studia molekulární podstaty života tím, že dovoluje zkoumat nejrůznější fyziologické jevy v jejich složitosti. Na rozdíl od klasické molekulární biologie nestuduje jednotlivé geny nebo jejich malé skupiny, ale dovoluje studium celých genomů a exprese jejich velkých částí v čase i prostoru a tím poznání celých komplexů fyziologických aktivit organismů. Jedna z definic proteomiky zní: proteomika je obor, který se zabývá systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identity, množství a funkcí. Obrovské množství sekvenačních dat popisujících struktury stále většího počtu genomů prokaryotních a eukaryotních organismů vyvolává potřebu efektivních a vysokokapacitních technik dovolujících přiřazení funkcí k jednotlivým genovým strukturám a odhalujících jejich vzájemnou interakci a v neposlední řadě i regulaci

jejich exprese. Takové požadavky splňuje právě proteomika, která umožňuje sledovat současně většinu proteinů v buňce nebo tkáni a určit, jak jejich identitu, tak i úroveň jejich exprese danou jejich koncentrací v čase a prostoru. V kombinaci se znalostí kompletní sekvence genomu daného organismu pak umožňuje porozumět jednotlivým funkčním a regulačním genovým sítím a kaskádám. Spolu s analýzou exprese genů na úrovni mRNA (transkriptomika) a nízkomolekulárních metabolitů a signálních molekul (metabolomika) dovoluje vytvářet komplexní modely funkce buněk a tkání jednotlivých organismů (WEISER *et al.* 2005), (CHMELIK 2005).

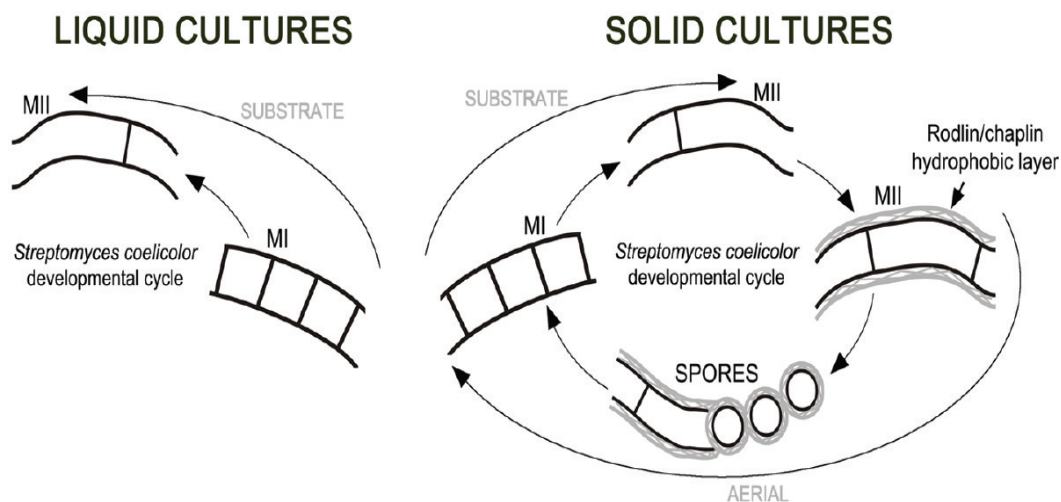
Proteomika využívá řadu technik pro separaci proteinů a jejich následnou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Mezi základní techniky stále patří dělení proteinů pomocí dvourozměrné elektroforézy v polyakrylamidových gelech. Zde primárním cílem je získání proteinové mapy - dvourozměrného obrazu znázorňujícího (v metodicky ideálním případě všechny) buněčné proteiny jako skvrny (spoty), jejichž integrální absorbance je mírou jejich koncentrace za daných podmínek. Vytvoření proteinové mapy pomocí dvourozměrné elektroforézy (2-DE), charakterizace jednotlivých proteinů, jejich identifikace v databázích a obrazová analýza 2-DE gelů umožňují provádět experimenty, při nichž je srovnáváno komplexní proteinové složení vzorku za různých podmínek (WEISER *et al.* 2005) (BOUCHAL a KUČERA 2003).

Mikrobiální proteomika představuje svěbytnou a dynamicky se rozvíjející oblast proteomiky zejména pro snadné definování zdroje proteomického vzorku. Je možné definovat dva nejrychleji se rozvíjející směry v mikrobiální proteomice. V první řadě je to výzkum patogenních mikroorganismů, kde jde jednak o identifikaci virulentních faktorů, a tím poznání molekulárních mechanismů patogenicity, a dále pak o studium interakce hostitel-patogen. Protože v centru zájmu genomiky jsou zejména bakterie, které jsou původci řady infekčních onemocnění, zvyšuje se i zájem o studium jejich proteomů. Často se využívá tzv. srovnávací proteomiky, kdy se porovnávají proteiny příbuzných patogenních a nepatogenních bakterií. Další oblastí, která je v centru zájmu mikrobiální proteomiky, jsou biotechnologie, které buď využívají bakterie k výrobě nejrůznějších produktů, zejména v potravinářském průmyslu, anebo jako producenty léčiv, zejména antibiotik, či při výrobě nových vakcín. Mikrobiální proteomika přispívá také výraznou měrou k řešení jednoho ze zásadních problémů při potírání infekčních onemocnění, kterým je široce rozšířená rezistence většiny patogenních mikroorganismů k antibiotikům. Mimo uvedené praktické aplikace je však mikrobiální proteomika v

současné době také základním systémovým prostředkem komplexní molekulární biologie při studiu bakteriální fyziologie (WEISER *et al.* 2005).

V několika komplexních proteinových studiích u *S. coelicolor* byla identifikována celá řada proteinů tvořících metabolické dráhy primárního i sekundárního metabolismu (HESKETH *et al.* 2002; LEE *et al.* 2007; MANTECA *et al.* 2006; NOVOTNA *et al.* 2003). Analýza identifikovaných proteinů ukázala, že poměr mezi počtem genů a proteinů je asi kolem 1,2, což naznačuje, že nezanedbatelná část proteinů prochází post-translačními modifikacemi. S použitím hmotnostní spektrometrie byly demonstrovány příklady *N*-acetylací, adenylací a samozřejmě i fosforylací (HESKETH *et al.* 2002; PARKER *et al.* 2010). Pro pochopení regulačních mechanismů ovládajících morfologickou diferenciaci a biosyntézu sekundárních metabolitů je cenná srovnávací proteomika. Ta dovoluje srovnávání proteomů z různých mutantů a jasně definovaných fyziologických podmínek u streptomycet a umožňuje identifikaci dříve neznámých proteinů zapojených do regulačních kaskád řídících primární i sekundární metabolismus streptomycet (WEISER *et al.* 2005) (CHOI 2010).

MANTECA a kol. například porovnávali proteomy získané z různých vývojových stádií *S.coelicolor* kultivovaných v kapalně kultuře a pevném médiu. Porovnáním proteomů z kultur v růstových fázích (Viz. Obr.2.6) vedoucích k segmentaci mycelia MI (časná fáze segmentace) a MII (pozdní fáze segmentace) z pevné a kapalně kultury zjistili, že až na několik vyjímek, rozdílně exprimované bílkoviny ukázaly podobnou relativní abundanci na pevné i kapalně půdě. Až 83 % identifikovaných proteinů z obou fází vykazovalo zhruba stejné hodnoty četnosti. Pozorovali, že stejné bílkoviny uplatňující se při biosyntéze antibiotik jsou regulovány nahoru ve fázi MII, zatímco proteiny uplatňující se v primárním metabolismu byly detekovány ve vyšším množství ve fázi MI. Nejvýznamnější rozdíly mezi proteiny z MII fáze na pevné půdě a proteiny z MII fáze v tekuté kultuře se objevily až v závěrečné fázi členění hyf a formace spor (MANTECA *et al.* 2010).



Obr.2.6: Schéma vývojových fází MI a MII u *S.coelicolor* (MI – první rozčleněné mycelium, MII – druhé mnohojaderné mycelium). (ANGEL MANTECA, 2010)

K nejdynamičtějšimu rozvoji proteomiky došlo poté, co se k dnes již klasické metodě dvourozměrné elektroforézy přidal rychlý rozvoj "měkkých" ionizačních technik hmotnostní spektrometrie, kam se řadí desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) a ionizace elektroprayem (ESI). To umožnilo nahradit gelově-založené techniky separace proteinů řadou moderních chromatografických technik nebo jejich kombinací s 2-DE (GSTAIGER a AEBERSOLD 2009; HU *et al.* 2009). Nicméně i u těchto technologií je zcela zásadní správná příprava proteinového vzorku a jeho reprodukovatelné získávání.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Bakteriální kmeny

Streptomyces granaticolor, *Streptomyces coelicolor* A3(2) a *Streptomyces ambofaciens* byly získány ze sbírek Mikrobiologického ústavu AV ČR.

3.1.2. Kultivační média

Medium „8“

Yeast extrakt	4 g
Malt extrakt	10 g
Glukosa	4 g
Agar	25 g
H ₂ O	1 l

- před sterilizací upravit pH na 7,2 pomocí pH papírků (pH-Fix 4,5 – 10,0 MACHEREY – NAGEL; pH Test Strips 6,0 – 7,7 SIGMA).

- do média „8“ byla používána vodovodní voda.

Medium MG - minimální medium

dH ₂ O	800 ml
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,001 g
NaCl	0,001 g
Stopové prvky	4,5 ml
Glutamát	11,23 g
Fosfátový pufr, pH 6,5	15 ml

- doplnit H₂O do 1 l

Maltóza 50 g do 200 ml H₂O

- přidávat do média po sterilizaci

Stopové prvky

Cu₂SO₄ . 5 H₂O 0,039 g

Kyselina boritá	0,0057 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,0037 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0061 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,88 g
H_2O	1 l

- přidávat do média po sterilizaci

Fosfátový pufr

1M KH_2PO_4	13,609 g do 100 ml H_2O
1M K_2HPO_4	17,418 g do 100 ml H_2O

- smíchat 28,8 ml 1M K_2HPO_4 s 72,2 ml 1M KH_2PO_4 , změřit na pH metru a upravit připravený roztok na pH 6,5

- autoklávkovat zvlášť základní roztok **MG**, stopové prvky a maltózu

- smíchat roztok **MG** (800 ml), 4,5 ml stopových prvků a maltózu (200 ml)

Médium SFM – sporulační médium

sojová mouka	20 g
manitol	20 g
agar	20 g

Smíchá se 20 g sojové mouky s 600 ml vodovodní vody a mouka se povaří za stálého míchání 1 hod. Poté se přilije manitol (20 g manitolu v 400 ml vody). Směs se nechá 15 min. povařit. Mouka se nechá sedimentovat na dno a do připravené čisté sklenice s agarem se slije vzniklá směs bez sedimentu.

3.1.3. Pufry a roztoky

3.1.3.1. Pufry a roztoky pro izolaci proteinů

Fyziologický roztok

NaCl	9 g
d H_2O	1 l

Lyzační pufr

Tris	0,6 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,47 g

KCl 0,75 g

- dH₂O doplnit do 100 ml

- upravit pH na 7,4

- přidat DTT 0,1543 g

50% TCA

TCA 25 g

dH₂O 37,5 ml

Fosfátový pufr

Níže uvedené navážky jsou počítány na 100 ml H₂O:

0,1M NaH₂PO₄ 1,56 g

0,1M Na₂HPO₄ 3,58 g

Smíchat 51 ml NaH₂PO₄ a 49 ml Na₂HPO₄. Výsledné pH pufru je 6,8.

3.1.3.2. Pufry pro dvourozměrnou elektroforézu

Vzorkový pufr (1 ml)

7M Močovina 420,7 mg

2M Thiomočovina 152,2 mg

4% CHAPS 40 mg

1% Amfoliny (3 – 10) 10 µl

DTT 10 mg

- přidat na špičku špachtle bromfenolovou modř

- ddH₂O do 1 ml

30% Akrylamid mix

Akrylamid 60 g

Bisakrylamide 1,6 g

ddH₂O 200 ml

pufr Tris – HCl 1,5 M (pH 8,8)

Tris 36,3 g

- upravit pH na 8,8

- ddH₂O doplnit do 200 ml

10% SDS

SDS	10 g
ddH ₂ O	100 ml

10% Amonium persulfát

APS	0,1 g
ddH ₂ O	1 ml

- roztok musí být připraven vždy čerstvý

Equilibrační roztok

0,5 M Tris HCl pH 6,8	100 ml
Močovina	360 g
Glycerol (99%)	300 ml
10% SDS	200 ml

- doplnit ddH₂O do 1000 ml

DTT

DTT	0,12 g
Equilibrační roztok	12 ml

IAA

IAA	0,3 g
Equilibrační roztok	12 ml

0,5 M Tris HCl pH 6,8

Tris	61 g
------	------

- upravit pH na 6,8

- doplnit ddH₂O do 1000 ml

0,5% Agarosa

Agarosa	0,5 g
1x Tank pufr	100 ml

10x Tank pufr

Tris	30,28 g
Glycin	144,13 g
SDS	10 g
dH ₂ O	1 l

1x Tank pufr

10x Tank pufr	100 ml
dH ₂ O	900 ml

3.1.3.3. Roztoky pro barvení stříbrem

Fixační roztok I

Etanol	140 ml
Kyselina octová	35 ml
- ddH ₂ O doplnit do 350 ml	

Fixační roztok II

Potassium tetrathionate	0,875 g
Acetát sodný	23,8 g
Etanol	105 ml
50% glutaraldehyd	3,5 ml
- ddH ₂ O doplnit do 350 ml	

Roztok dusičnanu stříbrného

Dusičnan stříbrný	0,7 g
Formaldehyd	87,5 µl
- ddH ₂ O doplnit do 350 ml	

Vyvolávací roztok

Uhličitan sodný	10,5 g
Thiosulfát sodný	2,63 mg
Formaldehyd	52,5 µl
- ddH ₂ O doplnit do 350 ml	

Stopovací roztok

99% kyselina octová 5 ml
- ddH₂O doplnit do 500 ml

Roztok 2% glycerolu

100% glycerol 8 ml
- ddH₂O doplnit do 400 ml

3.1.4. Chemikálie a kity

<i>Chemikálie</i>	<i>firma</i>	<i>zkratka</i>
Aceton	MERCK	
Akrylamid	SERVA	
Agar	OXOID	
Agarosa	SIGMA	
Amfoliny	SIGMA	
Benzonase	MERCK	
Bisakrylamid	SERVA	
Bromfenolová modř	MERCK	
Complete, Mini	ROCHE	
Dihydrogenfosforečnan sodný	MERCK	
Dithiothreitol, p.a.	SERVA	DTT
Dodecylsulfát sodný, p.a.	SERVA	SDS
Dusičnan stříbrný	PENTA	
Etanol	MERCK	
Formaldehyd	SIGMA	
Glukosa	SERVA	
Glutamát	SIGMA	
Glutaraldehyd	SIGMA	
Glycerol	AMERSHAM	
Glycin	SERVA	
Hydrogenfosforečnan draselný	LACHEMA	
Hydrogenfosforečnan sodný	MERCK	

Hydroxid sodný	MERCK	
CHAPS	SERVA	
Chlorid draselný	LACHEMA	
Chlorid sodný	LACHEMA	
Iodoacetamid	SIGMA	IAA
Kyselina boritá	MERCK	
Kyselina chlorovodíková	LACHEMA	
Kyselina octová	LACHNER	
Kyselina trichloroctová	SERVA	
Lysozym	CALBIOCHEM	
Malt extrakt	DIFCO	
Maltosa	MERCK	
Manitol	SIGMA	
Minerální olej	AMERSHAM	
Močovina	APPLICHEM	
N,N,N',N' - tetramethyldiamin	SERVA	TEMED
Persíran sodný	SIGMA	APS
Potassium carbonate	FLUKA	
Potassium tetrathionate	FLUKA	
Síran hořečnatý	LACHEMA	
Síran manganatý	LACHEMA	
Síran měďnatý	LACHEMA	
Síran zinečnatý	LACHEMA	
Sodium acetate	SIGMA	
Sodium thiosulfáte	APPLICHEM	
Sojová mouka	OXOID U.K.	
Thiomočovina	SIGMA	
Tris	APPLICHEM	
Tris HCl	SERVA	
Yeast extrakt	OXOID	

Kity

BCA protein assay kit (PIERCE)

Ready Prep™ 2-D Cleanup Kit (BIORAD)

3.1.5. Přístroje

Laminární box Aura mini – BioAir (Eurolone Division)

Spektrofotometr

DU 730 Life Science UV/VIS Spectrophotometer (BECKMAN COULTER)

Binokulární lupa

Binokulární digitální lupa NATIONAL (Motic Group Co. Ltd., China)

Mikroskopy

Digitální mikroskop Motic BA 300 s fázovým kontrastem (Motic Group Co. Ltd., China)

AQUASEM rastrovací elektronový mikroskop (TESCAN Ltd., Česká Republika)

Centrifugy

Hermle Z160M

Biofuge A (HERAEUS SEPATECH)

Zentrifugen universal 320R (HETTICH)

MICROSPIN 24S Sorvall Instruments oupont

Váhy

Kern 572

Sartorius analytic A200S

Vortexy, míchače, kývače

Rocker 25 (LABNET)

Magnetic stirrer MM5 (POLAMED)

Rotační třepačka HT INFORS AG CH – 4103 (BOTTMINGEN)

Biosan multi-shaker PSU 20

Vortex genie (BENDER HOBEIN AG)

Vortex mixer SA8 (STUART)

pH metr

Seven Easy (METTLER TOLEDO)

Nastavitelné mechanické pipety Gilson

Vybavení pro elektroforézu

Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL (AMERSHAM BIOSCIENCES)

Power Supply 2197 (LKB BROMMA)

Electrophoresis Power Supply EPS 301 (AMERSHAM BIOSCIENCES)

Vana pro 1. rozměr elektroforézy Multiphor II (Pharmacia Biotech)

Vana pro 2. rozměr elektroforézy SE600AA (Hoeffer)

Sušička gelů SCIE-PLAS GEL DRYER, MODEL: GD 4534

3.1.6. Mikrokuličky

Skleněné mikrokuličky (balotina) č.10 vyráběné firmou ORNELA a.s. (Desná v Jizerských horách) jako reflexní aditivum do silničních barev byly o velikosti 265-325 μm .

Zirkoniové mikrokuličky (zirconia/silica beads) od firmy BioSpec Inc. (USA) byly vyrobeny o velikosti 500 μm .

3.2. Metody kultivace

3.2.1. Kultivace *Streptomyces granaticolor* v tekutém médiu

Sporami z glycerolek byla zaočkována Erlenmayerova baňka s médiem „8“. Pro zaočkování byl používán vždy stejný poměr tzn. 3 μl spor na 3,5 ml média. Kultivace probíhala při 30°C na rotační třepačce (160 rpm) 24 h. Tato baňka byla používána jako předkultura pro kultivaci na mikrokuličkách i pro kultivaci v tekutém médiu „8“ pro 2D elektroforézu.

Pro 2D elektroforézu bylo očkováno 7,5 ml mycelia z předkultury do 17,5 ml média „8“ v 250 ml Erlenmayerově baňce. Kultivace probíhala při 30°C na rotační třepačce (160 rpm) po dobu 6 h.

3.2.2. Kultivace *Streptomyces granaticolor* na mikro-kuličkách

Používaný kultivační systém podporující diferenciaci streptomycet je dvoufázový. Tekutou fází představuje komplexní médium a jako pevná fáze, která umožňuje povrchový růst byly použity skleněné a zirkoniové mikrokuličky. Mikrokuličky byly před použitím vždy vyprány v 0,1 N HCl a důkladně promyty

destilovanou vodou. Do skleněných zkumavek bylo odměřeno po 10 ml mikrokuliček a byly vysterilizovány.

Pro jeden vzorek na 2D elektroforézu byly zaočkovány dvě velké umělohmotné Petriho misky (průměr 8 cm). Do jedné sterilní misky se nasypalo 30 ml mikrokuliček (skleněných nebo zirkoniových) a pipetovala se suspenze 1 l média „8“ s myceliem. Suspenze vznikla smícháním 7,7 ml média „8“ a 3,3 ml mycelia z předkultury.

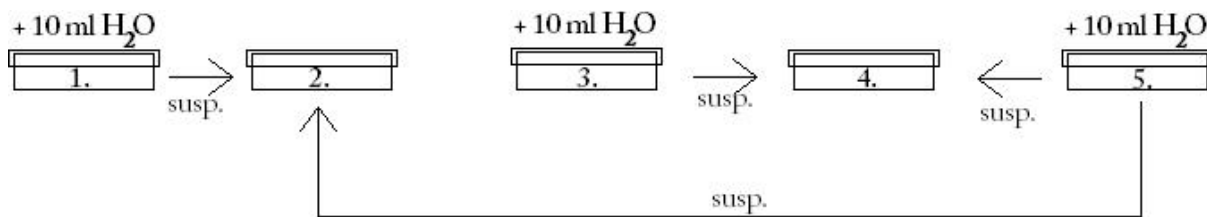
Kultivace misek probíhala ve „vlhké komůrce“ (větší miska s navlhčenou buničinou), což zabraňuje vysychání kultury rostoucí na mikrokuličkách při 28 °C.

3.2.3. Příprava glycerolové konzervy

Z glycerolové konzervy byla pomocí sterilního párátko zaočkována jedna Petriho miska se SFM médiem následujícím způsobem: pipetou bylo odebráno 5-10 µl spor a párátkem rozočkováno na agaru. Kultivace probíhala 24 h při teplotě 28° C.

Z misky s narostlou kulturou streptomycet bylo očkováno dalších 5 nových misek. Za pomoci párátko byla jeho plochou stranou setřena část kolonií z misky a druhým párátkem pak byla tato část kolonií jemně rozetřena mezi těmito dvěma párátky a očkována na každou misku. Kultivace probíhala v termostatu při 28° C po dobu 7 dní.

Po kultivaci byly narostlé misky položeny vedle sebe a označeny čísly 1. – 5. Do 1., 3., a 5. misky bylo pipetováno 10 ml sterilní destilované vody. Pomocí kličky byly v 1., 3. a 5. misce z povrchu agaru seškrábány spory s myceliem a byla utvořena suspenze (destilovaná voda + mycelium, spory). Suspenze z misky č.1 byla pipetována do misky č. 2 a z misky č.3 do misky č.4. (viz. Obr.3.1). V miskách č. 2 a 4 byly také seškrábány spory s myceliem a suspenze se tím mírně zahustila. Z misky č. 5 byla suspenze rozdělena do misek č. 2 a 4. Vzniklá suspenze byla z misek č. 2 a 4 pipetována do filtračních zkumavek, kde byly spory přefiltrovány na dno zkumavky a mycelium zůstalo ve vatě – filtrace se provádí na ledu.



Obr.3.1: Schéma vzniku sporové suspenze

Do 1., 3. a 5. misky bylo pipetováno 5 ml sterilní destilované vody a byl proveden podruhé stejný postup k získání druhé části suspenze. Suspenze byla opět převedena do filtračních zkumavek a přefiltrována.

Přefiltrovaná suspenze byla přelita do sterilní zkumavky a centrifugována 10 min, při 4000 rpm a teplotě 4° C (centrifuga HETTICH UNIVERSAL 320R). Supernatant byl opatrně odebrán a ke sporám (sedimentu) byl přidán 1 ml 30% glycerolu, v němž byla směs resuspendována a následně rozdělena do Eppendorf zkumavek.

Glycerolové konzervy se uchovávaly zamražené za teploty – 20° C.

3.3. Mikroskopie

3.3.1. Binokulární lupa

Binokulární digitální lupa NATIONAL (Motic Group Co. Ltd, China) byla použita pro morfologické studie u *S. granaticolor*, *S. coelicolor* a *S. ambofaciens* při růstu na pevném médiu, skleněných a zirkoniových mikrokuličkách.

3.3.2. Optická mikroskopie

Pro sledování růstu a pro kontrolu čistoty kultury při dlouhodobějších kultivacích byly kmeny streptomycet pozorovány v digitálním mikroskopu Motic BA 300 s fázovým kontrastem (Motic Group Co. Ltd, China).

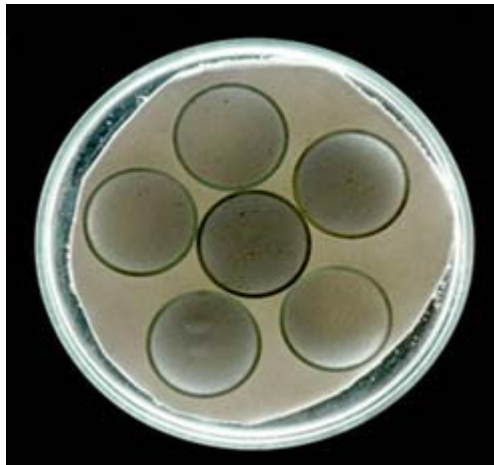
3.3.3. Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) byla použita pro studium morfologie diferenciačních stádií u *S. granaticolor* a *S. ambofaciens*.

3.3.3.1. Příprava vzorků

Na dno velké skleněné Petriho misky byly umístěny 3 vrstvy filtračního papíru a na ně skleněné mističky (vysoké 1 cm, o průměru 2 cm) (viz Obr.3.2), vše se nechalo vysterilizovat. Do jedné mističky bylo nasypáno 2 ml mikrokuliček a napipetovaná suspenze média „8“ a mycelia. Suspenze vznikla smícháním 800 μ l média „8“ a 50 μ l mycelia z předkultury (24 h). Před kultivací byl filtrační papír zvlhčen sterilní vodou. To zabraňovalo vysychání kultury rostoucí na mikrokuličkách. Kultivace *S.ambofaciens* probíhala ve vlhké komůrce 22 h, 48 h a 72 h při 28° C. Kultivace *S.granaticolor* probíhala ve vlhké komůrce 6 h, 24 h a 48h při 28° C. Příprava vzorku probíhala za sterilních podmínek.

Další příprava vzorků probíhala podle modifikovaného postupu popsaného v Kofroňová et al. (2002) s tím, že krok používající nízko-tuhnoucí agarózu byl vypuštěn a celá mistička byla převedena do exikátoru s Petriho miskou obsahující 2% roztok osmia. Po zhruba 14 dnech byly celé mističky pozorovány v AQUASEM rastrovacím elektronovém mikroskopu (TESCAN Ltd., Česká Republika) při 15 kV.



Obr. 3.2: Materiál a příprava vzorků pro analýzu SEM. Petriho misky s filtračním papírem a šest skleněných mističek naplněných skleněnými nebo zirkoniovými mikrokuličkami, připravených pro očkování.

3.4. Dvourozměrná elektroforéza (2DE)

Stručný popis metody

Dvourozměrná elektroforéza slouží k dělení komplexních směsí rozpustných proteinů. Prvním rozměrem je izoelektrická fokusace, tj. separace proteinů podle jejich

izoelektrických bodů (pI). K rozdělení dochází v elektrickém poli v prostředí ionizovaných látek, které vytvářejí pH gradient. Druhý rozměr tvoří polyakrylamidový gel s obsahem dodecylsulfátu sodného, ve kterém dochází k rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti (M_r). Díky kombinaci dvou efektivních technik může dvourozměrná elektroforéza rozdělit tisíce polypeptidových skvrn na jednom dvourozměrném gelu oproti maximálně padesáti skvrnám, jež lze získat při dělení v jednom rozměru.

3.4.1. Příprava proteinových vzorků

Po kultivaci v tekutém médiu byla kultura převedena do zkumavky a centrifugována 15 min/9000 rpm/4°C (HETTICH UNIVERSAL 320 R). Supernatant byl odebrán a k peletu bylo přidáno 20 ml fyziologického roztoku a opět centrifugováno 10 min/9000 rpm/4°C. Promytí peletu fyziologickým roztokem bylo prováděno celkem 3x. Poté bylo ke vzorku z kultivace na tekutém médiu přidáno 10 ml skleněných mikrokuliček a buňky byly rozbíjeny třením po dobu 3 x 6 min. na ledu.

Při kultivaci na skleněných či zirkoniových mikrokuličkách byla převedena narostlá kultura i s kuličkami do zkumavek a taktéž byla 3x promyta fyziologickým roztokem výše uvedeným způsobem. Promytím vzorku byly odstraněny nežádoucí látky z média „8“, které by mohly způsobovat interferenci při 2D elektroforéze.

Po promytí byl celý vzorek převeden do třecí misky. Bylo přidáno 4 ml lyzačního pufru, 20 μ l „complete mini“ kitu (100x), 0,4 μ l benzonázy, špetka lysozymu a následovala inkubace 10 min. na ledu. Poté byly buňky rozbíjeny třením po dobu 3 x 6 min. na ledu.

Směs byla převedena do zkumavky, stěna třecí misky byla opláchnuta 2 ml lyzačního pufru a následovala centrifugace 5 min/5000 rpm/4°C (HETTICH UNIVERSAL 320 R), veškeré následující centrifugace byly prováděny v této centrifuze). Vzniklý supernatant byl převeden do nové zkumavky. K peletu bylo přidáno 5 ml lyzačního pufru, jímž byl pelet propláchnut. Po opětovné centrifugaci 5 min/5000 rpm/4°C byl supernatant odebrán a spojen s předchozím supernatantem. Centrifugací obou spojených supernatantů byly odstraněny hrubé nečistoty, které byly usazeny na dně zkumavky. Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a byl změřen jeho objem. Podle poměru 15 μ l 50% TCA na 105 μ l vzorku bylo přidáno odpovídající množství 50% TCA a proteiny byly sráženy 1 hodinu na ledu.

Po inkubaci byly zkumavky centrifugovány 15 min/9000 rpm./4°C, supernatant byl odebrán a k peletu bylo přidáno cca 400 µl ledového acetonu. Po centrifugaci 10 min/9000 rpm/4°C byl aceton odpipetován a nechán odtékat. Nakonec bylo přidáno cca 400 µl fosfátového pufru a vzorek byl solubilizován. Množství acetonu a fosfátového pufru bylo přidáváno podle velikosti peletu.

Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena pomocí komerčního kitu BCA Protein Assay (Pierce).

Vzorek byl pročištěn komerčním kitem Ready Prep™ 2-D Cleanup Kit (BIORAD). Předpokládali jsme, že se při pročišťování vzorku se ztratí asi polovina proteinů. Pracovali jsme tedy s cca 200 µg proteinů ve 100 µl fosfátového pufru.

Po pročištění byl vzorek obsahující cca 100 µg proteinů ve formě peletu rozpuštěn ve 250 µl vzorkového pufru a po 1 h solubilizace při pokojové teplotě byl vzorek připraven pro 2D elektroforézu.

3.4.2. Isoelektrická fokusace

Po solubilizaci vzorků ve vzorkovém pufru pro 2D elektroforézu byly vzorky nasáknuty do komerčních IPG proužků s imobilizovaným gradientem pH 4-7, (délka 13 cm). Rehydratace byla prováděna přes noc. Aby se předešlo případnému vyschnutí IPG proužku se vzorkem, byl každý proužek převrstven 2 ml minerálního oleje. Druhý den probíhala isoelektrická fokusace. Elektroforéza běžela za těchto podmínek:

Krok	Napětí	El.proud	Energie	El.výkon	Čas
1	150 V	1 mA	5 W	1 Vh	
2	150 V	1 mA	5 W	300 Vh	2 h
3	300 V	1 mA	5 W	1 Vh	
4	300 V	1 mA	5 W	600 Vh	2 h
5	3500 V	1 mA	5 W	10 Vh	5 h
6	3500 V	1 mA	5 W	60 Vh	17,1 h
Celkově	-	-	-	70900 Vh	26,1 h

Po skončení elektroforézy byly jednotlivé proužky vyjmuty, přebytečný olej odstraněn a následovala equilibrace, nebo mohly být IPG proužky zamrazeny v Petriho misce na několik dní až měsíců.

3.4.3. SDS elektroforéza

Před samotným provedením druhého rozměru byla provedena rovnováha. Každý IPG proužek byl rovnovážen 10 minut v 6 ml DTT roztoku a 10 minut v 6 ml IAA roztoku s bromfenolovou modří.

Po rovnováze byly proužky umístěny do elektroforetického zařízení Hoefer SE600 (Hoefer Inc., USA) s předem připravenými deskovými gely (16 cm; 1,5 mm 10%) a ke každé dvojici gelů bylo přidáno 5 μ l molekulového standardu MW Fermentas 621 na filtračním papíru. Gely byly převrstveny 0,5% roztokem teplé agarosy, po jejím ztuhnutí vloženy do elektroforetické aparatury a přelity pufrem. Spuštění elektroforézy bylo postupné, nejdříve byl zdroj nastaven cca 20 minut na 10 mA a poté, co dosáhla bromfenolová modř dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 80 mA a proces běžel přibližně 4 hodiny.

3.4.4. Barvení a sušení gelů

Po skončení dělení proteinů ve druhém rozměru byl gel přenesen do umělohmotné vaničky a zalit fixačním roztokem I, ve kterém byl třepán po dobu 1 hodiny nebo přes noc. Dále byl gel fixován fixačním roztokem II, ve kterém byl třepán 1 hodinu nebo přes noc. Po slití fixačního roztoku II byl gel přelit deionizovanou vodou, která byla vyměněna 4x po 15 min. Ke gelu byl přidán roztok dusičnanu stříbrného na minimálně 30 min. až po několik hodin. Následovalo promytí gelu deionizovanou vodou po dobu 1 min. Ke gelu byl přidán vyvolávací roztok, který byl slit nejdéle po 30 min. vyvolávání. Poté byl gel dán do zastavovacího roztoku na 10 minut. Obarvený gel byl umístěn do 2% glycerolu, ve kterém mohl být skladován až po několik měsíců při 4° C. Barvení gelu probíhalo za pokojové teploty.

Gel byl vložen mezi filtrační papír a potravinovou folii a sušen 1 hodinu při 80°C na vakuové sušičce.

3.4.5. Snímání a digitalizace gelových obrazů

Stříbrem obarvené gely byly skenovány na scanneru HP 420 (Hewlett Packard, USA). Před snímáním každé série byla provedena kalibrace scanneru a nastaveno optimální rozmezí OD pro eliminaci saturovaných spotů. Snímky byly uloženy ve speciálním formátu kompatibilním s PDQuest (BioRad) programem. V programu PDQuest bylo možno soubory převést do běžných formátů „TIFF“ nebo „JPG“.

3.4.6. Počítačová analýza gelových obrazů

Analýza získaných proteomů byla provedena v programu PDQuest verze 7.1.0. (Biorad). Pro každý experimentální vzorek byly vyhotoveny ve dvou nezávislých pokusech 4 gely tvořící skupinu. Jednotlivé skupiny byly mezi sebou porovnávány v tzv. „Matchsetu“. Matchset umožnil vytvoření jednoho „Mastergelu“. Mastergel je imaginární gel tvořený všemi proteiny ze všech jednotlivých gelů. Každý protein dostal programem přiděleno číslo. Stejné proteiny byly srovnány a spojeny – označeny stejným číslem na všech gelech kde se vyskytovaly. Po kompletním zpracování Matchsetu bylo možno porovnávat mezi sebou jednotlivé skupiny gelů. Porovnávání bylo provedeno dvěma typy analýz. **Kvalitativní** analýzou- tedy zda se protein vyskytuje či nevyskytuje za dané podmínky oproti jiné podmínce. **Kvantitativní** analýzou - tedy proteiny vyskytující se za obou experimentálních podmínek, ale lišící se koncentrací (expresí/denzitou skvrn). Pro všechny analýzy bylo kvantitativní kritérium stanoveno na 4násobnou změnu koncentrace (tedy za jedné podmínky byla koncentrace 4x vyšší nebo nižší než za druhé podmínky).

3.4.7. Statistické analýzy

Pro správnější interpretaci analýz byl použit studentův t-test. Tímto testem byly vyloučeny odlehle hodnoty, nebo velké diference ve skupinách.

3.5. Kvantifikace produkce granaticinu

Pro kvantifikaci granaticinu byla použita předkultura, která byla připravena za stejných podmínek, jako předkultura pro 2D elektroforézu (viz postup 3.2.1.), která byla ale kultivována v médiu „MG“, které podporuje produkci antibiotika. Po kultivaci byla provedena centrifugace předkultury 15 min./ 9000 rpm./ 4°C (HETTICH UNIVERSAL 320 R). Po odebrání supernatantu bylo mycelium resuspendováno v 5 ml média „MG“ .

Aby kultivace *S. granaticolor* probíhala za stejných podmínek, bylo do všech tří různých typů kultivací zaočkováno mycelium ve stejných poměrech. Do jedné 100 ml Erlenmayerovi baňky bylo zaočkováno 570 µl mycelia do 10 ml média „MG“ a kultivace probíhala na rotační třepačce při 160 rpm, 30°C po dobu 3 dnů. Ve stejném poměru byly zaočkovány i tři malé Petriho misky se zirkoniovými mikrokuličkami a tři

malé Petriho misky se skleněnými mikrokuličkami. Do jedné sterilní misky se tedy nasypalo 10 ml mikrokuliček (skleněných nebo zirkoniových) a pipetovala suspenze 3,5 ml média „MG“ s 200 μ l mycelia.

Kultivace misek probíhala ve vlhké komůrce, což zabraňovalo vysychání kultury rostoucí na kuličkách při 28 °C, po dobu 4 dnů.

Po kultivaci bylo do 100 ml kultury *S. granaticolor* rostoucí v baňce s médiem „MG“ přidáno 30 ml sterilní destilované vody. V případě kultivace na mikrokuličkách byl obsah každé misky převeden do 100 ml baňky a bylo k němu přidáno 10 ml sterilní destilované vody. Všechny baňky byly umístěny na rotační třepačku a třepány při 160 rpm (BIOSAN MULTI-SHAKER PSU 20) a pokojové teplotě po dobu 24 h. Po extrakci granaticinu do destilované vody bylo z každé baňky odebráno po 1,5 ml do Eppendorf zkumavky. Zkumavky byly následně centrifugovány 10 min./ 13 000 rpm (Biofuge A HERAEUS SEPATECH). Po centrifugaci bylo odebráno z každé zkumavky po 1 ml supernatantu do nové Eppendorf zkumavky a byla změřena absorbance granaticinu při 572 nm. Koncentrace granaticinu v 1 ml byla pak vypočtena s použitím hodnoty molárního extinkčního koeficientu 22 800 (BRABBAN a EDWARDS 1996) podle vzorce $A=\epsilon C$, kde A je absorbance vzorku, ϵ molární extinkční koeficient a C koncentrace pro 1 cm kyvetu. Zbylá kultivační směs byla převedena do 50 ml zkumavky a bylo k ní přidáno 2 ml lyzačního pufru, 10 μ l complete mini (100x) a 0,2 μ l benzonázy. Do kultivační směsi bez mikrokuliček bylo přidáno 4 ml lyzačního pufru, 20 μ l complete mini (100x) a 0,4 μ l benzonázy. Následovala izolace proteinů ze směsi dle postupu 3.4.1. Izolace proteinů byla provedena z kultivace na tekutém médiu a z kultivace na skleněných či zirkoniových mikrokuličkách, kdy byly spojeny všechny 3 malé Petriho misky se skleněnými a zirkoniovými mikrokuličkami v třecí misce a kultura byla třením dezintegrována. Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena pomocí komerčního kitu BCA Protein Assay (Pierce).

4. VÝSLEDKY

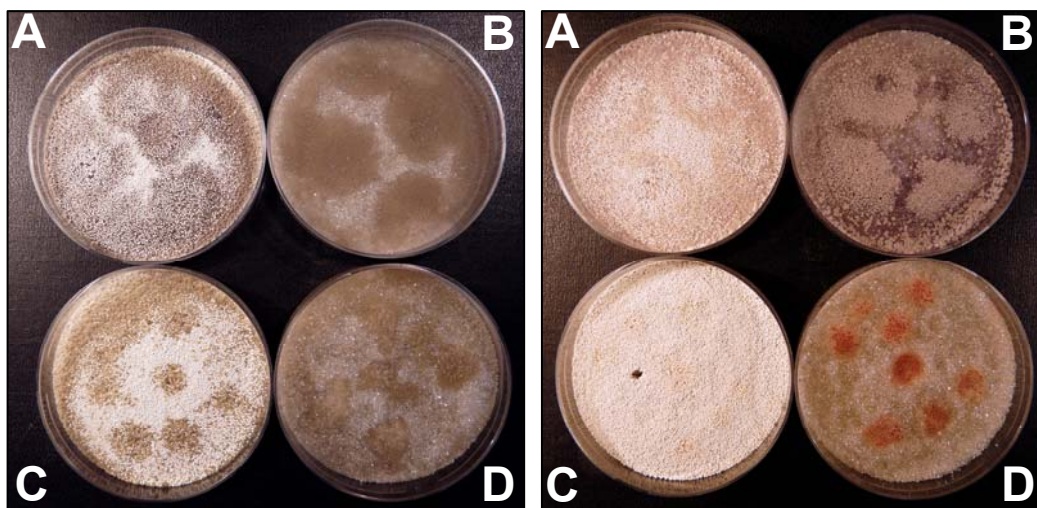
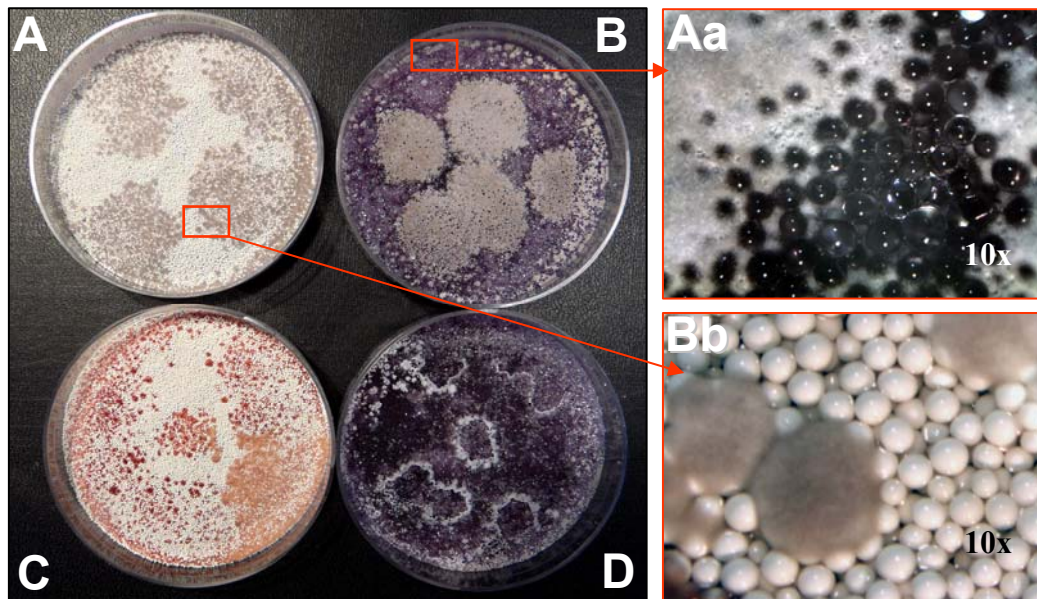
4.1. Morfologická a biochemická diferenciacie streptomycet na mikrokuličkách

4.1.1. Srovnání sporulace a tvorby pigmentovaných antibiotik streptomycet na skleněných a zirkoniových kuličkách

Tři druhy streptomycet byly kultivovány na povrchu skleněných a zirkoniových kuliček ve dvoufázovém kultivačním systému popsaném v kapitole 3. Materiál a metody. Použité druhy *S. granaticolor*, *S. coelicolor* a *S. ambofaciens* byly očkovány ve formě sporové suspenze nebo přes noc narostlého mycelia. Pro všechny kultivace bylo použito médium „8“ a misky byly kultivovány při teplotě 28° C ve vlhké komůrce po dobu 4 dnů. Obrázek 4.1 ukazuje výsledek kultivace. V miskách A a C byly použity zirkoniové kuličky, v miskách B a D pak skleněné kuličky. Do misek A a B bylo očkováno suspenzí mycelia z předkultury a do misek C a D sporovou suspenzí. Obrázek ukazuje rozdíly v morfologické diferenciaci a v produkci pigmentovaných antibiotik, které vyplývají z růstové rychlosti jednotlivých druhů. Druhy je možné řadit od nejrychleji rostoucího k nejpomalejšímu v pořadí *S. granaticolor*, *S. coelicolor*, *S. ambofaciens*. Dalším rozdílem je efekt použitého inokula, který není příliš významný a opět se liší mezi jednotlivými druhy. Za nejvýznamnější rozdíly je možné považovat ty, které souvisí s materiálem použitých kuliček. Zřetelně se ukázalo, že jak nárůst, tak tvorba pigmentovaných antibiotik je podstatně silnější na skleněných než na zirkoniových kuličkách. V případě *S. granaticolor* je zřejmé, že materiál kuliček ovlivňuje metabolismus streptomycet, což se mimo jiné projevuje odlišným pH kultury, to je indikováno změnou barvy granaticinu mezi červenou a modrou (pigmentované antibiotikum chovající se jako acido-bazický indikátor).

Dalším rozdílem je i tvar a velikost kolonií na jednotlivých miskách v závislosti na materiálu mikrokuliček. Tento rozdíl je patrný při větším zvětšení konkrétně na obrázcích 4.1 Aa a Bb z pozorování v digitální mikro-lupě. Na obrázku Aa jsou kolonie více homogenní, rozprostřené po větší ploše skleněných kuliček. Kdežto na obrázku Bb při kultivaci na zirkoniových kuličkách tvoří kolonie menší ohraničené chomáčky na mnoha místech misky a jsou od sebe více oddělené.

S. granaticolor



S. ambofaciens

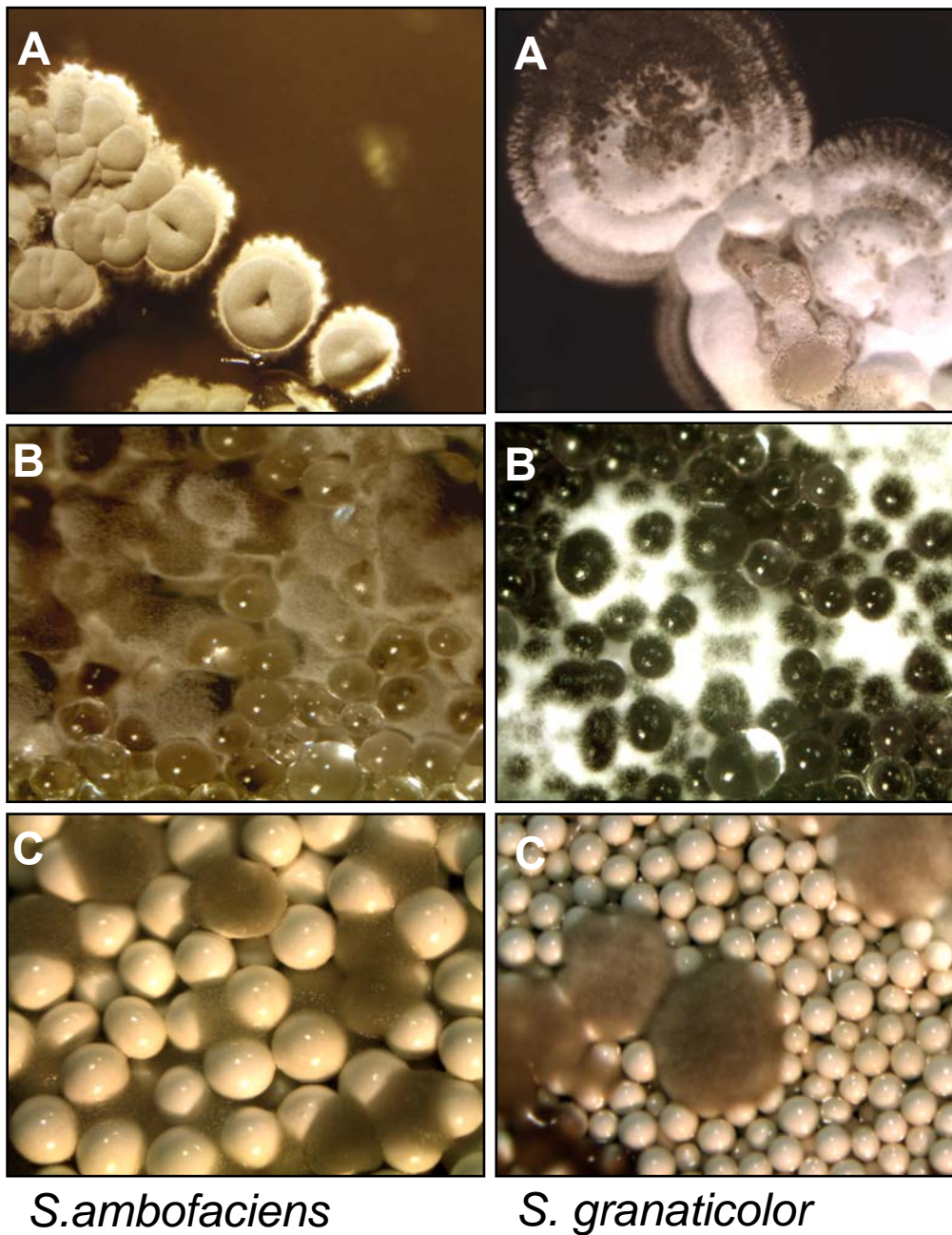
S. coelicolor

Obr.4.1: Kultivace *S. granaticolor*, *S. ambofaciens* a *S. coelicolor* na skleněných (B a D) a zirkoniových kuličkách (A a C) 4 dny. K inokulaci byla použita suspenze spor (C a D) nebo suspenze vegetativního mycelia (A a B).

4.1.2. Tvorba kolonií streptomycet na různých površích

V další fázi jsme se omezili na druhy *S. granaticolor* a *S. ambofaciens* a sledovali jsme tvorbu jejich kolonií na různých površích. Srovnali jsme kolonie na agaru skleněných a zirkoniových kuličkách a ve všech případech jsme použili půdu „8“. Kultivace probíhala 4 dny při 28° C. Na obrázku 4.2 je vidět, že tvorba kolonií na agaru (A), skle (B) a zirkoniu (C) je rozdílná. Je zcela zřejmé, že oba druhy rostou lépe na skle

a navíc kolonie zejména v případě *S. granaticolor* jsou podstatně homogennější na mikrokuličkách než na agaru.

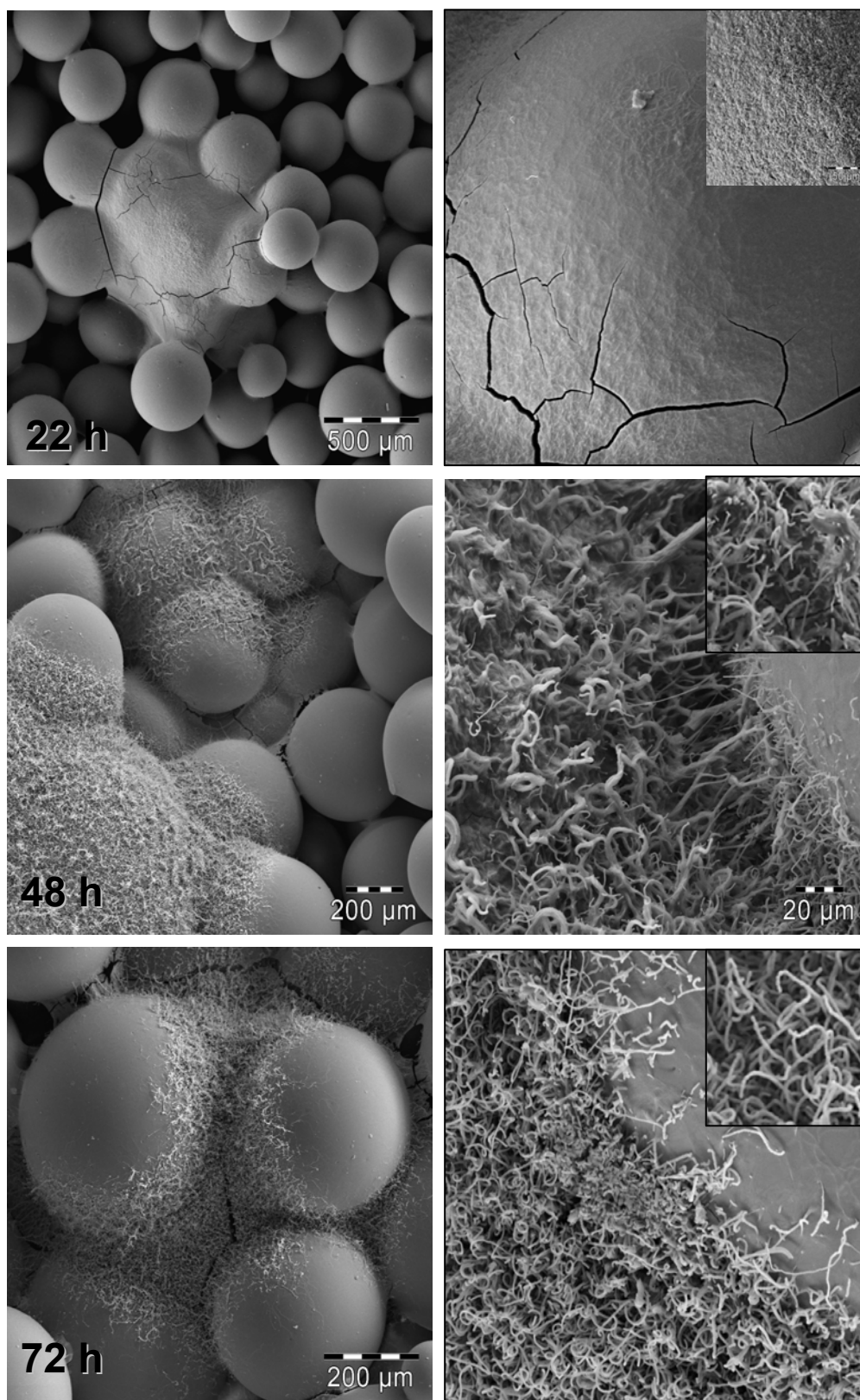


Obr.4.2: Kultivace *S. ambofaciens* a *S. granaticolor* na agaru (A) a na skleněných (B) a zirkoniových (C) kuličkách. Ve všech případech bylo použito kultivační medium „8“ a misky byly očkované sporami. Kultivace probíhala 4dny.

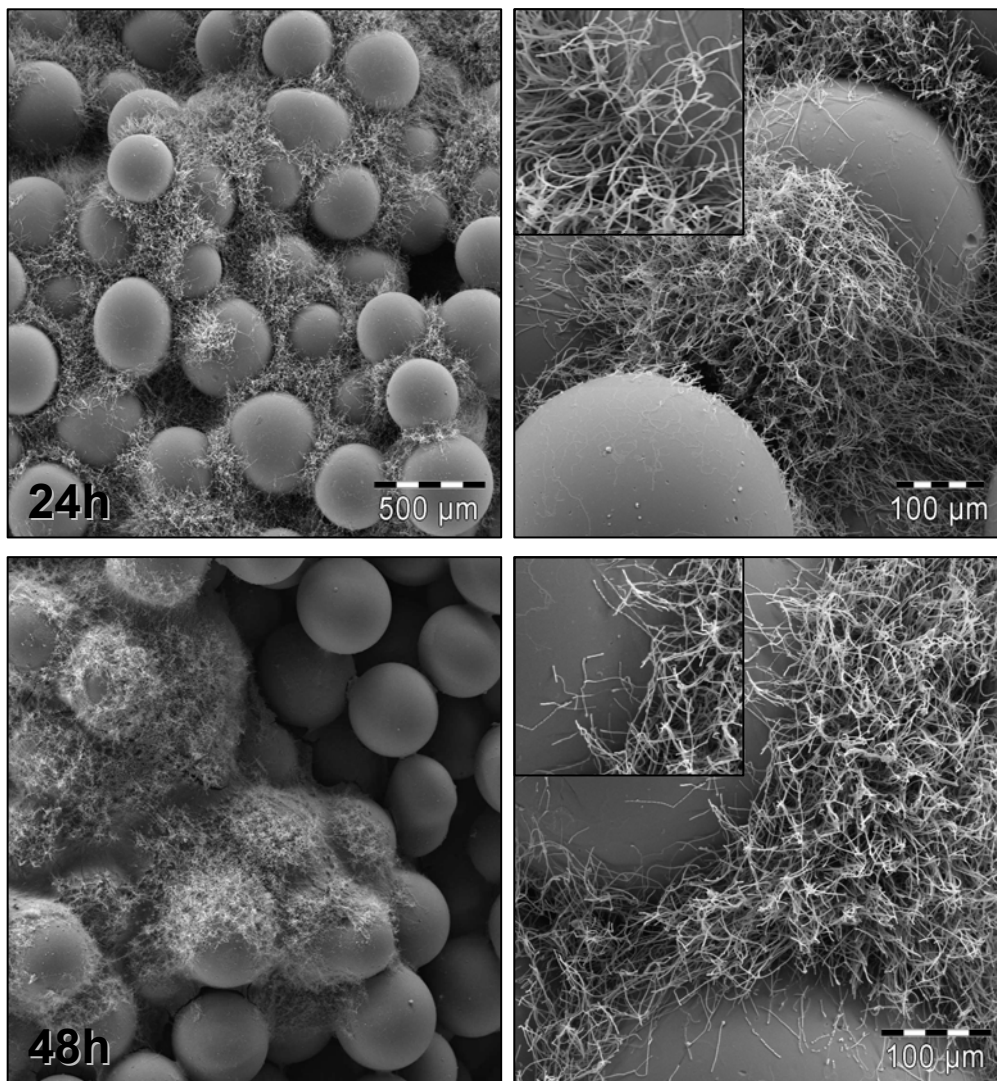
4.1.3. Morfologická analýza diferenciacie *S. ambofaciens* a *S. granaticolor*.

Pro důkladnější sledování morfologie a diferenciacie *S. granaticolor* a *S. ambofaciens* byla použita SEM analýza. U obou druhů byl sledován průběh diferenciacie na skleněných kuličkách ve zhruba jednodenních intervalech. V případě *S. ambofaciens*, jak ukazuje obrázek 4.3, je po 22 h kultivace vytvořena hustá síť vegetativního mycelia, které se plazí po povrchu kuliček. Po 48 h začíná růst vzdušného mycelia a až po 72 h vzdušné mycelium přechází v kroucené řetízky spor (viz detailní výřez u vzorku z 72 hodiny Obr.4.3).

V případě *S. granaticolor* (viz Obr. 4.4) můžeme po 24 h pozorovat poměrně hustě narostlé vzdušné mycelium, které už ze 3/4 obaluje jednotlivé kuličky. Vzdušné mycelium se v průběhu dalších 24 h dále zahušťuje a na jednotlivých koncích vláken se začínou tvořit jednotlivé řetízky spor. Tyto řetízky jsou zachyceny v detailním výřezu na Obr. 4.4 ve vzorku z 48 h.

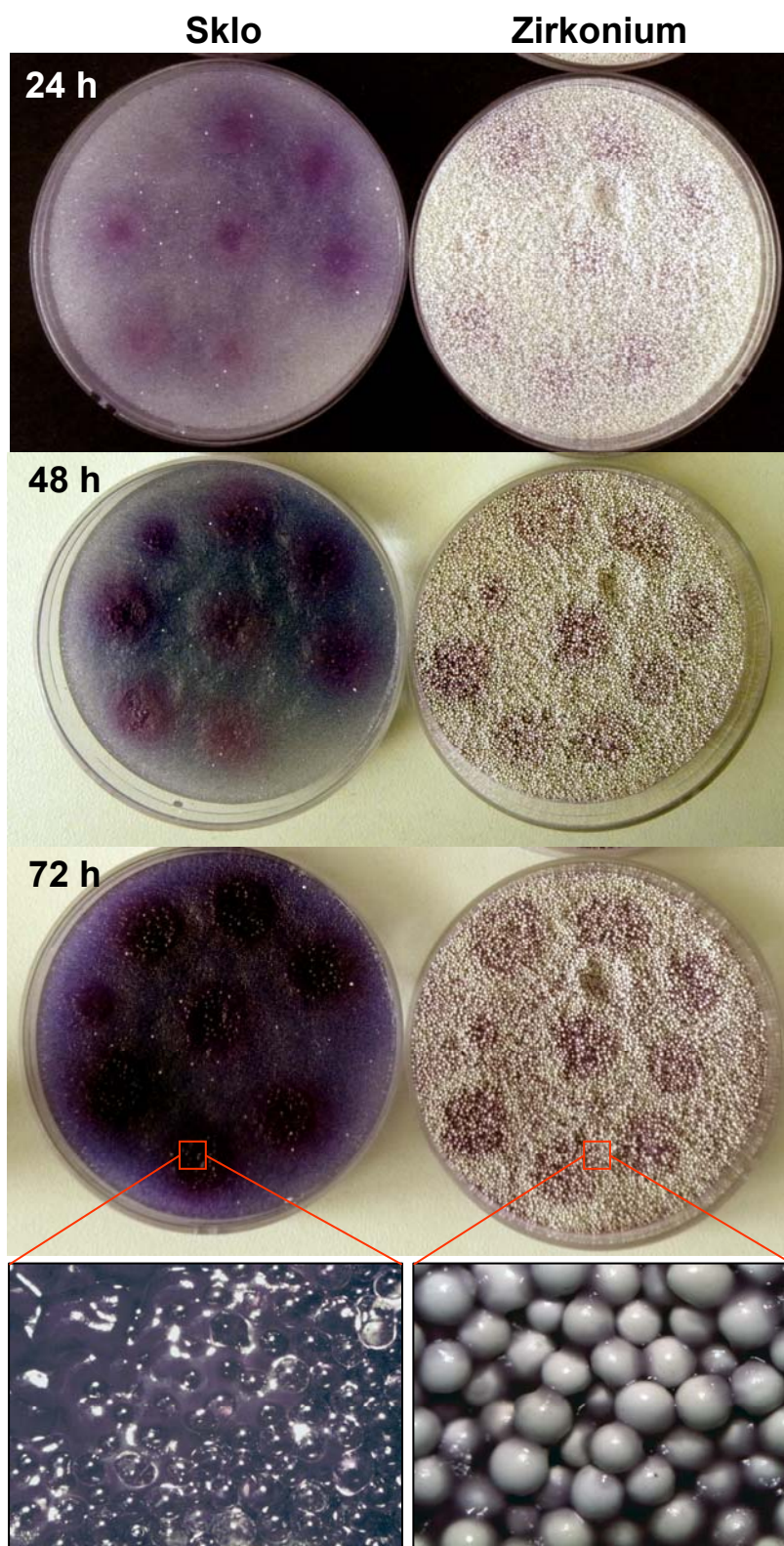


Obr.4.3: Morfologická diferenciace *S. ambofaciens* na skleněných kuličkách.



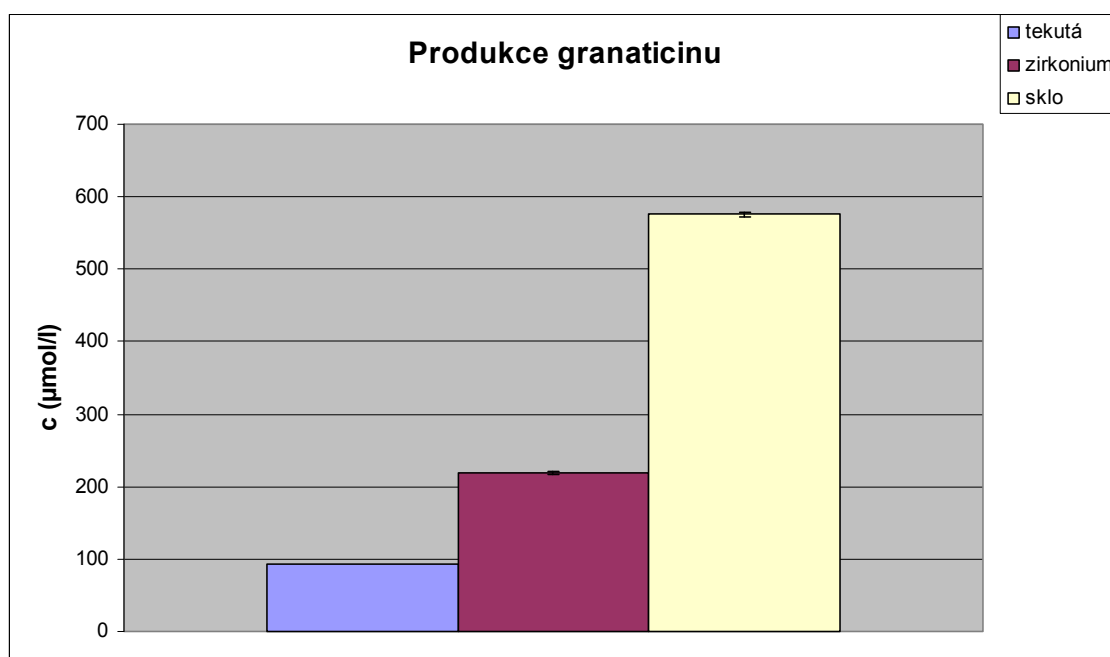
Obr. 4.4: Morfologická diferenciace *S. granaticolor* na skleněných kuličkách.

4.1.4. Produkce pigmentovaných antibiotik na skleněných a zirkoniových kuličkách

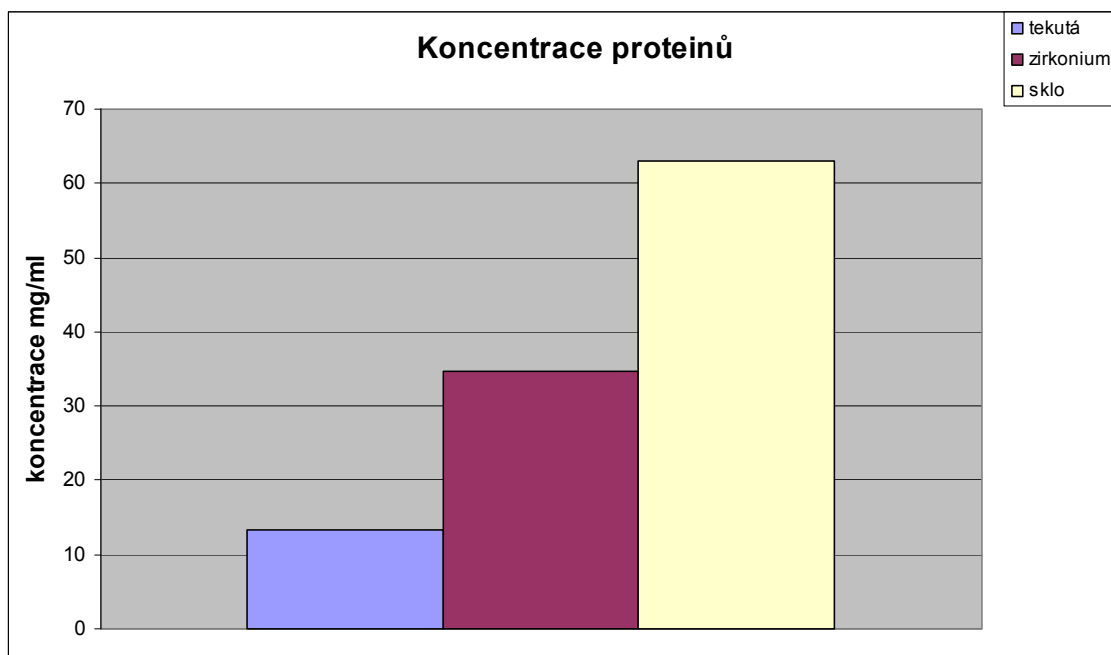


Obr.4.5: Růst a produkce granaticinu v závislosti na materiálu kuliček. Kultivace probíhala na mediu MG.

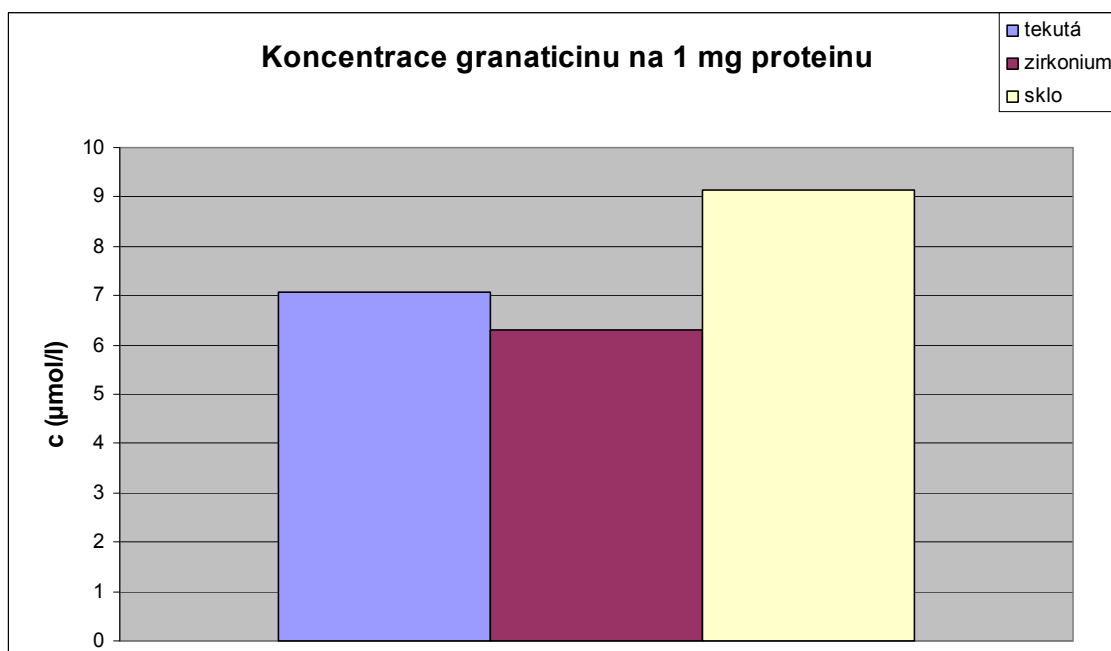
U. S. granaticolor byla sledována produkce granaticinu v závislosti na materiálu kuliček, na kterých kultura rostla. Produkce granaticinu byla sledována na mediu „MG“. *S. granaticolor* byl očkovan na skleněné a zirkoniové kuličky a jako pozitivní kontrola byla použita tekutá kultura. Kultivace probíhala při 28 °C ve vlhké komůrce po dobu 4 dnů. Tekutá kultura byla inkubována na rotační třepačce při 160 rpm. Produkce granaticinu byla sledována v průběhu čtyř dnů. Koncentrace granaticinu byla vypočtena z hodnot absorbance při 572 nm (viz. Kapitola 3.5.). Ve stejném vzorku pak byla měřena i koncentrace proteinů. Získané hodnoty jsou znázorněny v obrázcích 4.6 až 4.8. Srovnání ukázalo, že jak produkce granaticinu (viz. Obr. 4.6), tak i nárůst měřených koncentrací proteinů (viz. Obr. 4.7) je nejvyšší na skleněných kuličkách. A navíc, zatímco produkce granaticinu na mg proteinu je stejná v tekuté kultuře jako na zirkoniových kuličkách je na skleněných kuličkách vyšší o více než 25% (viz. Obr. 4.8).



Obr.4.6: Produkce granaticinu v tekuté třepané půdě a na zirkoniových nebo skleněných kuličkách. Kultivace na MG mediu probíhala 4 dny.



Obr.4.7: Množství proteinu při produkci granaticinu - v tekuté třepané půdě a na zirkoniových nebo skleněných kuličkách. Kultivace na MG mediu probíhala 4 dny.

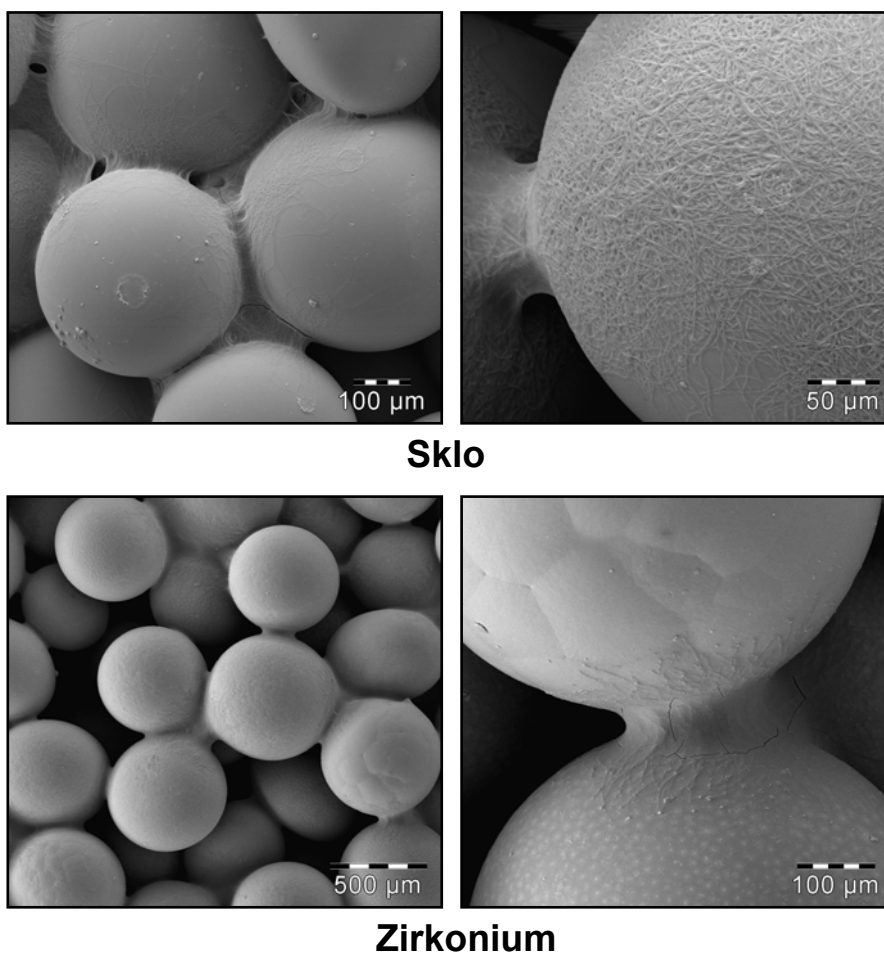


Obr.4.8: Produkce granaticinu na mg proteinu - v tekuté třepané půdě a na zirkoniových nebo skleněných kuličkách. Kultivace na MG mediu probíhala 4 dny.

4.2. Proteomová analýza kultur *S. granaticolor* rostoucích na skleněných a zirkoniových mikrokuličkách

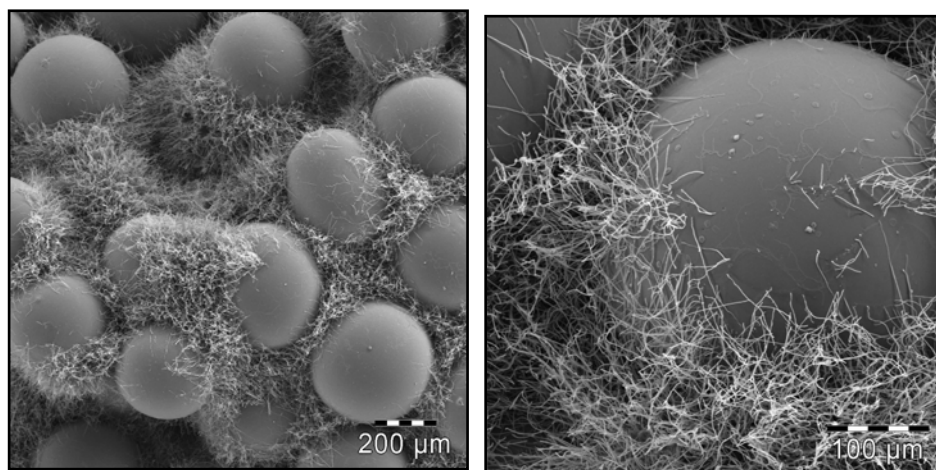
4.2.1. Srovnání růstu *S. granaticolor* na skleněných a zirkoniových kuličkách – SEM analýza

V předcházejících částech práce jsme ukázali rozdíly v morfologické diferenciaci a produkci antibiotik závisící na materiálu povrchu kuliček, které slouží jako opora pro růst *S. granaticolor*. Vzhledem k tomu, že interakce mezi hyfami a povrchem kuliček se odehrává patrně v počátečních fázích růstu, provedli jsme SEM morfologickou analýzu růstu mycelia *S. granaticolor* během prvních 24 hod růstu na skleněných a zirkoniových kuličkách.

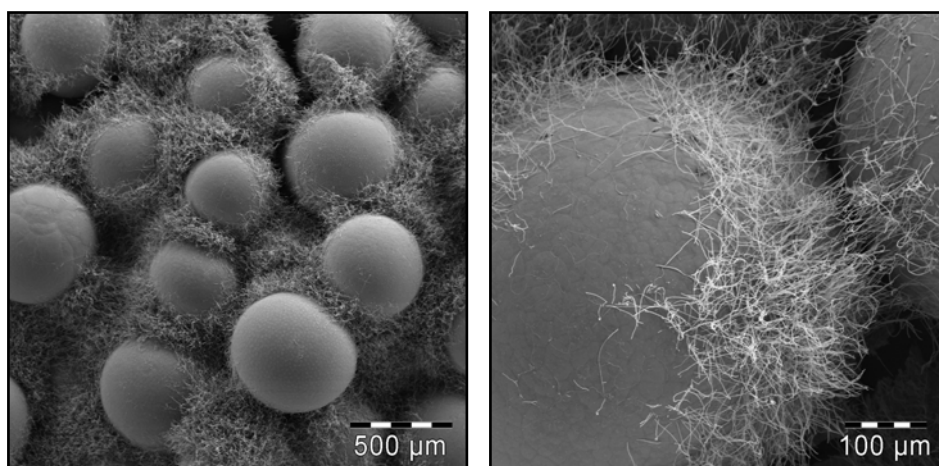


Obr. 4.9: Morfologie 6 h staré kultury rostoucí na skleněných (nahore) a zirkoniových (dole) kuličkách.

Obrázek 4.9 ukazuje porůstání kuliček hyfami *S. granaticolor* během prvních 6 hod kultivace. Je zřejmé, že hustota i délka vláken vegetativního mycelia je významně větší na skleněných kuličkách. Na Obr. 4.10 pak je situace po 24 h, přestože na obou typech kuliček je již rozvinutá hustá síť vzdušných hyf i zde je možné pozorovat rozdíly mezi vzdušnými hyfami na skleněných a zirkoniových kuličkách.



Sklo



Zirkonium

Obr.4.10: Morfologie 24 h staré kultury rostoucí na skleněných (nahore) a zirkoniových (dole) kuličkách

4.2.2. Srovnání proteomů kultur *S. granaticolor* rostoucích 6 h (raná vegetativní fáze) v tekuté půdě a na skleněných nebo zirkoniových kuličkách

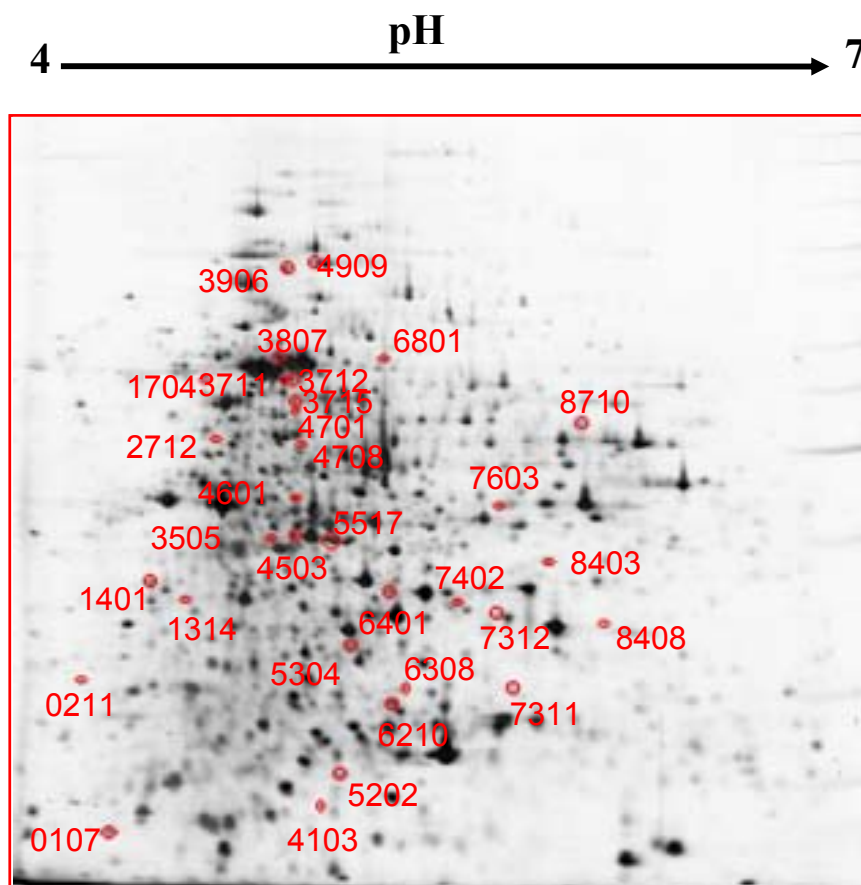
Na základě SEM analýz jsme pro proteomovou analýzu zvolili délku kultivace 6h (raná vegetativní fáze). Cílem této studie bylo s pomocí srovnávací proteomiky identifikovat proteiny, které se podílejí na rozpoznání a přichycení vegetativních hyf na rozdílné povrchy. Při porovnání proteomů jsme v každém experimentu provedli kvalitativní a kvantitativní analýzu. Kvalitativní analýza hodnotí, které proteiny se vyskytují pouze v jednom z proteomů a nikoli ve druhém a jsou tedy unikátní. Kvalitativní analýza pak vybírá proteiny s odlišnou hladinou exprese, jako výběrové kritérium byl použit limit 4-násobné změny exprese.

4.2.2.1. Srovnání proteomů kultur z tekuté půdy a skleněných kuliček (experiment A)

V první studii jsme provedli srovnání proteomů *S. granaticolor* získaných z tekuté, třepané kultury a z kultivace na skleněných kuličkách. Toto srovnání by mělo ukázat základní rozdíly mezi proteinovými profily, které charakterizují planktonický růst v intenzivně vzdušněné tekuté kultuře na jedné straně a povrchový růst na skleněných mikrokuličkách na straně druhé.

4.2.2.1.1. Kvalitativní analýza

Na Obr. 4.11 je označeno na 2D gelu **32 unikátních** proteinů vyskytujících se v proteomu z buněk *S. granaticolor* **rostoucích na skleněných kuličkách**. V tabulce 4.1. jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek. Obrázek 4.12. znázorňuje na 2D gelu umístění **6 unikátních** proteinů z kultury rostoucí v **tekuté**, třepané kultuře a v tabulce 4.2 jsou uvedeny hodnoty průměrné density odpovídajících skvrn a příslušné směrodatné odchylky.



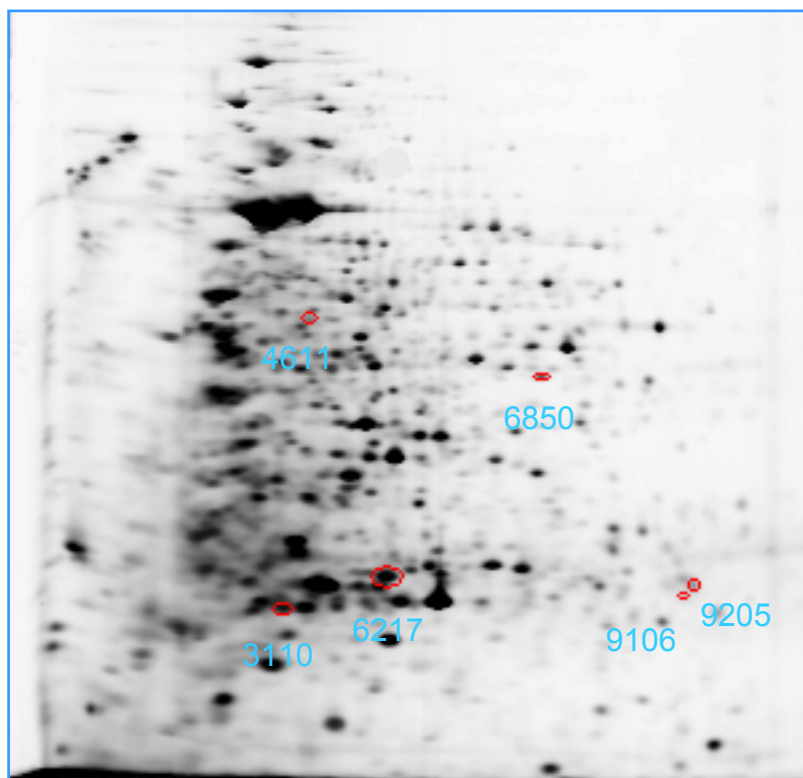
Obr.4.11: 2D elektroforetický gel s unikátními proteiny vyskytujícími se v proteomu *S. granaticolor* při růstu na skleněných kuličkách.

SSP	SD	průměr	SSP	SD	průměr
107	223,9	1725,8	4708 ^{12K}	111,3	296,3
211	171,7	470,7	4909 ^{12K}	157,8	502,4
1314 ^{6S}	357,8	533,7	5202	28,9	1326,7
1401	368,0	1271,9	5304	464,0	1059,5
1704	96,8	255,7	5517 ^{12K}	1183,9	2233,4
2712 ^{6S}	137,0	340,1	6210 ^{12K}	1050,2	1572,2
3505	236,2	709,9	6308	202,4	842,7
3711 ^{6S}	503,7	1085,5	6401 ^{12K}	1582,3	3060,9
3712 ^{6S}	392,3	559,8	6801 ^{12K}	256,0	769,8
3715	208,3	371,3	7311 ^{12K}	155,7	1248,6
3807 ^{12K}	617,8	1808,2	7312 ^{6S}	136,5	524,7
3906 ^{12K}	614,1	1502,5	7402	193,0	1030,7
4103	155,0	738,7	7603	553,2	731,8
4503 ^{12K}	234,5	1392	8403 ^{12K}	2081,6	2768,2
4601 ^{6S}	287,2	545,2	8408	112,4	432,9
4701 ^{12K}	101,9	686,9	8710	331,4	1126,1

Tab.4.1: Unikátní proteiny vyskytující se pouze v proteomu *S. granaticolor* kultivovaného na skleněných kuličkách.

SSP – číslo skvrny (spot), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.23). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku a typ kultury ze, které pochází.

4 $\xrightarrow{\text{pH}}$ 7



Obr.4.12: 2D elektroforetický gel s unikátními proteiny vyskytujícími se v proteomu *S. granaticolor* při růstu v tekuté, třepané kultuře.

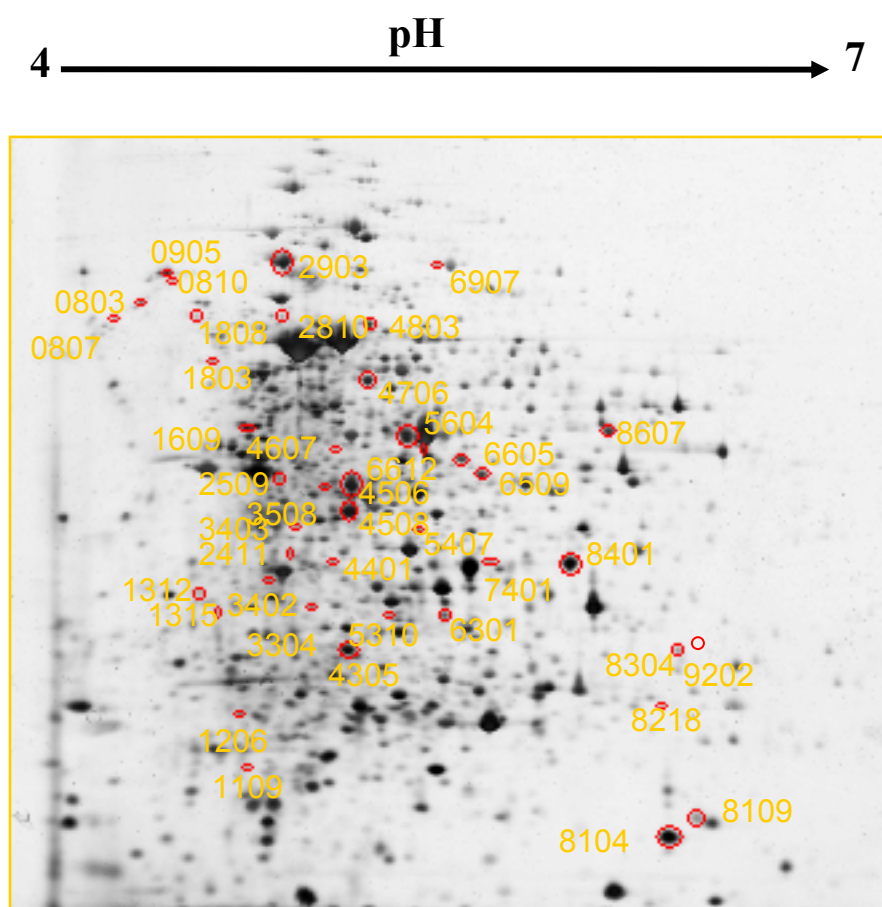
SSP	SD	průměr
3110	980,2	3300,9
4611 ^{1T}	638,4	1372,3
6217	5364,0	6979,1
8506	503,0	1047,2
9106	762,3	1285
9205	962,0	1748,7

Tab.4.2: Unikátní proteiny vyskytující se pouze v proteomu *S. granaticolor* kultivovaného v tekuté, třepané kultuře.

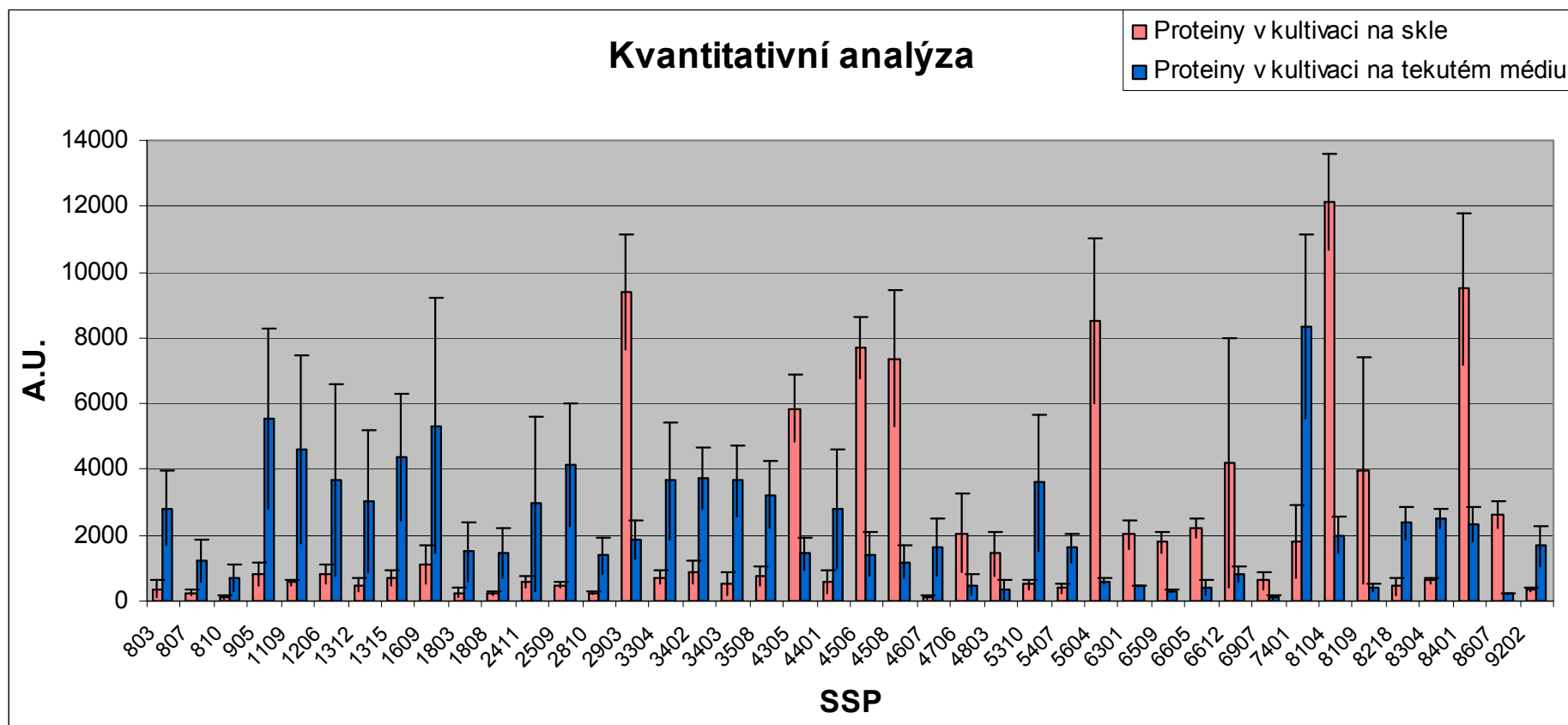
SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.23). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku a typ kultury ze, které pochází.

4.2.2.1.2. Kvantitativní analýza

Na obrázku 4.13 je označeno na 2D gelu **42 odlišných** proteinů získaných ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na **skleněných** kuličkách a v **tekuté**, třepané kultuře. Obrázek 4.14 znázorňuje srovnání expresních profilů vybraných proteinů získaných z porovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na skleněných kuličkách (růžová) a v tekuté, třepané kultuře (modrá). V tabulce 4.3 jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek. Barevně jsou vyznačeny hodnoty průměrů podle změny exprese nahoru (**up regulované-tyrkysová**) a dolů (**down regulované-červená**)



Obr.4.13: 2D elektroforetický gel s odlišnými proteiny získanými ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na skleněných kuličkách a v tekuté, třepané kultuře. Proteiny jsou vyznačeny na 2D gelu se vzorkem proteomu z kultivace na skleněných kuličkách.



Obr.4.14: Srovnání expresních profilů vybraných proteinů získaných ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na skleněných kuličkách (růžová) a v tekuté, třepané kultuře (modrá). Byly vybrány proteiny lišící se 4x a více. U každého proteinu je vyznačen rozptyl hodnot density ze srovnání paralelních gelů (3-4).

SSP – čísla skvrn (spotů) odpovídajících vybraným proteinům označeným na Obr. 4.13, A.U. – relativní jednotky udávající densitu skvrn

SSP	průměr sklo	SD	průměr tekutá	SD	SSP	průměr sklo	SD	průměr tekutá	SD
803 ¹³	373,0	246,8	2803,8	1134,7	4506	7703,4	929,1	1419,0	668,2
807 ¹³	236,1	89,7	1226,9	668,2	4508	7377,4	2079,4	1182,7	499,1
810	128,2	63,2	686,2	418,6	4607	119,0	52,2	1619,0	869,6
905	799,8	353,4	5543,1	2732,9	4706 ¹³	2066,2	1194,3	475,4	316,6
1109	555,6	75,1	4609,6	2846,0	4803	1443,1	664,2	336,8	297,5
1206	832,0	290,5	3685,6	2924,2	5310 ¹³	499,1	140,0	3598,2	2058,1
1312	495,4	175,8	3055,3	2153,1	5407	402,6	140,6	1606,7	438,5
1315	698,4	241,7	4350,2	1926,2	5604 ¹³	8516,8	2509,8	612,1	113,9
1609 ¹³	1127,2	588,4	5330,9	3876,1	6301	2021,0	453,5	468,0	5,1
1803	258,8	167,6	1496,7	889,7	6509 ¹³	1795,3	327,0	311,4	18,6
1808	261,3	57,3	1483,5	759,6	6605	2231,7	279,7	427,3	238,9
2411	572,2	160,8	2949,8	2656,1	6612	4222,6	3787,3	827,2	230,7
2509	489,8	83,2	4163,9	1871,0	6907 ¹³	629,1	253,5	133,6	58,5
2810	250,5	24,2	1371,3	526,0	7401	1811,5	1089,5	8333,8	2784,0
2903 ¹³	9395,1	1740,8	1863,0	589,8	8104	12129,8	1471,0	1996,1	565,6
3304	711,5	208,6	3659,8	1789,7	8109 ¹³	3960,1	3421,5	406,9	137,7
3402	873,9	345,8	3733,7	936,9	8218	460,0	257,6	2377,7	508,6
3403	532,5	332,3	3656,3	1062,9	8304 ¹³	621,9	98,8	2499,5	305,6
3508	777,8	295,9	3233,4	1022,5	8401	9479,9	2300,4	2329,0	544,2
4305	5860,2	1045,8	1453,5	498,0	8607 ¹³	2618,5	411,6	250,7	3,7
4401 ¹³	594,3	349,3	2781,6	1805,9	9202	369,3	54,0	1667,2	620,4

Tab.4.3: Hodnoty density pro odlišné proteiny získané ze srovnání proteomů *S.granaticolor* rostoucího na skleněných kuličkách a v tekuté, třepané kultuře. Proteiny up regulované a down regulované.

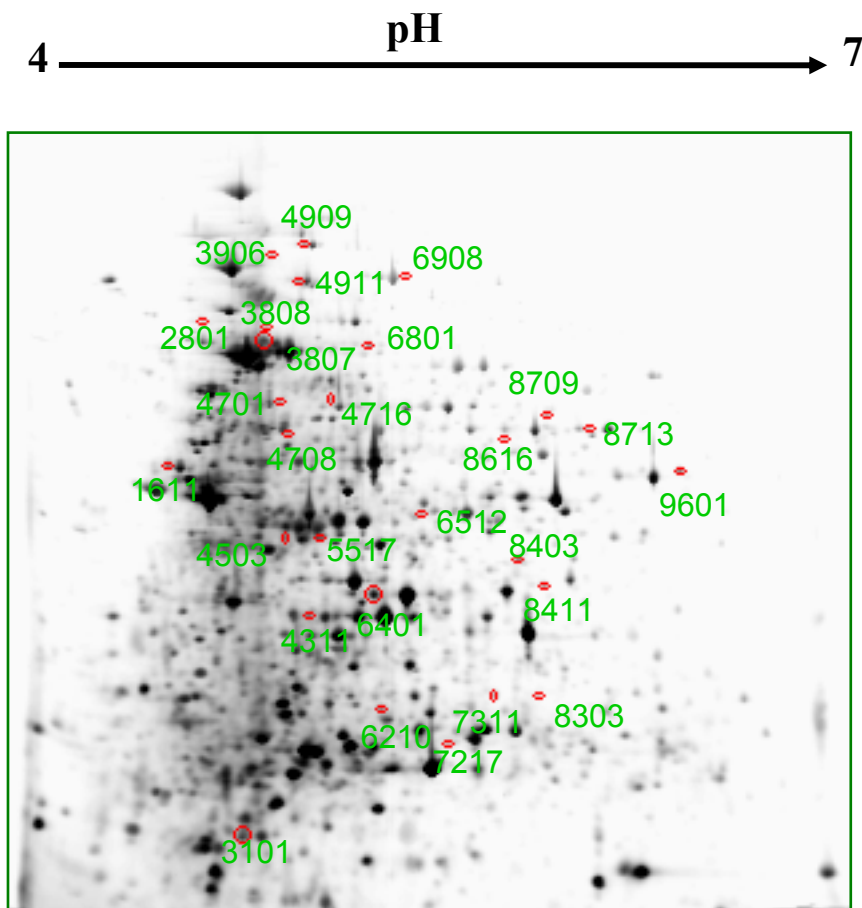
SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování čísla SSP odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.24.). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku.

4.2.2.2. Srovnání proteomů kultur z tekuté půdy a zirkoniových kuliček (experiment B)

Ve druhé studii jsme provedli srovnání proteomů *S. granaticolor* získaných z tekuté, třepané kultury a z kultivace na zirkoniových kuličkách. Toto srovnání by mělo ukázat základní rozdíly mezi proteinovými profily, které charakterizují planktonický růst v intenzivně vzdušněné tekuté kultuře na jedné straně a povrchový růst na zirkoniových kuličkách na straně druhé. Ve srovnání s experimentem (A) bychom měli vidět rozdíly související s materiálem kuliček.

4.2.2.2.1. Kvalitativní analýza

Na Obr. 4.15 je označeno na 2D gelu **28 unikátních** proteinů vyskytujících se v proteomu z kultivace na **zirkoniových kuličkách**. V tabulce 4.4 jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek. Obrázek 4.16 znázorňuje na 2D gelu umístění **2 unikátních** proteinů z kultury rostoucí v **tekutém**, třepaném médiu a v tabulce 4.5 jsou uvedeny hodnoty průměrné density odpovídajících skvrn a příslušné směrodatné odchylky.

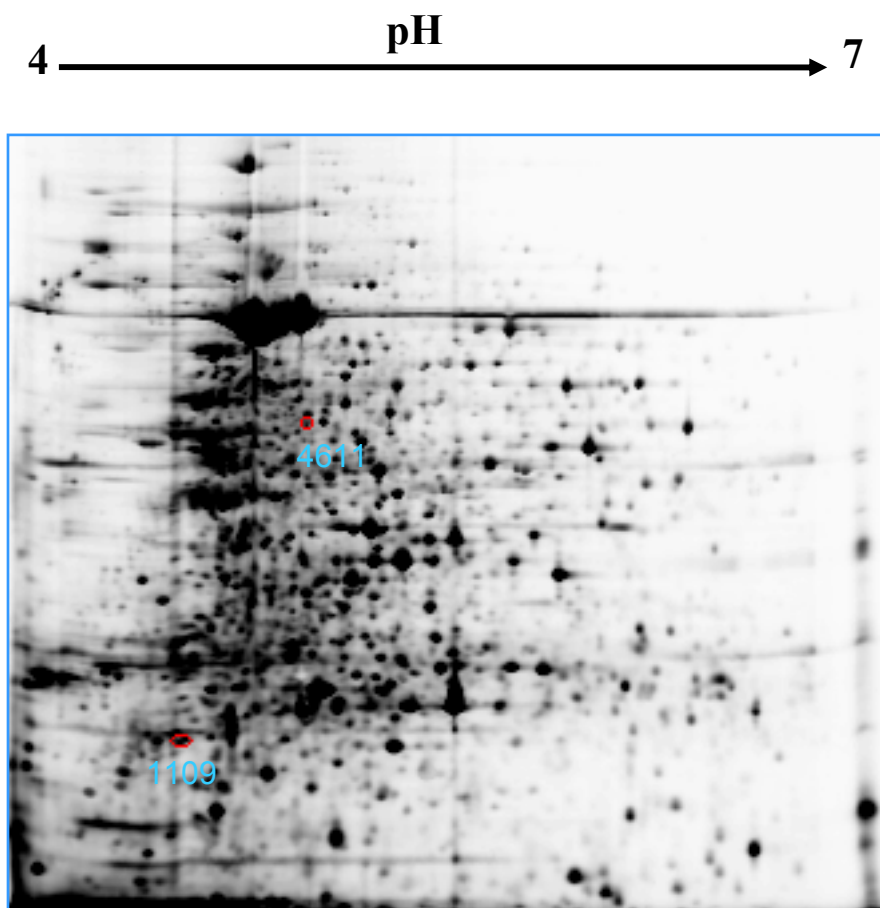


Obr.4.15: 2D elektroforetický gel s unikátními proteiny vyskytujícími se v proteomu *S. granaticolor* při růstu na zirkoniových kuličkách.

SSP	SD	průměr	SSP	SD	průměr
1611	378,8	1326,3	6210 ^{12K}	313,8	1013,4
2801	98,2	210,3	6401 ^{12K}	988,1	2810
3101	440,3	3429,5	6512	60,2	357,5
3807 ^{12K}	712,3	2998,9	6801 ^{12K}	127,4	522,9
3808	458,0	497,6	6908	45,3	225,1
3906 ^{12K}	175,0	522,1	7217	220,0	781,9
4311 ^{1Z}	345,9	1180,4	7311 ^{12K}	301,4	949,1
4503 ^{12K}	532,7	1191,6	8303	28,0	330,5
4701 ^{12K}	297,6	461,9	8403 ^{12K}	251,2	939,8
4708 ^{12K}	199,2	467,3	8411	114,3	746,3
4716	186,8	622,2	8616	91,3	374,2
4909 ^{12K}	233,8	653,1	8709	99,0	395
4911	423,9	1034,5	8713	264,2	721,9
5517 ^{12K}	799,5	1665,8	9601	468,8	1173,4

Tab.4.4: Unikátní proteiny vyskytující se pouze v proteomu *S. granaticolor* kultivovaného na zirkoniových kuličkách.

SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.23.). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku a typ kultury ze, které pochází.



Obr.4.16: 2D elektroforetický gel s unikátními proteiny vyskytujícími se v proteomu *S. granaticolor* při růstu v tekuté, třepané kultuře.

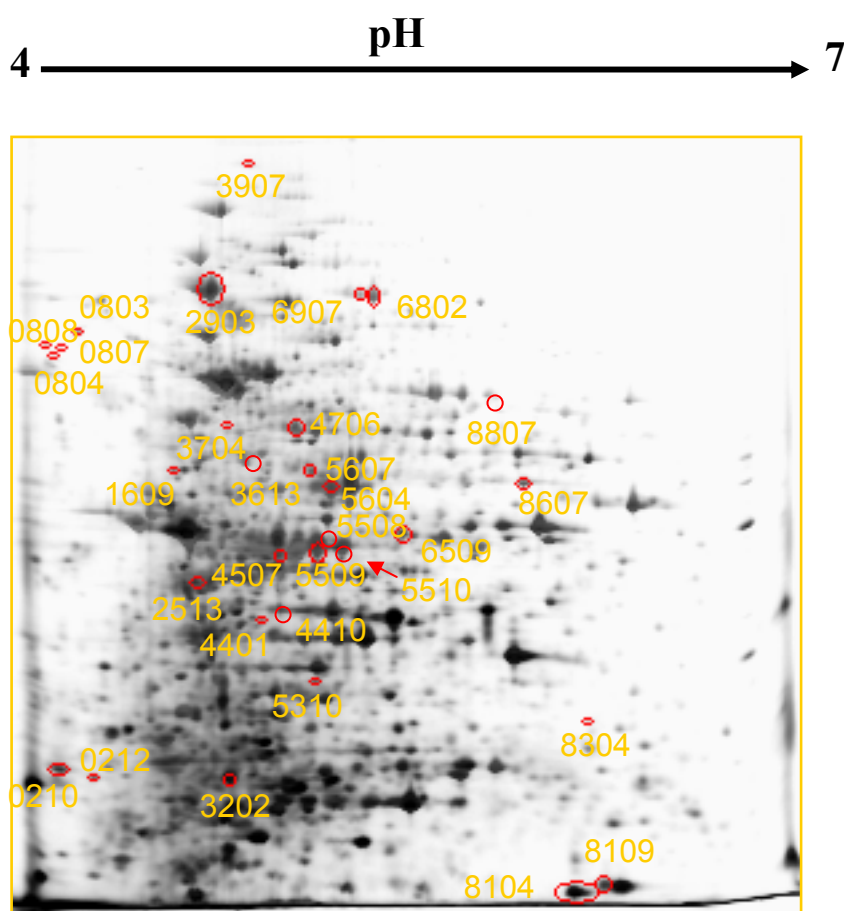
SSP	SD	průměr
1109	2846,0	4609,6
4611 ^{1T}	638,4	1372,3

Tab.4.5: Unikátní proteiny vyskytující se pouze v proteomu *S. granaticolor* kultivovaného v tekuté, třepané kultuře.

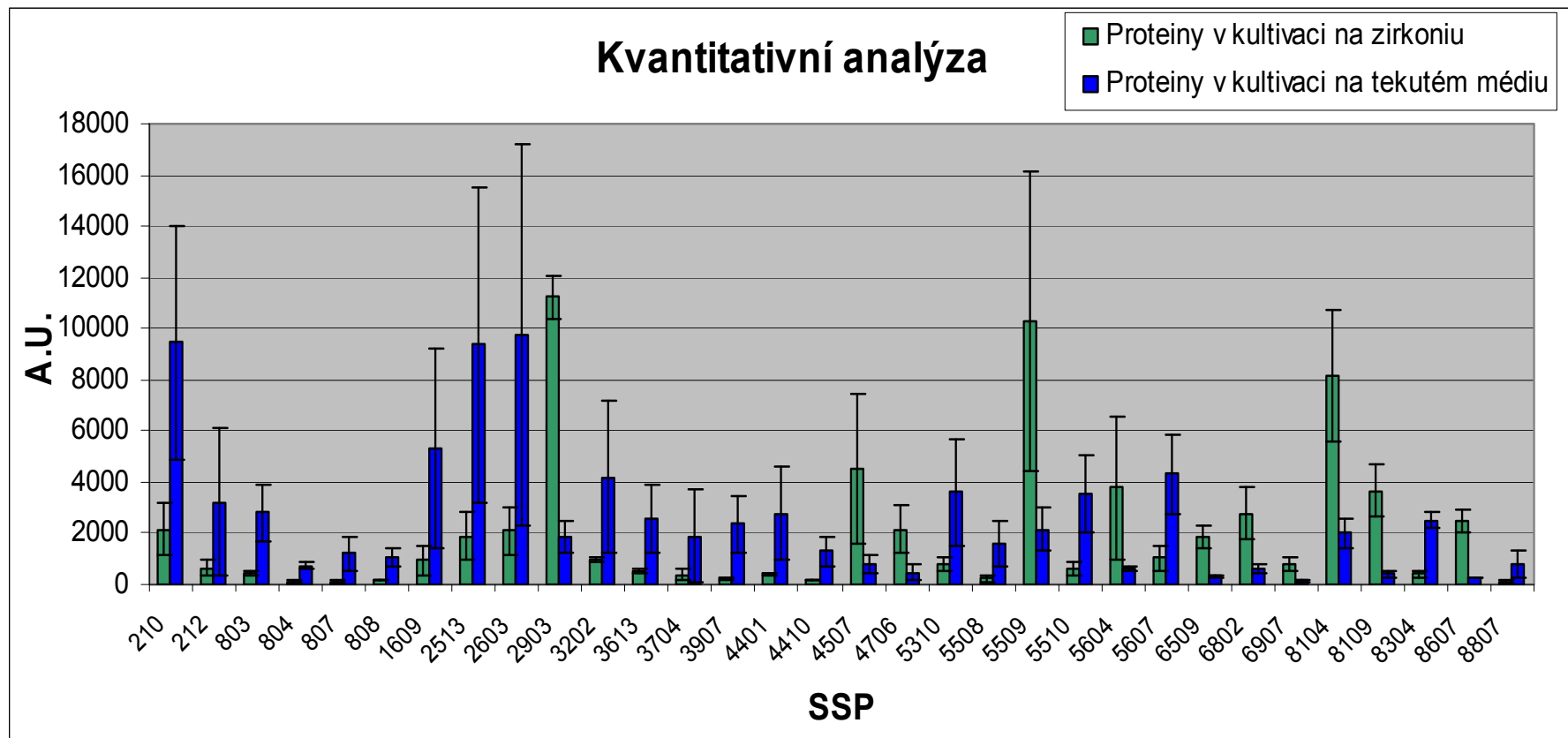
SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 3.23). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku a typ kultury ze, které pochází.

4.2.2.2.2. Kvantitativní analýza

Na obrázku 4.17 je označeno na 2D gelu **32 odlišných** proteinů získaných ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na **zirkoniových** kuličkách a v **tekuté**, třepané kultuře. Obrázek 4.18 znázorňuje srovnání expresních profilů vybraných proteinů získaných z porovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na zirkoniových kuličkách (zelená) a v tekuté, třepané kultuře (modrá). V tabulce 4.6 jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek. Barevně jsou vyznačeny hodnoty průměrů podle změny exprese nahoru (**up regulované-tyrkysová**) a dolů (**down regulované-červená**)



Obr.4.17: 2D elektroforetický gel s odlišnými proteiny získanými ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na zirkoniových kuličkách a v tekuté, třepané kultuře. Proteiny jsou vyznačeny na 2D gelu se vzorkem proteomu z kultivace na zirkoniových kuličkách.



Obr.4.18: Srovnání expresních profilů vybraných proteinů získaných ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na zirkoniových kuličkách (zelená) a v tekuté, třepané kultuře (modrá). Byly vybrány proteiny lišící se 4x a více. U každého proteinu je vyznačen rozptyl hodnot density ze srovnání paralelních gelů (3-4).
 SSP – čísla skvrn (spotů) odpovídajících vybraným proteinům označeným na Obr. 4.17, A.U. – relativní jednotky udávající densitu skvrn.

SSP	průměr zirkon	SD	průměr tekutá	SD	SSP	průměr zirkon	SD	průměr tekutá	SD
210	2158,7	1000,1	9449,1	4603,6	4507	4510,1	2947,8	766,6	353,4
212	648,5	292,0	3207,2	2873,5	4706 ¹³	2162	900,9	475,4	316,6
803 ¹³	449,4	70,2	2803,8	1134,7	5310 ¹³	791,8	264,9	3598,2	2058,1
804	107,5	39,1	714,9	131,6	5508	227,4	96,0	1599,2	894,0
807 ¹³	113,7	30,1	1226,9	668,2	5509 ²	10292,6	5823,2	2169	854,5
808	151,9	0,5	1068	389,3	5510	608,9	271,6	3567	1491,7
1609 ¹³	940,7	609,5	5330,9	3876,1	5604 ¹³	3785,9	2775,1	612,1	113,9
2513	1896,2	931,3	9359,4	6124,7	5607	1020,5	452,5	4323,1	1546,1
2603	2102,7	941,7	9749	7478,6	6509 ¹³	1873,7	423,6	311,4	18,6
2903 ¹³	11222,7	835,1	1863	589,8	6802	2776,1	1031,6	600,2	195,5
3202	982,7	121,2	4196,6	2957,6	6907 ¹³	816,2	240,2	133,6	58,5
3613	533,6	48,4	2563,8	1355,5	8104	8152,5	2533,8	1996,1	565,6
3704	392,1	244,2	1904,8	1778,5	8109 ¹³	3675,7	999,0	406,9	137,7
3907 ²	226,1	80,8	2371,7	1110,0	8304 ¹³	403,9	100,0	2499,5	305,6
4401 ¹³	410,4	49,5	2781,6	1805,9	8607 ¹³	2472,6	433,4	250,7	3,7
4410	156,5	2,3	1296	567,5	8807	115,9	27,7	800,4	516,6

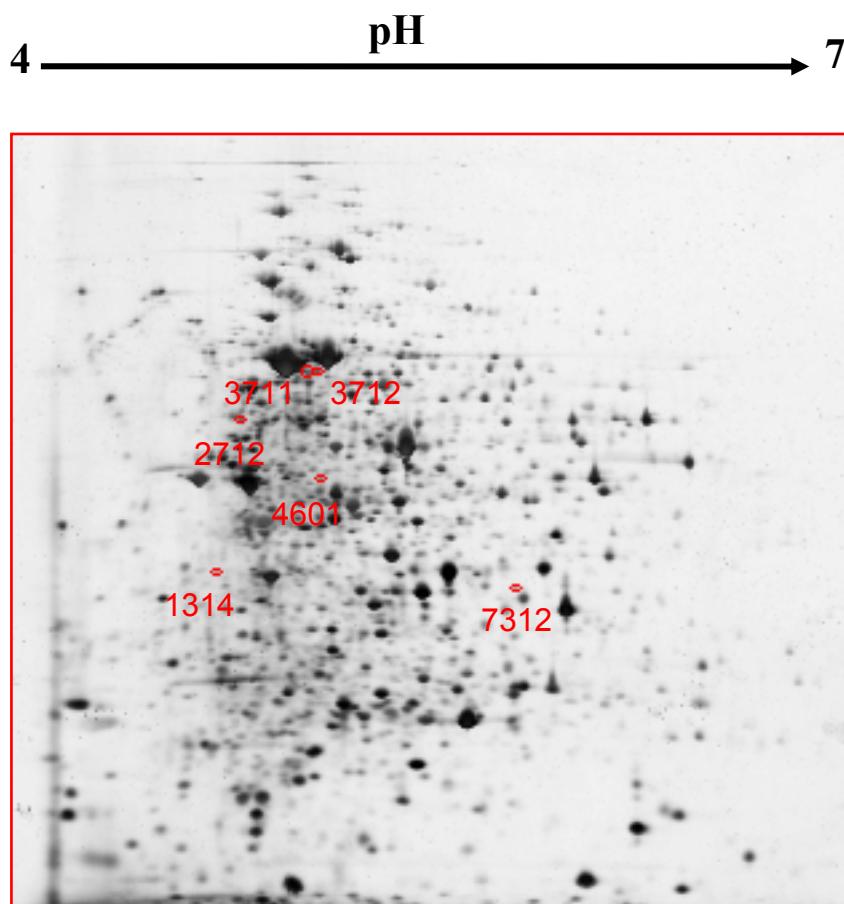
Tab.4.6: Hodnoty density pro odlišné proteiny získané ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na zirkoniových kuličkách a v tekuté, třepané kultuře. Proteiny **up** regulované a **down** regulované. SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování čísla SSP odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.24.). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku.

4.2.2.3. Srovnání proteomů kultur ze skleněných a zirkoniových kuliček (experiment C)

Ve třetí studii jsme provedli srovnání proteomů *S. granaticolor* získaných z kultivace na skleněných nebo zirkoniových kuličkách. Toto srovnání by mělo ukázat základní rozdíly mezi proteinovými profily, které charakterizují růst na kuličkách ze dvou odlišných materiálů.

4.2.2.3.1. Kvalitativní analýza

Na Obr. 4.19 je označeno na 2D gelu **6 unikátních** proteinů vyskytujících se v proteomu z kultivace na **skleněných kuličkách**. V tabulce 4.7 jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek. Obrázek 4.20 znázorňuje na 2D gelu umístění **14 unikátních** proteinů z kultury rostoucí na **zirkoniových kuličkách** a v tabulce 4.8 jsou uvedeny hodnoty průměrné density odpovídajících skvrn a příslušné směrodatné odchylky.

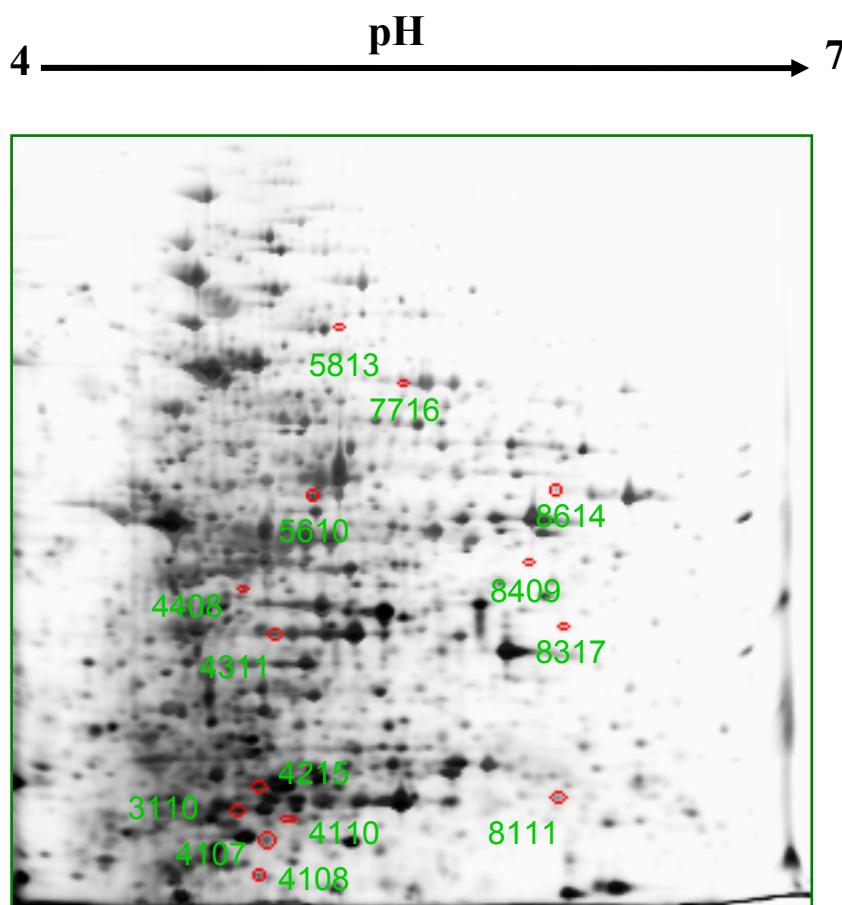


Obr.4.19: 2D elektroforetický gel s unikátními proteiny vyskytujícími se v proteomu *S. granaticolor* při růstu na skleněných kuličkách.

SSP	SD	Průměr sklo
1314 ^{6S}	357,8	533,7
2712 ^{6S}	137,0	340,1
3711 ^{6S}	503,7	1085,5
3712 ^{6S}	392,3	559,8
4601 ^{6S}	287,2	545,2
7312 ^{6S}	136,5	524,7

Tab.4.7: Unikátní proteiny vyskytující se pouze v proteomu *S. granaticolor* na skleněných kuličkách.

SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.23). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku a typ kultury ze, které pochází.



Obr.4.20: 2D elektroforetický gel s unikátními proteiny vyskytujícími se v proteomu *S. granaticolor* při růstu na zirkoniových kuličkách.

SSP	SD	průměr zirkonium	SSP	SD	průměr zirkonium
3110	624,2	1971,6	5610	323,9	1764,8
4107	268,8	1683,9	5813	56,4	248,1
4108	220,9	1231,6	7716	356,3	916,3
4110	169,1	785,8	8111	379,4	768,1
4215	287,3	1329	8317	119,5	543,4
4311 ^{1Z}	345,9	1180,4	8409	155,1	360,1
4408	139,3	830,8	8614	189,7	565,8

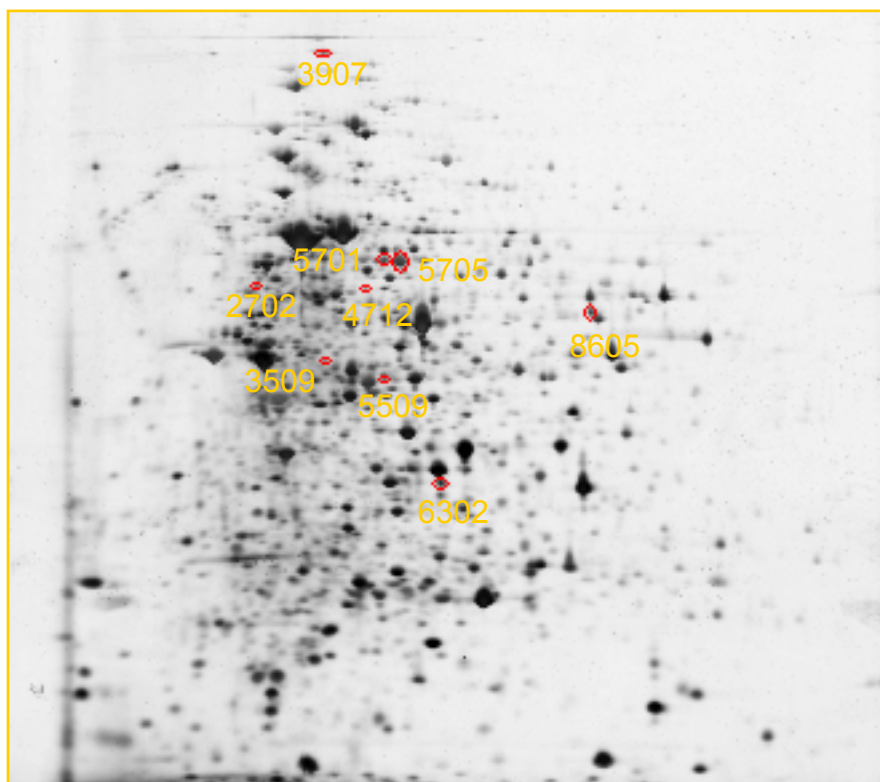
Tab.4.8: Unikátní proteiny vyskytující se pouze v proteomu *S. granaticolor* na zirkoniových kuličkách.

SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.23). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku a typ kultury ze, které pochází.

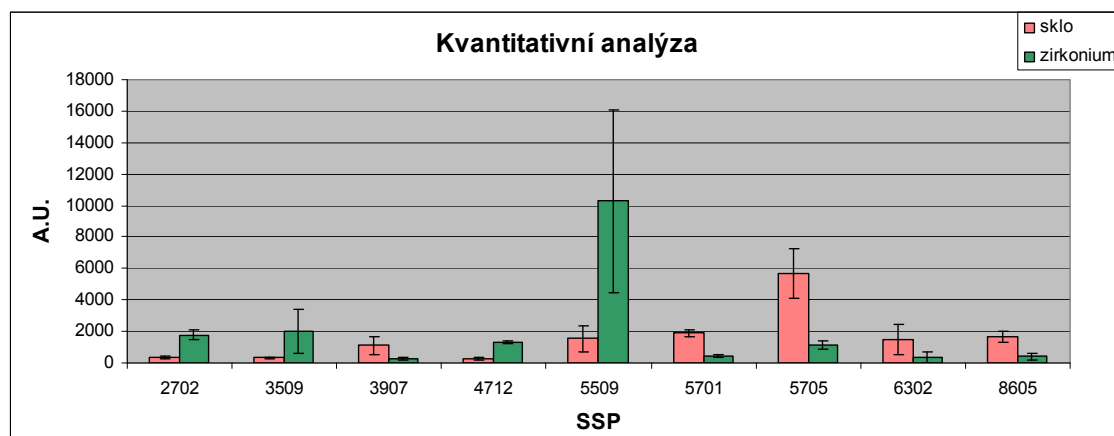
4.2.2.3.2. Kvantitativní analýza

Na obrázku 4.21 je označeno na 2D gelu **9 odlišných** proteinů získaných ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na **skleněných** a na **zirkoniových** kuličkách. Obrázek 4.22 znázorňuje srovnání expresních profilů vybraných proteinů získaných z porovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na skleněných (růžová) a zirkoniových kuličkách (zelená). V tabulce 4.9 jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek. Barevně jsou vyznačeny hodnoty průměrů podle změny exprese nahoru (**up regulované- tyrkysová**) a dolu (**down regulované-červená**)

4 $\xrightarrow{\text{pH}}$ 7



Obr.4.21: 2D elektroforetický gel s odlišnými proteiny získanými ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na skleněných a zirkoniových kuličkách. Proteiny jsou vyznačeny na 2D gelu se vzorkem proteomu z kultivace na skleněných kuličkách.



Obr.4.22: Srovnání expresních profilů vybraných proteinů získaných ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na skleněných (růžová) a zirkoniových kuličkách (zelená). Byly vybrány proteiny lišící se 4x a více. U každého proteinu je vyznačen rozptyl hodnoty hustoty ze srovnání paralelních gelů (3-4). SSP – čísla skvrn (spotů) odpovídající vybraným proteinům označeným na Obr. 4.21, A.U. – relativní jednotky udávající hustotu skvrn.

SSP	SD	průměr sklo	SD	průměr zirkonium
2702	76,9	381,5	312,7	1781,8
3509	36,0	311,4	1389,1	2005
3907 ²	537,7	1103,4	80,8	226,1
4712	80,7	247	127,6	1310,4
5509 ²	824,0	1547,3	5823,2	10292,6
5701	183,9	1881,8	85,6	450,2
5705	1540,6	5678,4	278,6	1117,8
6302	989,8	1492,2	315,9	339,8
8605	375,1	1669,6	231,3	411,2

Tab.4.9: Hodnoty density pro odlišné proteiny získané ze srovnání proteomů *S. granaticolor* rostoucího na skleněných a zirkoniových kuličkách.

Proteiny **up** regulované a **down** regulované.

SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny. Barva stínování čísla SSP odpovídá příslušnosti ke skupině proteinů, které představují průnik jednotlivých srovnání (viz Obr. 4.24). Horní index udává počet proteinů tvořících množinu průniku.

4.2.2.4. Souhrnná analýza proteomových experimentů A, B a C

4.2.2.4.1 Souhrn kvalitativních a kvantitativních rozdílů v experimentech A, B a C

V tabulkách 4.10 a 4.11 jsou souhrnně znázorněny výsledky srovnání proteomů v experimentech A, B a C, zvláště kvalitativní analýzy (unikátní proteiny) v Tab. 4.10 a zvláště kvantitativní analýzy rozlišené na nahoru a dolů regulované proteiny v Tab. 4.11.

Kultivace (proteom)	Srovnávané proteomy		
	(Exp.A) <u>Tekutá</u> <u>Sklo</u>	(Exp.B) <u>Tekutá</u> Zirkonium	(Exp.C) <u>Sklo</u> Zirkonium
<u>Tekutá</u>	6	2	/
<u>Sklo</u>	32	/	6
Zirkonium	/	28	14

Tab. 4.10: Souhrn kvalitativních rozdílů z experimentů A, B a C srovnávajících proteomy z tekuté půdy a ze skleněných nebo zirkoniových kuliček. Unikátní proteiny identifikované v tekuté půdě (modrá), na skleněných kuličkách (zelená) a na zirkoniových kuličkách (červená).

Expese	Srovnávané proteomy		
	(Exp.A) <u>Tekutá</u> <u>Sklo</u>	(Exp.B) <u>Tekutá</u> Zirkonium	(Exp.C) <u>Sklo</u> Zirkonium
<u>Nahoru</u>	26	21	5
<u>dolu</u>	16	11	4

Tab. 4.11: Přehled proteinů s odlišnou expresí z experimentů A, B a C srovnávajících proteomy z tekuté půdy a ze skleněných nebo zirkoniových kuliček. Proteiny z jednotlivých srovnání jsou rozlišeny na nahoru regulované (tyrkysové zvýraznění) a dolů regulované (červené zvýraznění), vztaženo vždy k prvnímu uvedenému proteomu.

4.2.2.4.2. Průniky množin proteinů identifikovaných kvalitativní a kvantitativní analýzou při srovnání proteomů z kultivací *S. granaticolor* v tekuté půdě a na skleněných a zirkoniových kuličkách (experimenty A, B, a C)

Výsledkem proteomových analýz, které srovnávaly rozdíly v proteinových profilech 6-hodinových kultur *S. granaticolor* pěstovaných v tekuté, třepané půdě, na skleněných nebo zirkoniových kuličkách bylo určení skupin proteinů, které vyjadřovaly kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi proteomy získanými z kultur kultivovaných třemi výše uvedenými způsoby. Tyto množiny proteinů jsme podrobili analýze s použitím Vennových diagramů (GRUNBAUM 1984) a hledali jejich průniky, tedy skupiny proteinů, které se objevovaly současně v jednotlivých srovnáních. Hodnotili jsme zvláště unikátní proteiny a zvláště kvantitativně odlišné proteiny.

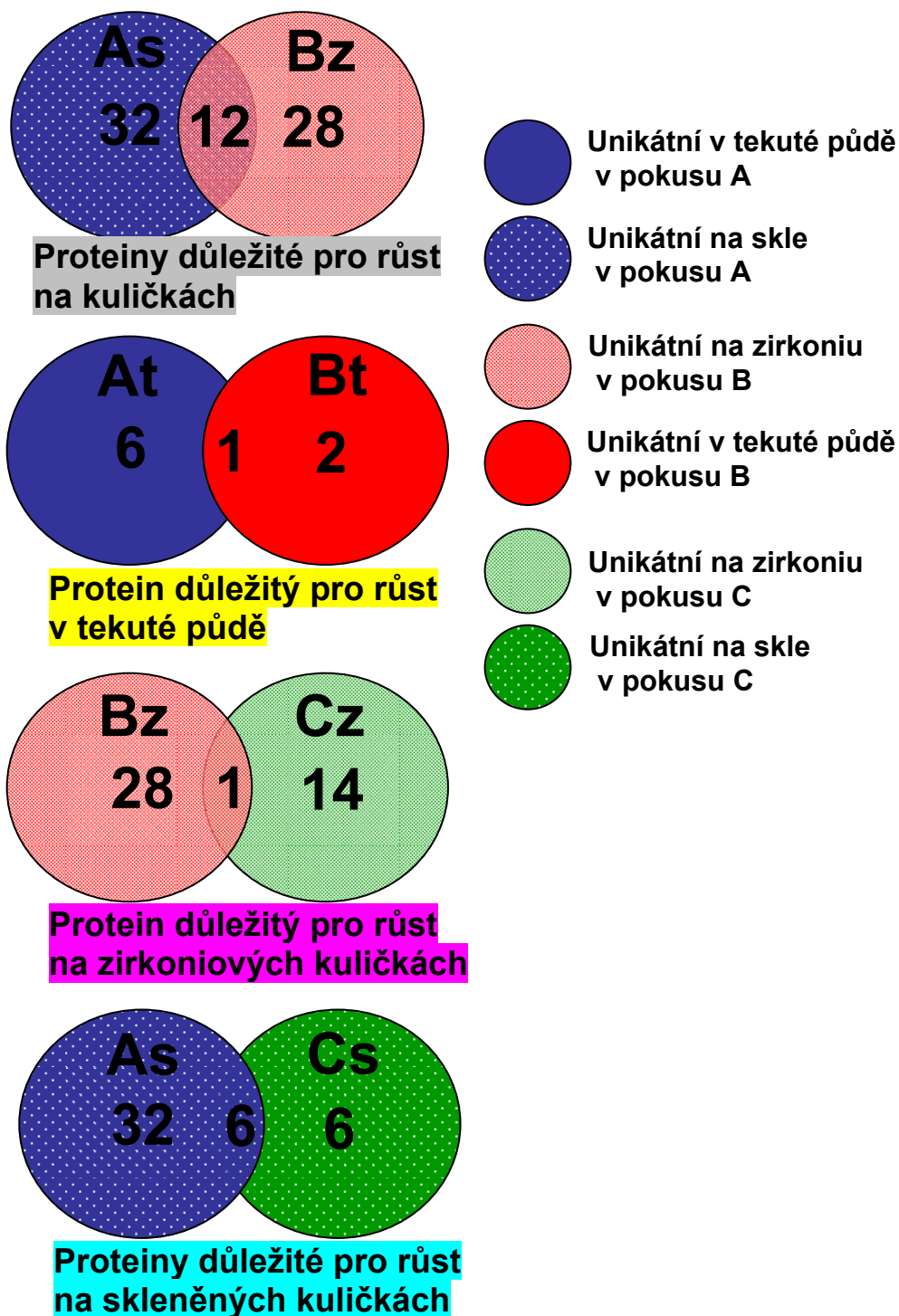
4.2.2.4.2.1. Kvalitativní analýza

Analýza průniku kvalitativních rozdílů (unikátních proteinů) graficky znázorněná na obrázku 4.23 ukázala, v první řadě skupinu **12 proteinů**, které jsou patrně důležité pro růst na kuličkách, bez ohledu na jejich povrch. Ta představuje průnik množin proteinů unikátních pro růst na skleněných kuličkách a zirkoniových kuličkách. Průnikem množin unikátních proteinů objevujících se v proteomu z kultury rostoucí v tekuté půdě ve srovnáních proteomů z experimentů A a B byl pouze **jeden** protein, který může mít specifický význam pro růst v tekuté půdě. Průnikem množin unikátních proteinů objevujících se v proteomu z kultury rostoucí na zirkoniových kuličkách ve srovnáních z experimentů B a C byl opět **jeden** protein, který může mít význam pro růst na zirkoniových kuličkách. Analogické srovnání v případě skleněných kuliček z experimentů A a C pak ukázalo na **6 proteinů**, které mohou mít zásadní význam pro růst na skleněných kuličkách. Jednotlivé proteiny je možné identifikovat v tabulkách dokumentujících experimenty A, B a C (kapitoly 4.2.2.1 až 4.2.2.3). Zde se barva stínování shoduje se stínováním popisu jednotlivých průniků v Obr. 4.23 a v indexu je pak počet proteinů v množině průniku s označením způsobu kultivace.

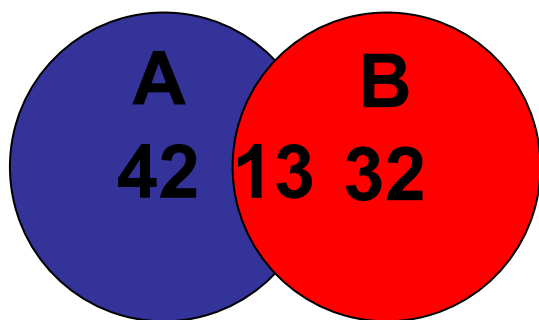
4.2.2.4.2.2. Kvantitativní analýza

Analýza průniku kvantitativních rozdílů (rozdíly v hladině exprese) graficky znázorněná na obrázku 4.24 ukázala, v prvním srovnání mezi experimenty A a B, které se lišily použitím proteomů ze skleněných nebo zirkoniových kuliček **13 proteinů** v průniku množin odlišných proteinů v obou experimentech. Tyto proteiny

pravděpodobně souvisí s růstem na kuličkách, bez ohledu na jejich povrch. Průnikem množin proteinů s odlišnou expresí v experimentech C a B, kde se v obou případech sledovala kultivace na zirkoniových kuličkách ve srovnání s tekutou půdou (B) a skleněnými kuličkami (C), byly **dva proteiny**, které mohou mít specifický význam pro růst na zirkoniových kuličkách. Srovnání množin odlišných proteinů v experimentech A a C (v obou případech skleněné kuličky) neukázalo **žádný průnik**. Jednotlivé proteiny je možné identifikovat v tabulkách dokumentujících experimenty A, B a C (kapitoly 4.2.2.1 až 4.2.2.3). Zde se barva stínování shoduje se stínováním popisu jednotlivých průniků v Obr. 4.24. a v indexu je pak počet proteinů v množině průniku.



Obr.4.23: Vennovy diagramy ukazující průniky množin unikátních proteinů ve srovnávacích proteomových experimentech A, B a C (kapitoly 4.2.2.1 až 4.2.2.3).
 Symboly v kružnicích – A, B, C – označení experimentu
 t(tekutá), s(sklo) a z(zirkonium) – způsob kultivace
 čísla v kružnicích udávají počty unikátních proteinů v jednotlivých situacích a čísla v průsečích počet proteinů vyskytujících se obou situacích (průnik)

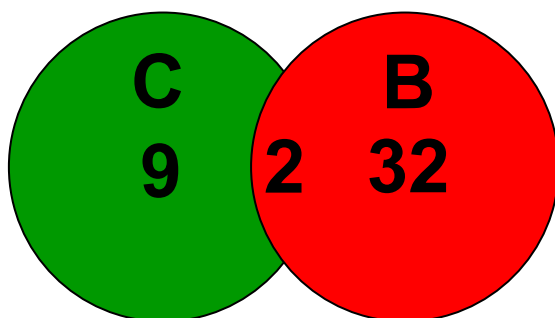


Proteiny ovlivněné růstem na mikrokuličkách

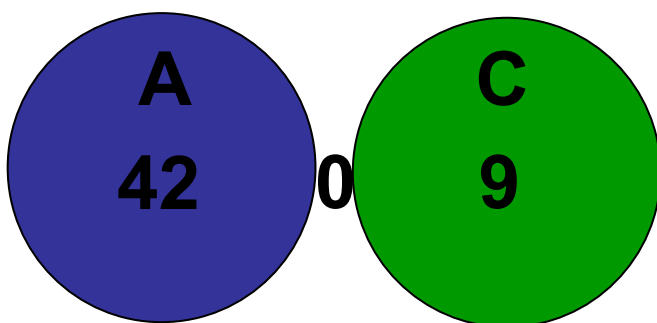
● Srovnání tekutá půda a sklo

● Srovnání tekutá půda a zirkonium

● Srovnání sklo a zirkonium



Proteiny ovlivněné růstem na zirkoniu



Obr.4.24: Vennovy diagramy ukazující průniky množin kvantitativně odlišných proteinů ve srovnávacích proteomových experimentech A, B a C (kapitoly 4.2.2.1 až 4.2.2.3.).

Symboły v kružnicích – A, B, C – označení experimentu

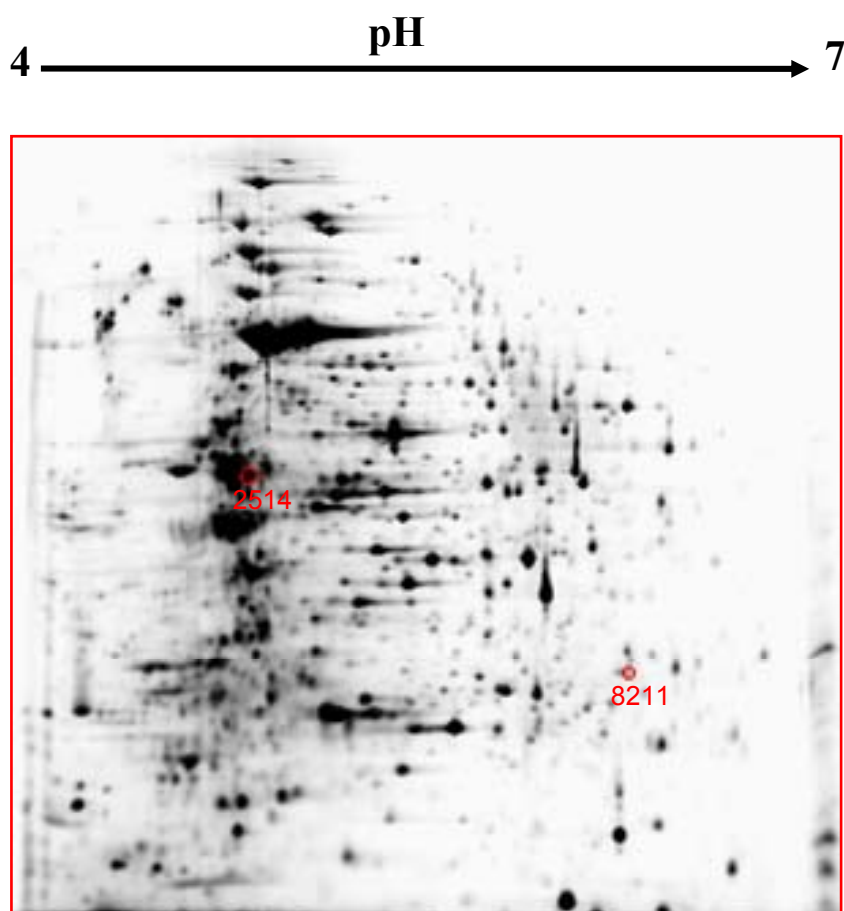
čísla v kružnicích udávají počty odlišných proteinů v jednotlivých experimentech a čísla v průsečích počet proteinů vyskytujících se obou situacích (průnik)

4.3. Vliv materiálu mikrokuliček na proteinový profil při jejich použití k rozbíjení buněk – proteomová analýza

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda se bude nějakým způsobem lišit proteom při rozbíjení buněk zirkoniovými nebo skleněnými kuličkami. Výrobce zirkoniových kuliček (BioSpec Inc., USA), které jsou určeny k rozbíjení biologického materiálu, uvádí jako jednu z jejich předností to, že na sebe neváží proteiny. Provedli jsme proto následující srovnání pro zirkoniové a skleněné kuličky, které jsou primárně určeny k jinému účelu (reflexní aditivum do silničních barev).

4.3.1. Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýza hodnotila to, které proteiny se vyskytují pouze v proteomu z buněk *S. granaticolor* rozbíjených třením se skleněnými kuličkami nebo pouze v proteomu *S. granaticolor* z buněk rozbíjených třením se zirkoniovými kuličkami. Na Obr. 4.25 jsou označeny na 2D gelu **2 unikátní proteiny** vyskytující se v proteomu z buněk *S. granaticolor* rozbíjených třením se skleněnými kuličkami, tedy chyběly v proteomu získanému na zirkoniových kuličkách. V tabulce 4.12. jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek. V proteomu izolovaném s použitím zirkoniových kuliček jsme **žádné unikátní proteiny** neobjevili.



Obr.4.25: 2D elektroforetický gel s unikátními proteiny vyskytujícími se v proteomu *S. granaticolor* z buněk rozbíjených třením se skleněnými kuličkami.

SSP	SD	průměr - sklo
2514	2520,7	4293,1
8211	402,8	1248,2

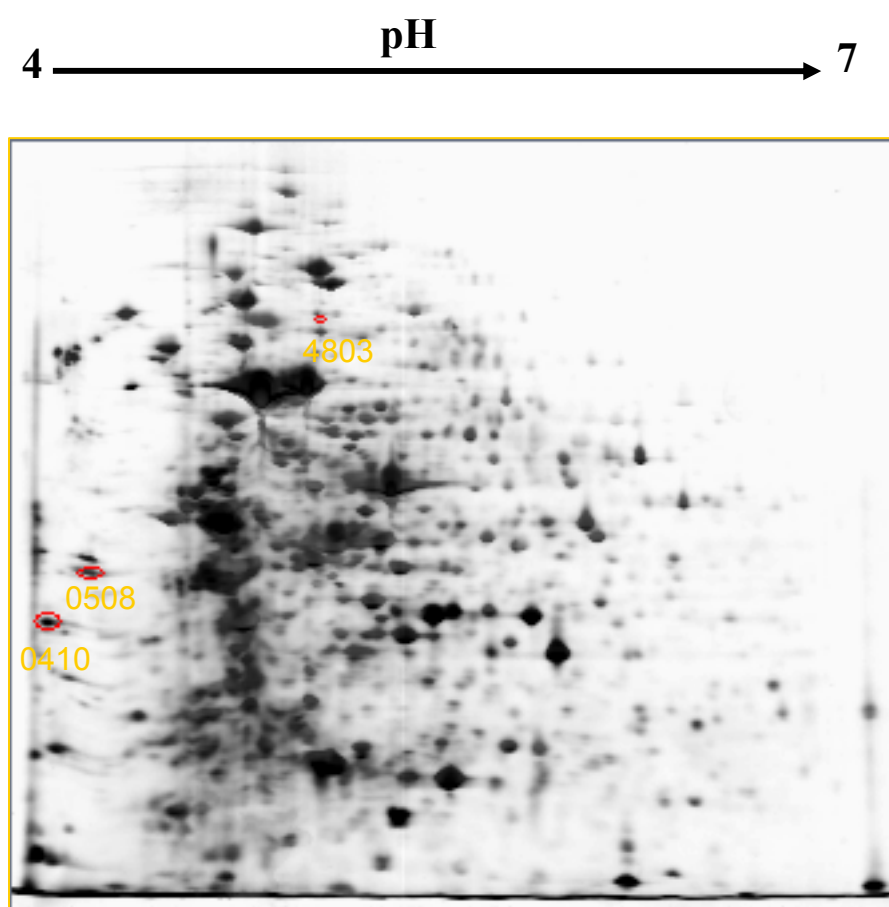
Tab.4.12: Unikátní proteiny vyskytující se pouze v proteomu *S. granaticolor* z buněk rozbíjených třením se skleněnými kuličkami.

SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny.

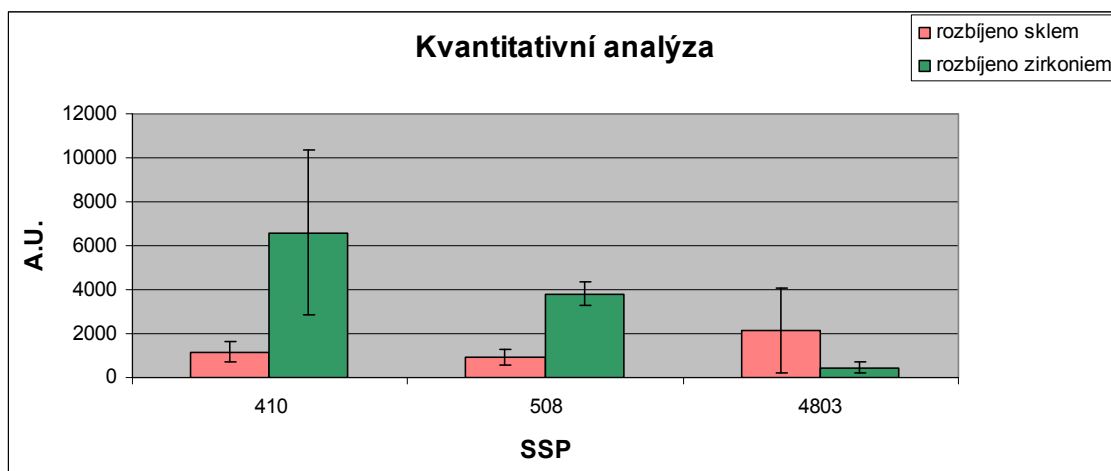
4.3.2. Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza sloužila k identifikaci proteinů které byly ve vyšší nebo nižší koncentraci v jednom z proteomů (izolovaných na skleněných nebo zirkoniových kuličkách). Zde byly vybrány proteiny, stejně jako ve všech předchozích

experimentech, u kterých se koncentrace lišila 4x a více ze srovnání 3-5 paralelních gelů od každého vzorku. Na obrázku 4.26 jsou označeny na 2D gelu **3 proteiny** lišící se koncentrací. Obrázek 4.27 znázorňuje srovnání rozdílů koncentrací vybraných proteinů získaných z porovnání proteomů *S. granaticolor* z buněk rozbíjených na skleněných nebo zirkoniových kuličkách. V tabulce 4.13 jsou pro tyto proteiny uvedeny hodnoty průměrné density jim odpovídajících skvrn a směrodatné odchylky pro průměrné hodnoty získané z analýzy sérií gelů pro každý vzorek.



Obr.4.26: 2D elektroforetický gel s proteiny s odlišnou koncentrací získanými ze srovnání proteomů *S. granaticolor* z buněk rozbíjených třením se skleněnými nebo zirkoniovými kuličkami. Proteiny jsou vyznačené na 2D gelu se vzorkem proteomu získaného ze zirkoniových kuliček.



Obr. 4.27: Srovnání koncentrací vybraných proteinů získaných ze srovnání proteomů *S. granaticolor* z buněk rozbíjených skleněnými (růžová) nebo zirkoniovými (zelená) kuličkami. Byly vybrány proteiny lišící se 4x a více. U každého proteinu je vyznačen rozptyl hodnoty density (koncentrace) ze srovnání paralelních gelů (3-4).

SSP – čísla skvrn (spotů) odpovídajících vybraným proteinům označeným na Obr. 4.26, A.U. – relativní jednotky udávající densitu skvrn.

SSP	SD	průměr sklo	SD	průměr zirkonium
410	473,4	1155,3	3742,9	6588,5
508	375,4	945,3	546,2	3800
4803	1950,4	2147,5	252,9	459,6

Tab.4.13: Hodnoty density (koncentrace) pro odlišné proteiny získané ze srovnání proteomů *S. granaticolor* z buněk rozbíjených skleněnými nebo zirkoniovými kuličkami.

SSP – číslo skvrny (spotu), SD – směrodatná odchylka, průměr – aritmetický průměr hodnoty density skvrny.

5. DISKUZE

Streptomycety jsou vláknité mikroorganismy, které prochází složitým životním cyklem. Ten zahrnuje tvorbu vzdušného mycelia, které roste kolmo na substrátové mycelium. V další fázi vývoje toto vzdušné mycelium začne vytvářet buněčná septa, ve kterých jsou uzavřeny jednotlivé chromosomy a takto změněné mycelium dává vznik řetízkům hydrofobních spor (BUTTNER a FLARCH 2009). Tato morfologická složitost je spolu s jejich schopností produkovat rozhodující většinu antibiotik využívaných v lékařské praxi a zemědělství činí zajímavým objektem pro základní výzkum i biotechnologický průmysl (THOMPSON *et al.* 2002).

V laboratorních podmínkách se streptomycety kultivují v tekuté půdě a nebo na pevném agaru, či na agaru pokrytém vrstvou celofánu, tak aby bylo možné z kultivace získat kulturu narostlou na celofánu bez kontaminace agarem. Kultivace na agaru (s celofánem) umožňuje sledovat diferenciaci streptomycet. Řada druhů streptomycet produkuje exocelulární enzym agarázu a to včetně *Streptomyces coelicolor* (KENDALL a CULLUM 1984). Tyto streptomycety jsou tak schopné povrch agaru rozrušovat a je velmi obtížné kulturu z jeho povrchu kvantitativně a reprodukovatelně odstranit (NGUYEN *et al.* 2005).

Při růstu v tekutém médiu streptomycety běžně nesporelují. Existují ale i výjimky jako je druh *S. griseus*, který může produkovat spory při kultivaci v tekutém médiu. (OKAMOTO *et al.* 1997).

V naší laboratoři byl vyvinut nový dvoufázový kultivační systém, který se snaží zajistit fyziologické podmínky, které by co nejvíce odpovídaly situacím v přirozeném životním prostředí jednotlivých druhů streptomycet a zároveň dovoloval studium diferenciaci streptomycet metodami molekulární biologie a zejména pak tzv. globálními technikami, jako je transkriptomika a proteomika. Systém je založen na pevné fázi, tvořené skleněnými nebo zirkoniovými kuličkami, jenž napodobují částice v půdě, jílu, písku (NGUYEN *et al.* 2005).

Použití skleněných kuliček umožnilo vytvořit jednoduchou a zejména levnou techniku pro sekvenční sledování antibiotické produkce, značení diferencovaných buněk a studium rozpadu mycelia. Systém dovoluje jednoduchý sběr mycelia či analýzy vytvářených sekundárních metabolitů, buď odstraněním kapalné fáze obsahující metabolity nebo pomocí extrakce intracelulárních metabolitů z homogenátu buněk po jejich rozbití. Navíc použité mikrokuličky mohou být s výhodou využity při rozbíjení

buněčné biomasy a to buď mechanickým třením (účinně rozbíjí i spory) nebo v nejrůznějších třepacích zařízeních typu BeadBeater (BioSpec Products Inc., USA) (NGUYEN *et al.* 2005).

V našich prvních experimentech jsme vybrali tři druhy streptomycet: *S. granaticolor*, *S. ambofaciens* a *S. coelicolor* a sledovali jsme na Petriho miskách s mikrokuličkami rychlost a míru jejich diferenciaci a zároveň produkci pigmentovaných sekundárních metabolitů (antibiotik). Použili jsme dva druhy kuliček – skleněné, od českého výrobce (Ornela a.s.) sloužící primárně jak reflexní aditivum do silničních barev a běžně používaných ve vědeckých laboratořích pro rozbíjení buněk mikroorganismů a silica/zirkoniové (BioSpec Products Inc.) určené primárně k rozbíjení buněk mikroorganismů a tkání. Zirkoniové kuličky jsou těžší (pro efektivnější rozbíjení buněk v třepacích zařízeních) a mají hydrofobnější povrch, toto je zcela zřetelné při manipulaci s kuličkami, ať suchými nebo ponořenými ve vodě, skleněné „tečou“, zirkoniové se „sypou“.

Rod *Streptomyces* je charakterizován schopností produkovat řadu antibiotik která jsou pigmentovaná. Například *S.coelicolor* A3 (2) produkuje jako pH indikátor chovající se antibiotikum actinorhodin, který za alkalických podmínek je modrý a v kyselém prostředí je červený. Actinorhodin je produkován jako sekundární metabolit, se slabými antibiotickými vlastnostmi a nevyužívá se klinicky (GODONGWANA *et al.* 2009). Podobně *S. granaticolor* produkuje antibiotikum granaticin, které je také snadno zjistitelné podle červené nebo modré barvy v závislosti na pH (BECHTHOLD *et al.* 1995; JAMES *et al.* 1991).

Použité druhy *S. granaticolor*, *S. coelicolor* a *S. ambofaciens* byly očkované ve formě sporové suspenze nebo z přes noc narostlého mycelia. Misky byly kultivovány po dobu 4 dnů. Obrázek 4.1.(kapitola 4.1.1.) ukazuje rozdíly v morfologické diferenciaci a v produkci pigmentovaných antibiotik, které vyplývají z růstové rychlosti jednotlivých druhů. Dalším rozdílem je efekt použitého inokula, který není příliš významný, souvisí s kratší cestou k ukončení buněčného cyklu u inokula z mycelia a opět se liší mezi jednotlivými druhy. Za nejvýznamnější rozdíly je možné považovat ty, které souvisí s materiálem použitých mikrokuliček. Zřetelně se ukázalo, že jak nárůst, tak tvorba pigmentovaných antibiotik je podstatně silnější na skleněných než na zirkoniových kuličkách. V případě *S. granaticolor* je zřejmé, že materiál kuliček ovlivňuje metabolismus streptomycet, což se mimo jiné projevuje odlišným pH kultury, to je indikováno změnou barvy granaticinu mezi červenou a modrou (pigmentované

antibiotikum chovající se jako acido-bazický indikátor). Dalším rozdílem je i tvar a velikost kolonií na jednotlivých miskách v závislosti na materiálu mikrokuliček.

V další fázi jsme sledovali tvorbu kolonií streptomycet na různých površích. *S.granaticolor* a *S. ambofaciens* jsme kultivovali na agaru a na skleněných a zirkoniových kuličkách. Kultivace probíhala 4 dny. Na obrázku 4.2. (kapitola 4.1.2.) je vidět, že tvorba kolonií na agaru, skle a zirkoniu je rozdílná. Oba druhy rostou lépe na skle a navíc kolonie zejména v případě *S. granaticolor* jsou podstatně homogennější na mikrokuličkách než na agaru. Při kultivaci na zirkoniových kuličkách tvoří kolonie menší ohraničené chomáčky a jsou více izolované.

Pro důkladnější sledování morfologie a diferenciaci *S.granaticolor* a *S. ambofaciens* byla použita SEM analýza. Zaměřili jsme se na sledování průběhu diferenciaci v kultivaci na skleněných kuličkách. V případě *S. ambofaciens*, je po 22 h kultivace vytvořena hustá síť vegetativního mycelia, které se plazí po povrchu mikrokuliček. Po 48 h začíná růst vzdušného mycelia a až po 72 h vzdušné mycelium přechází v kroucené řetízky spor. V případě *S. granaticolor* lze po 24 h pozorovat poměrně hustě narostlé vzdušné mycelium, které už ze 3/4 obaluje jednotlivé mikrokuličky. Vzdušné mycelium se v průběhu dalších 24 h dále zahušťuje a na koncích vláken se začínou tvořit jednotlivé řetízky spor. Srovnání potvrzuje pozorování z tekuté půdy, kdy *S. granaticolor* roste podstatně rychleji než ostatní srovnávané druhy. Obdobně je diferenciacní proces u tohoto druhu kompletně ukončen během 2 dnů.

Streptomycety jsou hojně využívány jako zdroje nových sekundárních metabolitů se škálou biologických aktivit, které mohou nakonec najít použití jako protiinfekční, protirakovinná léčiva nebo jiné farmaceuticky významné sloučeniny. Produkce sekundárních metabolitů Gram-pozitivních myceliálních streptomycet se obecně shoduje nebo mírně předchází rozvoji vzdušných hyf v povrchově-pěstovaných kulturách (BIBB 2005).

V další studii jsme se zaměřili na kvantitativní hodnocení produkce pigmentovaných antibiotik na skleněných a zirkoniových kuličkách. Pracovali jsme pouze s *S.granaticolor* jako modelovým organismem. Má několik předností, které jsou výhodné i pro další studie. Může být kultivován v disperzní podobě v tekutém médiu, produkuje barevný sekundární metabolit granaticin, který je jednoduše měřitelný spektrofotometricky a tak se může využít jako marker různých růstových stadií kultury a produkuje velké množství submerzních spor (JANEČEK *et al.* 1997).

U *S. granaticolor* byla sledována produkce granaticinu v závislosti na materiálu mikrokuliček, na kterých kultura rostla. Produkce granaticinu byla sledována na mediu „MG“. *S. granaticolor* byl očkovan na skleněné a zirkoniové kuličky a jako pozitivní kontrola byla použita tekutá kultura. Produkce granaticinu byla sledována v průběhu čtyř dnů (Obr. 4.5). Kvantitativně posoudit produkci pigmentovaných antibiotik pouhým pozorováním misek je velmi obtížné vzhledem odlišné transparentnosti skleněných a zirkoniových kuliček. Koncentrace granaticinu byla proto měřena v extraktech z kultivačního media a vypočtena z hodnot absorbance při 572 nm (viz. Kapitola 3.5.). Ve stejném vzorku pak byla měřena i koncentrace proteinů. Srovnání ukázalo, že jak produkce granaticinu, tak i nárůst měřený koncentrací proteinů je nejvyšší na skleněných kuličkách. Zatímco produkce granaticinu na mg proteinu je stejná v tekuté kultuře jako na zirkoniových kuličkách je na skleněných kuličkách vyšší o více než 25%.

V literatuře je jen velmi málo údajů o vlivu povrchu na růst a produkci sekundárních metabolitů u streptomycet nebo vlivu streptomycet na povrchy, na kterých je možné je nalézt. Li a kol. zjistili, že streptomycety mohou způsobovat korozi ocelových konstrukcí (LI *et al.* 2010), u *Streptomyces rimosus* byla studována produkce oxytetracyklinů kulturami imobilizovanými na skleněné vatě (FARID *et al.* 1994) a u *Streptomyces anulatus*, jako streptomycety objevující se spolu s plísněmi ve zděných a dřevěných stavbách, bylo ukázáno, že vyvolává různou zánětlivou odpověď u makrofágů v závislosti na povrchu, na kterém roste (ROPONEN *et al.* 2001). Byl také studován vliv růstu ve formě biofilmu na membráně na produkci sekundárních metabolitů v membránovém rotačním reaktoru (SARKAR *et al.* 2010).

Jak jsme ukázali v naší práci povrch mikrokuliček, na kterých jsme prováděli kultivace hraje roli jak v dynamice růstu, morfologické diferenciaci tak i při produkci sekundárních metabolitů. Pozorování rozdílů při tvorbě kolonií pomocí binokulární lupy bylo potvrzeno nálezy z SEM, kdy mladé vegetativní mycelium (6 h) porůstá celý povrch skleněných kuliček zatímco v případě zirkoniových jsme našli velký počet kuliček porostlých jen z části (Obr. 4.9.).

Tato pozorování ukazují, že biofilm je na skleněných kuličkách pevně přichycen a udrží se i když se medium začne odpařovat (při přípravě vzorků pro SEM), zatímco v případě zirkoniových kuliček jakoby sklouzne po povrchu. Obdobný efekt pozorovala B. Sitařová při studiu tvorby biofilmu mykobakterií na stejných kuličkách (B. Sitařová, osobní sdělení).

Je zřejmé, že v případě *S. granaticolor* se efekty související s přisednutím na povrch kuliček a ovlivnění metabolismu streptomycet v důsledku tohoto procesu odehrávají v prvních hodinách růstu. Proto jsme při proteomových studiích, jejichž cílem bylo identifikovat soubory proteinů souvisejících s planktonickým růstem a růstem na skleněných a zirkoniových kuličkách sledovali kultury po 6 h kultivace (viz Tab. 4.10. a 4.11.)

Nejprve jsme porovnávali proteom *S. granaticolor* ze submerzní kultivace (tedy planktonický růst) s proteomem izolovaným z biofilmu na skleněných kuličkách po 6 h kultivace (experiment A). Nalezli jsme 6 unikátních proteinů v submerzní kultuře, 32 unikátních proteinů v biofilmu na kuličkách a kvantitativně se výrazně lišilo 42 proteinů. Z nich 26 bylo nahoru regulovaných a 16 dolů regulovaných (vztaženo submerzní kultivaci).

Experiment B se lišil od experimentu A materiálem kuliček, kultura rostla na zirkoniových kuličkách. A i zde jsme našli vysoký počet unikátních proteinů v kultuře rostoucí na zirkoniových kuličkách (28) a malý počet unikátních proteinů v submerzní, třepané kultuře (2). Odlišných proteinů bylo 32 a opět v obdobném poměru jako v experimentu A (2:1), 21 nahoru regulovaných proteinů a 11 dolů regulovaných (vztaženo k submerzní kultivaci). Další informace o důvodech těchto rozdílů a zejména o funkci proteinů by měla přinést identifikace genů kódujících tyto proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie, na které se v laboratoři pracuje.

Poslední experiment (C) srovnával proteomy z kultur *S. granaticolor* rostoucích na skleněných nebo zirkoniových kuličkách. Zde jsme očekávali menší rozdíly související výhradně s typem povrchu kuliček. U skleněných kuliček jsme našli 6 unikátních proteinů, ale překvapivě u zirkoniových kuliček unikátních proteinů bylo 14. Odlišných proteinů byl ale poměrně malý počet (9), nahoru regulovaných 5 a dolů 4 (vzhledem ke skleněným kuličkám). I zde zásadní informace o významu těchto čísel přinese určení funkce identifikovaných proteinů.

Analýza průniků výsledků jednotlivých proteomových srovnání pomocí Vennových diagramů přinesla zajímavé výsledky při hledání proteinů, které mohou mít specifický význam pro planktonický růst a zejména pro objasnění změn proteinových profilů souvisejících s růstem na skleněných a zirkoniových kuličkách.

Analýza průniků množin unikátních proteinů z jednotlivých srovnání ukázala v první řadě na 12 proteinů, které mohou mít význam pro růst na kuličkách bez ohledu na kvalitu jejich povrchu a pouze 1 protein důležitý pro růst v třepané kultuře v baňce.

Vytipovali jsme jeden protein, který může mít specifický význam pro růst na zirkoniových kuličkách a 6 proteinů důležitých pro růst na skleněných kuličkách. Analýza odlišných proteinů podobně jako v případě unikátních proteinů ukázala poměrně vysoký počet proteinů (13) souvisejících s růstem na kuličkách bez ohledu na kvalitu jejich povrchu. Nalezli jsme 2 proteiny důležité pro růst na zirkoniových kuličkách a žádný v průniku experimentů A a C. Obdobně jako v případě unikátních proteinů jsme určili pouze jeden odlišný protein, který může mít význam pro planktonický růst bez ohledu na teplotu a jeden protein, který může být důležitý pro tvorbu biofilmu (viz Obr. 4.23. a 4.24.). I zde bude důležité určit funkci těchto proteinů.

V literatuře není mnoho informací o proteinech, které by se mohly podílet na adhezi streptomycet na nejrůznější povrchy s výjimkou studie o funkci proteinu ChpA-H z rodiny chaplinů, který se podílí na vytváření struktury fimbrií u *S. coelicor*, které zprostředkují vazbu buněk k povrchu (DE JONG *et al.* 2009). Dalším kandidátním proteinem je celulóza syntetáza nebo analogické enzymy, které se podílejí na syntéze beta-glukan obsahujících polysacharidů účastnících se ve strukturách bakteriálních biofilmů (XU *et al.* 2008).

Proteomika využívá řadu technik pro separaci proteinů a jejich následnou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie často bez využití elektroforézy proteinů a zároveň se zvyšuje počet studií využívajících transkriptomických a proteomických technik současně a tak umožňujících systémový pohled na fyziologii studovaného organismu (JAYAPAL *et al.* 2008). Nicméně i v těchto případech je třeba používat reprodukovatelné a efektivní způsoby přípravy proteinových vzorků. Této oblasti se týká i poslední proteomová studie této práce. Jejím cílem bylo ověřit zda používání skleněných mikrokuliček při rozbíjení bakteriálních buněk nepřináší riziko plynoucí z nespecifické vazby proteinů na skleněné kuličky a tím ovlivnění konečných proteomových analýz. Mikrokuličky vyráběné k vědeckým účelům (např. BioSpec Products Inc., USA) jsou vždy výrobcem charakterizovány tím, že neváží proteiny. S cílem zjistit, zda nemá materiál mikrokuliček nějaký vliv na proteinový profil při jejich použití k rozbíjení buněk a jejich následnou analýzu pomocí 2D-elektroforézy jsme porovnali proteomy z buněk z tekuté kultury *S. granaticolor*, získané z poloviny buněk rozbitých pomocí skleněných kuliček a z poloviny pomocí zirkoniových kuliček. Provedli jsme opět kvalitativní a kvantitativní analýzu a srovnání obou proteomů ze serie 3-5 paralelních vzorků pro každý vzorek.

Kvalitativní analýza hodnotila to, které proteiny se vyskytují pouze v proteomu z buněk *S. granaticolor* rozbíjených třením se skleněnými mikrokuličkami nebo pouze v proteomu *S. granaticolor* z buněk rozbíjených třením se zirkoniovými mikrokuličkami. Analýza vyhodnotila 2 unikátní proteiny vyskytující se v proteomu z buněk *S. granaticolor* rozbíjených třením se skleněnými mikrokuličkami, ty tedy chyběly v proteomu získaném rozbíjením zirkoniovými kuličkami. V proteomu izolovaném s použitím zirkoniových mikrokuliček jsme žádné unikátní proteiny neobjevili.

Kvantitativní analýza sloužila k identifikaci proteinů které byly ve vyšší nebo nižší koncentraci v jednom z proteomů (izolovaných na skleněných nebo zirkoniových kuličkách). Zde byly vybrány proteiny, stejně jako ve všech předchozích experimentech, u kterých se koncentrace lišila 4x a více. Získali jsme 3 proteiny lišící se koncentrací. Z nich u dvou byla koncentrace vyšší při použití zirkoniových kuliček. Z těchto výsledků lze říci že materiál mikrokuliček ani jejich zdroj nemá žádný významný vliv na kvalitativní nebo kvantitativní změny v proteomu streptomycet při jejich použití k rozbíjení buněčné masy. Lze tedy uzavřít, že použití skleněných mikrokuliček určených jako reflexní aditivum do silničních barev (Ornela a.s. Česká Republika) nepředstavuje žádný problém z hlediska nespecifické vazby proteinů a navíc přináší značné finanční úspory, protože kilogramová cena těchto mikrokuliček je více než 50x nižší než u produktu dodávaného BioSpec Products Inc.

6. SOUHRN

1. Sledovali jsme morfologickou diferenciaci *S. coelicolor*, *S. granaticolor* a *S. ambofaciens* na skleněných a zirkoniových kuličkách a zjistili jsme několik rozdílů. Nárůst streptomycet na skleněných kuličkách je podstatně větší než na zirkoniových kuličkách. Tvar a velikost kolonií je jiná v závislosti na druhu materiálu kuliček.
2. Porovnávali jsme tvorbu kolonií *S. granaticolor* a *S. ambofaciens* na různých površích po dobu 4 dnů. Oba druhy rostou lépe na skle a zejména u *S. granaticolor* jsou kolonie homogennější na mikrokuličkách než na agaru. Na zirkoniových kuličkách se tvoří kolonie menší, vypadají jako ohraničené chomáčky a jsou více izolované.
3. Pomocí SEM analýzy jsme se zaměřili na sledování morfologické diferenciaci u kmenů *S. granaticolor* a *S. ambofaciens*. V případě *S. ambofaciens* se během 22 h vytvoří hustá síť vegetativního mycelia, po 48 h začíná růst vzdušného mycelia a v 72 h přechází vzdušné mycelium v kroucené řetízky spor. V případě *S. granaticolor* je růst podstatně rychlejší a už v 24 h se tvoří vzdušné mycelium. Po 48 h se na jednotlivých koncích vláken začínají tvořit řetízky spor.
4. U kmene *S. granaticolor* jsme zjišťovali, zda se nějak liší produkce granaticinu při růstu na skleněných a zirkoniových kuličkách. Zjistili jsme, že jak produkce granaticinu, tak i nárůst měřený koncentrací proteinů je nejvyšší na skleněných kuličkách. Zatímco produkce granaticinu na mg proteinu je stejná jak v tekuté kultuře tak na zirkoniových kuličkách, na skleněných kuličkách je až o 25% vyšší.
5. Pomocí srovnávací proteomiky jsme se snažili identifikovat u *S. granaticolor* proteiny, které se podílejí na rozpoznání a přichycení vegetativních hyf na rozdílné povrchy. Porovnávali jsme proteomy z kultur rostoucích planktonicky v baňce a na skleněných nebo zirkoniových kuličkách po dobu 6 h. S použitím analýzy pomocí Vennových diagramů, jsme zjistili 12 unikátních proteinů, které mohou souviset s růstem na kuličkách bez ohledu na jejich povrch, jeden protein který může mít

specifický význam pro růst v tekuté půdě, jeden protein, který může mít význam pro růst na zirkoniových kuličkách a 6 proteinů, které mohou mít zásadní význam pro růst na skleněných kuličkách. Kvantitativní analýza odlišných proteinů ukázala poměrně vysoký počet proteinů (13) souvisejících s růstem na kuličkách bez ohledu na kvalitu jejich povrchu. Nalezli jsme 2 proteiny důležité pro růst na zirkoniových kuličkách a žádný pro skleněné kuličky.

6. Zjišťovali jsme, zda při rozbíjení buněk má nějaký vliv materiál mikrokuliček na jejich výsledný proteomový profil. Rozdíly byly minimální a svědčily spíše ve prospěch použití skleněných kuliček. Prokázali jsme tedy, že použití skleněných mikrokuliček (Ornela a.s., Česká Republika) nepředstavuje žádný problém z hlediska nesespecifické vazby proteinů a navíc přináší značné finanční úspory.

7. SEZNAM LITERATURY

1. Barker, K.F. (1999): Antibiotic resistance: a current perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology* 48: 109-124.
2. Bechthold, A., Sohng, J.K., Smith, T.M., Chu, X., Floss, H.G. (1995): Identification of *Streptomyces-Violaceoruber* Tu22 Genes Involved in the Biosynthesis of Granaticin. *Molecular & General Genetics* 248: 610-620.
3. Bibb, M.J. (2005): Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 8: 208-215.
4. Bouchal, P., Kučera, I. (2003): Two-Dimensional Electrophoresis in Proteomics: Principles and Applications. *Chemicke Listy* 97: 29-36.
5. Brabban, A.D., Edwards, C. (1996): Characterization of growth and product formation by a thermophilic streptomycete grown in a particulate rapemeal-derived liquid medium. *Journal of Applied Microbiology* 80: 651-658.
6. Buttner, M.J., Flarch, K. (2009): *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 7: 36-49.
7. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P. (1998): The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
8. de Jong, W., Wosten, H.A., Dijkhuizen, L., Claessen, D. (2009): Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* 73: 1128-1140.
9. Farid, M.A., Eldiwany, A.I., Elenshasy, H.A. (1994): Production of Oxytetracycline and Rifamycins-B and Sv with Cells Immobilized on Glass Wool. *Acta Biotechnologica* 14: 67-74.
10. Flardh, K. (2003): Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* 49: 1523-1536.
11. Gehring, A.M., Wang, S.T., Kearns, D.B., Storer, N.Y., Losick, R. (2004): Novel genes that influence development in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 186: 3570-3577.

12. Godongwana, B., De Jager, D., Sheldon, M.S., Edwards, W. (2009): The effect of *Streptomyces coelicolor* development on the hydrodynamics of a vertically orientated capillary membrane gradostat reactor. *Journal of Membrane Science* 333: 79-87.
13. Grunbaum, B. (1984): THE CONSTRUCTION OF VENN DIAGRAMS. *College Mathematics Journal* 15: 238-247.
14. Gstaiger, M., Aebersold, R. (2009): Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet* 10: 617-627.
15. Hesketh, A.R., Chandra, G., Shaw, A.D., Rowland, J.J., Kell, D.B., Bibb, M.J., Chater, K.F. (2002): Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 46: 917-932.
16. Hodgson, D.A. (2000): Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria *Adv Microb Physiol* 42: 47-238.
17. Hu, L., Ye, M., Zou, H. (2009): Recent advances in mass spectrometry-based peptidome analysis. *Expert Rev Proteomics* 6: 433-447.
18. Hutchinson, C.R. (1998): Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. *Current Opinion in Microbiology* 1: 319-329.
19. Chakraborty, R., Bibb, M. (1997): The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal Of Bacteriology* 179: 5854-5861.
20. Chater, K.F. (1998): Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology-Sgm* 144: 1465-1478.
21. Chater, K.F. (2006): *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 361: 761-768.
22. Chmelik, J. (2005): Proteomic guide. *Chemicke Listy* 99: 883-885.
23. Choi, S.-S., Seon-Hye Kim, and Eung-Soo Kim (2010): Proteomics-Driven Identification of SCO4677-Dependent Proteins in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(3): 480 - 484.

24. James, P.D.A., Edwards, C., Dawson, M. (1991): The Effects of Temperature, Ph and Growth-Rate on Secondary Metabolism in *Streptomyces-Thermoviolaceus* Grown in a Chemostat. *Journal of General Microbiology* 137: 1715-1720.
25. Janeček, J., Tichý, P., Spížek, J., Vaněk, Z. (1997): Constitution of the metabolic type of streptomycetes during the first hours of cultivation. *Folia Microbiol.* 42: 75-96.
26. Janssen, P.H. (2006): Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72: 1719-1728.
27. Jayapal, K.P., Philp, R.J., Kok, Y.J., Yap, M.G.S., Sherman, D.H., Griffin, T.J., Hu, W.S. (2008): Uncovering Genes with Divergent mRNA-Protein Dynamics in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* 3.
28. Kelemen, G.H., Buttner, M.J. (1998): Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* 1: 656-662.
29. Kendall, K., Cullum, J. (1984): Cloning and expression of an extracellular-agarase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Streptomyces lividans* 66. *Gene* 29: 315-321.
30. Kolter, R., Watnick, P. (2000): Biofilm, city of microbes. *Journal Of Bacteriology* 182: 2675-2679.
31. Lee, K.W., Song, E., Kim, J.H., Lee, H.C., Liou, K.K., Sohng, J.K., Kim, B.G. (2007): Enhanced proteomic analysis of *Streptomyces peucetius* cytosolic protein using optimized protein solubilization protocol. *J Microbiol Biotechnol* 17: 89-95.
32. Li, S.M., Zhang, Y.Y., Du, J., Liu, J.H., Yu, M. (2010): Influence of streptomycetes on the Corrosion Behavior of Steel A3 in *Thiobacillus ferrooxidans* Media. *Acta Chimica Sinica* 68: 67-74.
33. Mah, T.F., O'Toole, G.A. (2001): Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34-39.
34. Manteca, A., Fernandez, M., Sanchez, J. (2005): A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology-Sgm* 151: 3689-3697.

35. Manteca, A., Jung, H.R., Schwammle, V., Jensen, O.N., Sanchez, J. (2010): Quantitative Proteome Analysis of *Streptomyces coelicolor* Nonsporulating Liquid Cultures Demonstrates a Complex Differentiation Process Comparable to That Occurring in Sporulating Solid Cultures. *Journal of Proteome Research* 9: 4801-4811.
36. Manteca, A., Mader, U., Connolly, B.A., Sanchez, J. (2006): A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. *PROTEOMICS* 6: 6008-6022.
37. Manteca, A., Sanchez, J. (2009): *Streptomyces* Development in Colonies and Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2920-2924.
38. Martin, J.F. (2004): Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* 186: 5197-5201.
39. Mazza, P., Noens, E.E., Schirner, K., Grantcharova, N., Mommaas, A.M., Koerten, H.K., Muth, G., Flardh, K., van Wezel, G.P., Wohlleben, W. (2006): MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol Microbiol* 60: 838-852.
40. Mendez, C., Salas, J.A. (1998): ABC transporters in antibiotic-producing actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 158: 1-8.
41. Mikulik, K., Bobek, J., Bezouskova, S., Benada, O., Kofronova, O. (2002): Expression of proteins and protein kinase activity during germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 335-342.
42. Nguyen, L.D., Kalachova, L., Novotna, J., Holub, M., Kofronova, O., Benada, O., Thompson, C.J., Weiser, J. (2005): Cultivation system using glass beads immersed in liquid medium facilitates studies of *Streptomyces* differentiation. *Appl Environ Microbiol* 71: 2848-2852.
43. Nodwell, J.R., Losick, R. (1998): Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *Journal Of Bacteriology* 180: 1334-1337.

44. Novotna, J., Vohradsky, J., Berndt, P., Gramajo, H., Langen, H., Li, X.M., Minas, W., Orsaria, L., Roeder, D., Thompson, C.J. (2003): Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Molecular Microbiology* 48: 1289-1303.
45. Ochi, K. (2007): From microbial differentiation to ribosome engineering. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71: 1373-1386.
46. Okamoto, S., Itoh, M., Ochi, K. (1997): Molecular cloning and characterization of the *obg* gene of *Streptomyces griseus* in relation to the onset of morphological differentiation. *Journal Of Bacteriology* 179: 170-179.
47. Parker, J.L., Jones, A.M., Serazetdinova, L., Saalbach, G., Bibb, M.J., Naldrett, M.J. (2010): Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *PROTEOMICS* 10: 2486-2497.
48. Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A., van Wezel, G.P. (2008): Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *Embo Reports* 9: 670-675.
49. Roponen, M., Toivola, M., Meklin, T., Ruotsalainen, M., Komulainen, H., Nevalainen, A., Hirvonen, M.R. (2001): Differences in inflammatory responses and cytotoxicity in RAW264.7 macrophages induced by *Streptomyces anulatus* grown on different building materials. *Indoor Air-International Journal of Indoor Air Quality and Climate* 11: 179-184.
50. Sarkar, S., Roy, D., Mukherjee, J. (2010): Production of a potentially novel antimicrobial compound by a biofilm-forming marine *Streptomyces* sp. in a niche-mimic rotating disk bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 33: 207-217.
51. Scherr, N., Nguyen, L. (2009): Mycobacterium versus *Streptomyces*--we are different, we are the same. *Current Opinion in Microbiology* 12: 699-707.
52. Tahlan, K., Ahn, S.K., Sing, A., Bodnaruk, T.D., Willems, A.R., Davidson, A.R., Nodwell, J.R. (2007): Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 63: 951-961.

53. Thompson, C., Fink, D., Nguyen, L. (2002): Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology* 3: reviews1020.1021 - reviews1020.1024.
54. Umeyama, T., Lee, P.C., Horinouchi, S. (2002): Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 419-425.
55. Váňa, P., Šmarda, J. (2004): Proteome Analysis in BM2 Leukemia Cell Line: Determination of Optimal Conditions for Sample Preparation in Two-Dimensional Electrophoresis *Chemicke Listy* 98: 1130-1134.
56. Vilain, S.b. (2003): Biofilm Proteome: Homogeneity or Versatility? *Journal of proteome* 3: 132-136.
57. Viollier, P.H., Minas, W., Dale, G.E., Folcher, M., Thompson, C.J. (2001): Role of Acid Metabolism in *Streptomyces coelicolor* Morphological Differentiation and Antibiotic Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 183: 3184-3192.
58. Weiser, J., Holub, M., Nezbedova, S., Bezouskova, S. (2005): Proteomics represents complex approach in studies of regulation of bacterial physiology. *Chemicke Listy* 99: 890-895.
59. Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996): From proteins to proteomes: large scale protein identification by two- dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 14: 61-65.
60. Xu, H.B., Chater, K.F., Deng, Z.X., Tao, M.F. (2008): A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in *Streptomyces*. *Journal Of Bacteriology* 190: 4971-4978.