

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Andrej Herbrík

Kolonizácia ľudských pľúc nepatogénnymi streptomycétami
Colonization of human lung by non-pathogenic streptomycetes

Diplomová práca

Školiteľ: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 07. 08. 2019

Bc. Andrej Herbrík

Pod'akovanie:

Touto cestou by som sa chcel v prvom rade poďakovať školiteľke Mgr. Kateřine Petříčkové, Ph.D. za jej ochotu, cenné rady a odborné konzultácie, ktoré boli nesmierne nápomocné pri vypracovávaní a písaní tejto diplomovej práce.

Moje poďakovanie tiež patrí RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D za ustrétoivosť a odborné konzultácie pri spracovávaní imunologickej časti práce. Za ochotu a praktickú pomoc s touto časťou práce by som rád poďakoval aj Ing. Petre Petráskové.

V neposlednom rade by som rád poďakoval Ing. Matouši Čihákovi za analýzu LC-MS a celej mojej rodine a priateľom za podporu behom môjho štúdia a vypracovávaní tejto diplomovej práce.

ABSTRAKT

Streptomycéty, primárně půdní saprofytické mikroorganismy, jsou v centru zájmu mnoha výzkumných skupin zejména díky jejich schopnosti produkce širokého spektra biologicky aktivních látek využitelných v medicíně, biotechnologiích a zemědělství. Okrajovou a málo prozkoumanou oblastí jsou interakce, které streptomycéty vytvářejí s člověkem. Nedávné metagenomické studie dokazují, že streptomycéty kolonizují kůži, respirační a pravděpodobně i urogenitální trakt lidí. Kromě zjevných patogenů jakými jsou druhy *S. somaliensis* a *S. sudanensis* je klinický impakt těchto streptomycét na lidské zdraví neznámý. I z tohoto důvodu vznikla unikátní sbírka nepatogenních streptomycét izolovaných z lidských klinických vzorků. Izoláty byly shromážděny Národní referenční laboratoří pro patogenní aktinomycety v Trutnově, Česká republika. Na základě pilotních studií byl z trutnovské sbírky vybrán izolát s označením TR42, který vykazuje velmi široké spektrum biologických aktivit. Tento kmen byl izolován ze sputa od pacienta s neznámou respirační diagnózou. Kmen TR42 vykazuje značný biotechnologický potenciál a po důkladném studiu by mohl být zdrojem nových biologicky aktivních látek s farmaceuticky atraktivními vlastnostmi. Předložená práce je zaměřena na identifikaci a charakterizaci specifických adaptačních mechanismů kmene TR42 na prostředí lidských plic, a to hlavně z hlediska produkce hemolytických, antimikrobiálních a imunomodulačních látek. Zkoumaný je zejména efekt na plicní mikrobióm (fyziologický i patologický) a lidské monocytické buňky z linie THP-1. Získané poznatky slouží k evaluaci klinického impaktu streptomycét kmene TR42 na lidské zdraví.

Klíčová slova: *Streptomyces*, klinické izoláty streptomycét, plicní mikrobióm, hemolýza, antimikrobiální aktivita, imunomodulátory

ABSTRACT

Streptomycetes, primary soil saprophytic microorganisms are at the center of interest in many research groups, mainly because of their ability to produce a wide range of biologically active substances useful in medicine, biotechnology and agriculture. The marginal, and little explored areas are the interactions that streptomycetes create with humans. Recent metagenomic studies have shown that streptomycetes colonize the skin, the respiratory and possibly the urogenital tract of humans. In addition to apparent pathogens such as *S. somaliensis* and *S. sudanensis*, the clinical impact of these streptomycetes on human health is unknown. For this reason, a unique collection of non-pathogenic streptomycetes isolated from human clinical specimens was developed. The isolates were collected by the National Reference Laboratory for Pathogenic Actinomycetes in Trutnov, Czech Republic. On the basis of pilot studies, an isolate labeled TR42 was selected from the Trutnov collection, showing a very broad spectrum of biological activities. This strain was isolated from sputum from a patient with unknown respiratory diagnosis. The TR42 strain exhibits considerable biotechnological potential and after following a thorough study, it could be a source of new biologically active substances with pharmaceutically attractive properties. The present work is focused on the identification and characterization of specific adaptation mechanisms of the TR42 strain to the human lung environment, especially in production of hemolytic, antimicrobial and immunomodulatory agents. In particular, the effect on lung microbiome (both physiological and pathological) and human monocytic cells from the THP-1 line are investigated. The findings are used to evaluate the clinical impact of TR42 streptomycetes on human health.

Key words: *Streptomyces*, clinical streptomycetes isolates, pulmonary microbiome, hemolysis, antimicrobial activity, immunomodulators

Obsah

Zoznam skratiek	5
1 Úvod.....	7
2 Ciele práce a hypotéza.....	9
2.1 Ciele práce.....	9
2.2 Hypotéza	9
3 Všeobecná charakteristika streptomycét	10
3.1 Výskyt.....	10
3.2 Životný cyklus	11
3.3 Genóm	12
3.4 Sekundárne metabolity	13
4 Interakcie streptomycét	15
4.1 Interakcie s rastlinami a živočíchmi	15
4.2 Interakcie s človekom.....	17
4.2.1 Izolácia patogénnych a nepatogénnych streptomycét z ľudských klinických vzoriek	17
4.2.2 Kmene Trutnov a Ostrava.....	18
4.3 Hemolýza.....	20
4.3.1 Streptomycéty a hemolýza.....	21
4.3.1.1 Hemolytická aktivita sekundárnych metabolitov streptomycét	22
5 Imunitný systém človeka.....	23
5.1 Nešpecifická, vrodenná imunitná odpoveď	24
5.1.1 Zápal	24
5.1.2 Makrofágy	25
5.1.3 Interleukin 1 β (IL-1 β).....	26
6 Materiál a metódy.....	27
6.1 Materiál.....	27
6.1.1 Bakteriálne kmene	27
6.1.2 Vektory	28
6.1.3 Kultivačné médiá.....	30
6.1.3.1 Tekuté kultivačné médiá.....	30
6.1.3.2 Kultivačné médiá s agarom	32
6.1.4 Roztoky a pufry	33
6.1.5 DNA oligonukleotidy a veľkostný štandard.....	39

6.1.6	Komerčné kity	39
6.2	Metódy.....	41
6.2.1	Metódy izolácie DNA.....	41
6.2.2	Metódy ďalšej práce s DNA.....	44
6.2.3	PCR reakcie	47
6.2.4	Génové manipulácie	49
6.2.5	Analytické a separačné metódy	50
6.2.5.1	Extrakcia sekundárnych metabolitov z kmeňa TR42.....	50
6.2.5.2	Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s UV detekciou diódového poľa a hmotnostnou detekciou doby letu (UHPLC-DAD-ToF-MS).....	53
6.2.5.3	Chromatografia na tenkej vrstve (TLC)	54
6.2.5.4	Biologický test prítomnosti antimikrobiálnych látok.....	55
6.2.6	Ostatné metódy	55
7	Vypracovanie a výsledky	60
7.1	Identifikácia kmeňa TR42 ako producenta filipínu.....	60
7.2	Dizrupcia filipínového klastru génov kmeňa TR42.....	62
7.2.1	Amplifikácia pravého a ľavého ramena a ich vloženie do plazmidu	64
7.2.2	Spojenie pravého a ľavého ramena.....	66
7.2.3	Vloženie inzerčnej kazety do pTR42LR-PR	68
7.2.4	Vytvorenie finálneho konštruktú	70
7.3	Transformácia buniek <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 s pTR42disFIL a konjugačný prenos konštruktú do kmeňa TR42.....	73
7.4	Integrácia inzerčnej kazety do chromozómu a dizrupcia filipínového klastru génov	74
7.4.1	Vplyv dizrupcie na produkciu antimikrobiálnych látok	78
7.5	Kokultivačné experimenty.....	81
7.6	Vplyv extraktov streptomycét kmeňa TR42 na prežívanie buniek z línie THP-1..	82
7.6.1	Stanovenie toxicity extraktov zo streptomycét pre bunky z línie THP-1.....	86
7.7	Vplyv extraktov nepolárnych látok z kmeňa TR42 na produkciu IL-1 β bunkami z línie THP-1	85
8	Diskusia	88
9	Súhrn	93
10	Zoznam použitej literatúry	94

Zoznam skratiek

A ₂₆₀	Absorbancia pri vlnovej dĺžke 260 nm
BOFES	Bovinné fetálne sérum
bp	Párov báz (angl. base pair)
DAD	Detektor diódového poľa (angl. Diode Array Detector)
DMSO	Dimetylsulfoxid
dNTP	Deoxynuklozid trifosfát
EDTA	Kyselina etyléndiaminotetraoctová
ELISA	Z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Ionizácia elektrosprejom (angl. ElectroSpray Ionization)
GR	Veľkostný štandard (angl. GeneRuler)
IL-1 β	Interleukín 1 beta
IPTG	Izopropyl- β -D-1-tiogalaktopyranozid
LPS	Lipopolysacharid
LR	Ľavé rameno
<i>mce</i>	Z angl. mammalian cell entry
MCS	Mnohopočetné klonovacie miesto (angl. multiple cloning site)
MOPS	3-(N-morfolino)-propánsulfónová kyselina
MS	Hmotnostná spektrometria (angl. Mass Spectrometry)
MT	Mutantný typ (angl. Mutant Type)
NK	Z angl. natural killers
OD ₆₀₀	Optická denzita pri vlnovej dĺžke 600 nm
OS	Ostrava
PBS	Fosfátom pufovaný fyziologický roztok

PCR	Polymerázová reťazová reakcia (angl. Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyetylénglykol
PKS	Polyketidsyntázy
PR	Pravé rameno
prokka	Program na rýchlu anotáciu prokaryotických genómov
RAST	Z angl. Rapid Annotation using Subsystem Technology
RE	Restrikčná endonukleáza
rpm	Počet otáčok za minútu (angl. revolutions per minute)
TE	Tioesteráza
TLC	Chromatografia na tenkej vrstve (Thin-Layer Chromatography)
ToF	Doba letu (angl. Time of Flight)
TR	Trutnov
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometán
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
ÚPB BC AV	Ústav pôdnej biológie, Biologické Centrum Akadémie Vied
WT	Divoký typ (angl. Wild Type)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozid

1 Úvod

Baktérie patria medzi najrozšírenejšie organizmy na tejto planéte. Vyskytujú sa prakticky v celej biosfére, vrátane rôznych typov extrémnych a záťažových prostredí. Prežitie baktérií vo variabilnom prostredí je determinované ich schopnosťou adaptovať sa na zmeny. Adaptačné mechanizmy baktérií úzko súvisia s ich sekundárnym metabolizmom. K jedným z najvýznamnejších producentov sekundárnych metabolitov patrí aj bakteriálny rod *Streptomyces*.

Streptomycéty sú primárne pôdne saprofytické mikroorganizmy, ktorých výskyt sa vzťahuje najmä na pedosféru. Pomerne hojne sa ale vyskytujú aj v akvatických ekosystémoch, vzduchu, a v menšej miere taktiež v telách rastlín a živočíchov, s ktorými vstupujú do priamych interakcií. Schopnosť streptomycét prežiť vo variabilnom prostredí vyplýva z ich veľkého a plastického genómu. Ten je z 2/3 tvorený adaptívnymi génmi (HASANI a kol., 2014), ktoré streptomycétam umožňujú prispôbiť sa rôznym typom prostredia a rôznym zdrojom živín. Spolu s ich rastovou nenáročnosťou je toto dôvodom ich hojného rozšírenia v rôznych typoch prostredia.

Výskum streptomycét sa zameriava najmä na ich bohatý sekundárny metabolizmus s cieľom izolácie nových biologicky aktívnych látok. Okrajovou a málo preskúmanou oblasťou sú ale interakcie, ktoré streptomycéty vytvárajú s človekom.

Na základe nedávnych metagenomických štúdií bolo potvrdené, že streptomycéty môžu kolonizovať určité časti ľudského tela. Jedná sa najmä o kožu, respiračný a pravdepodobne aj urogenitálny trakt ľudí (OSIPOV a VERKHOVTSEVA, 2011; COLLADO a kol., 2016). Okrem dobre známych patogénov akými sú druhy *S. somaliensis* a *S. sudanensis* je klinický impakt týchto streptomycét na ľudské zdravie neznámy. Aj z tohto dôvodu vznikla unikátna zbierka streptomycét izolovaných z ľudských klinických vzoriek. Zbierka v súčasnosti obsahuje približne 80 kmeňov streptomycét. Izoláty boli zhromaždené Národným referenčným laboratóriom pre patogénne aktinomycéty v Trutnove (kmene Trutnov) a Zdravotným ústavom so sídlom v Ostrave (kmene Ostrava). Vo väčšine prípadov sa jedná o izoláty získané z respiračného traktu (sputum a bronchoalveolárna laváž). Zbierka ale obsahuje aj ojedinelé izoláty získané z maternice po cisárskom reze a spojivkového vaku.

Baktérie rodu *Streptomyces* nie sú doposiaľ považované za typické patogény človeka. Výnimkou sú už spomínaní pôvodcovia mycetómu, *S. somaliensis* a *S. sudanensis*.

Za tento fakt môže byť zodpovedná ich obtiažna izolácia, nakoľko rastú pomalšie ako typické patogény človeka a doposiaľ neboli vyvinuté selektívne izolačné metódy. V prípade ich výskytu v klinickej vzorke sú často považované len za kontaminujúci mikroorganizmus. Z tohto pohľadu je možná kolonizácia určitých častí ľudského tela streptomycétami značne podceňovaná. Schopnosť streptomycét vyvolať ochorenie, alebo sa podieľať na jeho patogenéze bola demonštrovaná vo viacerých štúdiách. Na druhej strane existujú štúdie, kedy pri infekciách spôsobených inými patogénnymi mikroorganizmami dochádza k zmenám v mikrobióme pacienta, pričom niektoré predtým vyskytujúce sa baktérie z mikrobiómu vymiznú. Toto sa týka taktiež streptomycét. Vzhľadom na vyššie uvedené skutočnosti by mohli byť niektoré druhy streptomycét označené ako fakultatívne patogény. Toto tvrdenie je podporené aj výsledkami tejto práce.

Cieľom predloženej práce je identifikácia a charakterizácia špecifických adaptačných mechanizmov kmeňa s označením TR42 na prostredie ľudských pľúc. Kmeň bol izolovaný zo sputa od pacienta s neznámou respiračnou diagnózou a pri pilotných testoch vykazoval široké spektrum biologických aktivít. Pri štúdiu tohto kmeňa sme sa zamerali na jeho hemolytickú, antimikrobiálnu a imunomodulačnú aktivitu. Skúmaný je hlavne efekt na pľúcny mikrobióm (fyziologický aj patologický) a ľudské monocytické bunky z línie THP-1, nakoľko je predpokladané, že v prostredí ľudských pľúc dochádza k interakciám (priamym alebo nepriamym) medzi baktériami kmeňa TR42 a imunitnými bunkami. Získané poznatky slúžia k evaluácii klinického impaktu streptomycét kmeňa TR42 na ľudské zdravie.

Izoláty streptomycét z ľudských klinických vzoriek poskytujú pomerne novú a nepreskúmanú oblasť výskumu. Vzhľadom na to, že vykazujú široké spektrum biologických aktivít by mohli byť zdrojom nových antimikrobiálnych, imunomodulačných a iných biologicky aktívnych látok uplatniteľných v medicíne, biotechnológiách a v rôznych priemyselných odvetviach.

2 Ciele práce a hypotéza

2.1 Ciele práce

1. Charakterizácia adaptačných mechanizmov kmeňa TR42 na prostredie ľudských pľúc so zameraním na jeho hemolytickú, antimikrobiálnu a imunomodulačnú aktivitu.
2. Stanovenie klinického impaktu kmeňa TR42 na ľudské zdravie.

2.2 Hypotéza

Baktérie kmeňa TR42 produkujú sekundárne metabolity, ktoré im umožňujú adaptáciu na prostredie ľudských pľúc. Dané látky ovplyvňujú pľúcny mikrobióm (fyziologický aj patologický) a majú vplyv na imunitný systém človeka.

3 Všeobecná charakteristika streptomycét

Streptomycéty (rod *Streptomyces*) sú obligátne aeróbne, grampozitívne vláknité baktérie patriace do čeľade Streptomycetaceae, rad Actinomycetales (MADIGAN a kol., 2010). S počtom druhov 826 (platne uverejnené názvy) (LEE a WHANG, 2018) sa jedná o najobsiahlejší rod patriaci do radu Actinomycetales (GOODFELLOW, 2012).

3.1 Výskyt

Najväčším rezervoárom streptomycét je pôda. Až 40% všetkých pôdných baktérií patrí do rodu *Streptomyces* (BOONE a kol., 2001). Jedná sa tak o nesmierne významnú zložku pôdneho ekosystému. Vďaka svojej početnosti a filamentárnemu rastu, streptomycéty kolonizujú rôzne povrchy, spevňujú textúru pôdy a bránia jej eradikácii vetrom alebo dažďom (VETSIGIAN a kol., 2011). Svojou metabolickou činnosťou dávajú pôde typický „zemitý“ zápach. Vznik tohto zápalu je spojený s produkciou celej rady komplexných metabolitov, najmä s produkciou bicyklického alkoholu geosmínu (GERBER a LECHEVALIER, 1965). Význam geosmínu je doposiaľ neznámy, avšak gén pre jeho syntézu je vysoko konzervovaný takmer u všetkých druhov streptomycét (GUST a kol., 2003), čo môže indikovať jeho význam.

Hojné rozšírenie streptomycét v prostredí súvisí s ich rastovou nenáročnosťou. Pre svoj rast vyžadujú organický zdroj uhlíka, anorganický zdroj dusíka a minerálne soli. K rastu nepotrebujú vitamíny ani rastové faktory (LEE a DEMAIN, 1997). Práve toto môže byť dôvodom ich početného zastúpenia v pedosfére. Streptomycéty vytvárajú v pôde substrátové mycélium tvorené hýfami, ktoré sa rozširuje spôsobom „hrotu a vetvy“. Významným spôsobom sa podieľajú na rozklade a kolobehu organických látok v pôde. K degradácii nerozpustných organických polymérov (napr. celulóza, lignocelulóza, chitín) využívajú široké spektrum extracelulárne produkovaných enzýmov (BERTRAM a kol., 2004; CHATER a kol., 2010; THOMPSON a kol., 2010)

Aj keď sa výskyt streptomycét často vzťahuje najmä na terestrické ekosystémy, bolo dokázané, že sú pomerne rozšírené aj v akvatických ekosystémoch, morskej a sladkej vode (GOODFELLOW a WILLIAMS, 1983). Bohatým zdrojom nových kmeňov streptomycét sú hlavne morské sedimenty (ZHAO a kol., 2009) a morské hubky. Medzi morské druhy streptomycét patria napr. *S. tateyamensis*, *S. marinus*, a *S. haliclona* (KHAN a kol., 2010).

Streptomycéty môžu byť taktiež izolované z tel rastlín a živočíchov, s ktorými vstupujú do priamych interakcií (viď kap. 4). Väčšina týchto streptomycét je nepatogénnych, avšak bežne nie je súčasťou autochtónnej mikrobiológie daných organizmov (MADIGAN a kol., 2010).

3.2 Životný cyklus

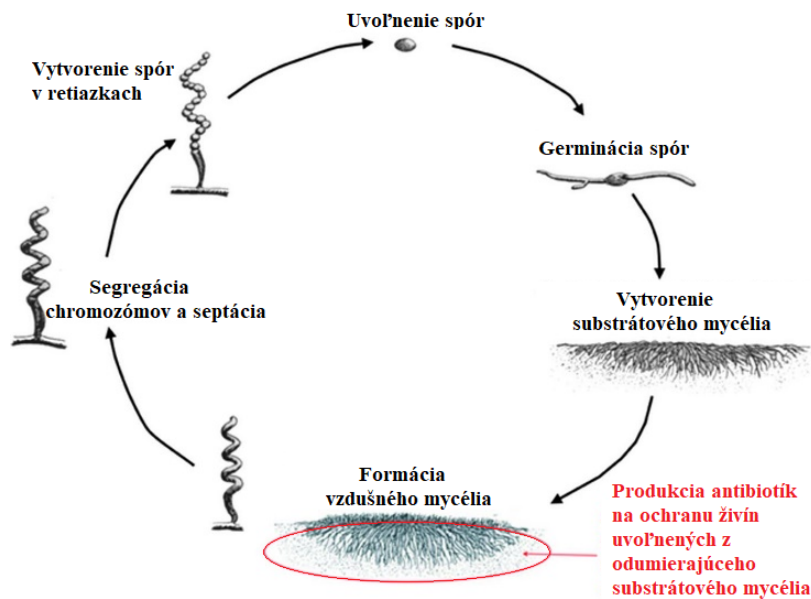
Životný cyklus streptomycét (Obr. 1) je veľmi špecifický proces pozostávajúci z viacerých fyziologicky a morfológicky odlišných fáz zahrňujúcich programovanú bunkovú smrť, diferenciáciu a sporuláciu (MANTECA a SANCHEZ, 2010). Jedná sa o zložitý komplexný proces, ktorý je regulovaný veľkým množstvom molekúl usporiadaných do signálnych dráh a kaskád (KELEMEN A BUTTNER, 1998).

Životný cyklus streptomycét začína klíčením (germináciou) spóry, ktorá za vhodných podmienok vytvára filamantárne vlákna označované ako hýfy. Rozširovanie hýf prebieha metódou elongácie hrotu (rastový vrchol hýfy – apikálny rast) a následným vetvením (angl. tip extension and branching). Za vhodných podmienok dochádza k vytvoreniu siete multinukleoidných hýf označovaných ako substrátové vegetatívne mycélium (FLÄRDH a BUTTNER, 2009; MANTECA a SANCHEZ, 2010). Hýfy substrátového mycélia sú septované, čím sa streptomycéty stávajú vzácnym príkladom mnohobunkovej prokaryoty (CLAESSEN a kol., 2014).

Streptomycéty majú vyvinuté veľké množstvo regulačných sietí, prostredníctvom ktorých vnímajú meniace sa podmienky prostredia, a ktoré im umožňujú adekvátne na tieto zmeny reagovať. Jedná sa najmä o dvojkomponentové systémy, ktoré spájajú environmentálny stimul (signál) senzorovej kinázy s adaptívnou odozvou prostredníctvom fosforylácie zodpovedajúceho regulátora odpovede, ktorý vykazuje regulačnú reakciu (zvyčajne prostredníctvom väzby na DNA) (UREM a kol., 2016). V prípade nepriaznivých podmienok, ako je napr. nedostatok živín, streptomycéty zachytávajú tento signál a iniciujú komplexný vývojový program sprevádzajúci morfológické zmeny. V tomto procese dochádza v bunkách substrátového mycélia k programovanej bunkovej smrti (MANTECA a SANCHEZ, 2010) pričom biomasa, ktorá týmto procesom vzniká slúži ako zdroj živín pre vytvorenie tzv. vzdušného mycélia (UREM a kol., 2016). Jedná sa o diferenciačný proces, v ktorom dochádza k vzniku nového typu buniek tvoriacich tzv. vzdušné hýfy, ktoré prerasteným vytvoria tzv. vzdušné mycélium (MANTECA a SANCHEZ, 2010). Fáza

formácie vzdušného mycélia je úzko spätá s produkciou sekundárnych metabolitov, najmä antibiotík. Predpokladá sa, že produkcia antibiotík a iných sekundárnych metabolitov počas formovania vzdušného mycélia poskytuje streptomycétam ochranu pred prerastením inými druhmi mikroorganizmov (MIGUÉLEZ a kol. 1999; CHATER a kol. 2010).

Po zastavení rastu dochádza vo vzdušných hýfach k synchronnému deleniu buniek, septácii a k následnému vytvoreniu monoploidných kompartmentov, z ktorých sa neskôr vyvinú rezistentné spóry usporiadané v retiazkach (CHATER, 1993; KIESER a kol., 2000). V tomto prípade predstavujú spóry dormantné rezistentné štádiá, ktoré sú schopné prečkať nepriaznivé podmienky prostredia ako je napr. anaerobióza (UREM a kol., 2016). Vo vhodných podmienkach, alebo po indukcii (napr. teplotným šokom) začína germinácia spór a celý cyklus sa opakuje (Obr. 1).



Obr. 1 Schematické znázornenie životného cyklu streptomycét (upravené podľa SEIPKE a kol., 2011).

3.3 Genóm

Genóm streptomycét je tvorený jedným lineárnym chromozómom, ktorého veľkosť sa najčastejšie pohybuje v rozmedzí 7 – 10 Mbp (STUDHOLME, 2016). Typickým znakom genómu streptomycét je aj vysoký podiel G-C párov báz (66-74%) (HOPWOOD, 2006, KÄMPFER, 2006). Na chromozóme sú gény usporiadané do tzv. centrálnej oblasti (angl. core) a dvoch nerovnako dlhých ramien (HOPWOOD, 2006). Esenciálne gény zodpovedné za DNA replikáciu, transkripciu, transláciu a primárny metabolizmus sú uložené vo vysokokonzervovanej centrálnej oblasti. Približne uprostred tejto oblasti sa nachádza *oriC*

miesto, z ktorého začína obojsmerná replikácia chromozómu. Ukončenie replikácie umožňujú kovalentne naviazané terminačné proteíny na 5' koncoch (HOPWOOD, 2006).

Na ramenách sú uložené gény, ktoré nie sú spravidla esenciálne a boli pravdepodobne získané horizontálnym prenosom génov (CHEN, 2002). Jedná sa najmä o adaptívne gény a gény sekundárneho metabolizmu (BENTLEY a kol., 2002; CHOULET a kol., 2006). Tieto gény kódujú široké spektrum komplexných metabolitov, ktoré svojim producentom pomáhajú lepšie prežívať v prostredí, prispôbovať sa meniacim podmienkam prostredia, prípadne poskytujú výhodu v konkurenčnom boji s inými mikroorganizmami vyskytujúcimi sa v prostredí (HOPWOOD, 2006).

Syntéza sekundárnych metabolitov je väčšinou riadená génmi, ktoré sú na chromozóme usporiadané do zhlukov, tzv. klastrov (angl. clusters). Vo väčšine klastrov sú zároveň prítomné aj gény rezistencie pre daný produkovaný metabolit, čím je zabezpečená ochrana vlastných buniek pred ich prípadným toxickým účinkom (BENTLEY a kol., 2002; HOPWOOD, 2007).

Ďalšími nositeľmi genetickej informácie u streptomycét môžu byť lineárne alebo kruhové plazmidy (BENTLEY a kol., 2002).

3.4 Sekundárne metabolity

Baktérie rodu *Streptomyces* sú bohatým zdrojom prírodných bioaktívnych látok, ktoré našli uplatnenie vo farmaceutickom a agrochemickom priemysle. Do roku 2016 bolo identifikovaných približne 23 000 rôznych sekundárnych metabolitov, pričom streptomycéty sú zodpovedné za produkciu 80% z nich (KHATTAB a kol., 2016). Genómy streptomycét patria v bakteriálnej ríši medzi najväčšie (WEBER a kol., 2003), pričom veľkosť genómu pozitívne koreluje s počtom génov. Vysoký počet génov umožnil streptomycétam rozvoj komplexného životného cyklu a možnosť adaptácie na variabilné pôdne prostredie. Táto adaptácia súvisí aj so schopnosťou produkovať široké spektrum sekundárnych metabolitov (KIRBY a CHEN, 2011).

Expresia génových zhlukov je v rámci sekundárneho metabolizmu viazaná na pôsobení stresových faktorov (BENTLEY a kol., 2002; TANAKA a kol., 2013). V genómoch jednotlivých streptomycét môžeme nájsť desiatky rôznych génových zhlukov zodpovedných za produkciu rôznych sekundárnych metabolitov. Je však nutné podotknúť, že streptomycéty takmer nikdy nevyužívajú celý svoj biosyntetický potenciál, nakoľko pri štandardných laboratórnych podmienkach je väčšina génových klastrov neaktívna.

Na základe celogenómovej analýzy vybraných streptomycét bolo zistené, že v ich genóme sa v priemere nachádza 20-40 génových klastrov s potenciálom biosyntézy sekundárnych metabolitov (CHALLIS, 2008; BROTZ-OESTERHELT a SASS, 2010; DUNCAN a kol., 2010; BACHMANN a kol., 2014). Za štandardných laboratórnych podmienok však dochádza k aktivácii len približne 10% z nich (ESNAULT a kol., 2017). To znamená, že väčšina génových zhlukov je za štandardných laboratórnych podmienkach neexprimovaná, alebo exprimovaná veľmi slabo. Takéto génové zhluky označujeme za kryptické (BENTLEY a kol., 2002; IKEDA a kol., 2003; OHNISHI a kol., 2008). Existuje teda značný záujem o skúmanie praktických nástrojov na indukciu týchto kryptických génových zhlukov, čo by mohlo viesť k izolácii nových bioaktívnych sekundárnych metabolitov (IMAI a kol., 2015). Medzi základné metódy aktivácie kryptických klastrov patrí: (i) zmena kultivačných podmienok, (ii) kokultivácia streptomycét s inými baktériami alebo hubami, (iii) použitie indukčných činidiel (siderofóry, γ -butyrolaktóny N-acetylglukozamín, vzácne prvky, atď.) Jedná sa o jednoduché a efektívne metódy indukcie kryptických génových zhlukov, prípadne vedú tieto metódy k zvýšeniu produkcie určitých sekundárnych metabolitov (BODE a kol., 2002; YAMANAKA a kol., 2005; SCHROECKH a kol., 2009; ONAKA a kol., 2011; ROMERO a kol., 2011; CRANEY a kol., 2012). Taktiež je možné použiť genetické manipulácie, cielenú mutagenézu, expresiu antibiotických aktivátorov a heterológnu produkciu daného metabolitu (SMANSKI a kol., 2009; GOMEZ-ESCRIBANO a BIBB, 2014).

Najdôležitejšou skupinou sekundárnych metabolitov produkovaných streptomycétami sú bezpochyby antibiotiká (WATVE a kol., 2001). Streptomycéty sú zdrojom takmer 60% antibiotík používaných v medicíne (ESNAULT a kol., 2017) a 75% komerčne používaných antibiotík (medicínske, poľnohospodárske a priemyselné aplikácie) (HARIR a kol., 2018). Medzi najznámejšie antibiotiká produkované streptomycétami patrí: streptomycín (*S. griseus*), chloramfenikol (*S. venezuleae*), kanamycín (*S. kanamyceticus*), daptomycín (*S. roseosporus*) (PROCÓPIO a kol., 2012) a mnohé ďalšie. Celkovo sú streptomycéty zdrojom viac ako 60 komerčne používaných látok s antibiotickou aktivitou (HARIR a kol., 2018).

Okrem antibiotík sú streptomycéty taktiež zdrojom antifugálnych látok (napr. amfotericín B – *S. nodosus*), kancerostatík (doxorubicín – *S. peucetius*) (MUKHTAR a kol., 2012), antihelmentických látok (avermektín – *S. avermitilis*) (OMURA a kol., 2001), atď. Vo všeobecnosti môžu byť sekundárne metabolity produkované streptomycétami rozdelené do 4 hlavných tried (rozdelenie podľa HARIR a kol., 2018):

1. Látky s regulačnou aktivitou - rastové faktory, morfogenetické činidlá, siderofóry
2. Látky antagonistické – antibakteriálne, antifugálne, antivirálne látky, antiprotozoiká antihelmentiká
3. Agrobiologické látky – insekticídy, pesticídy, herbicídy
4. Farmakologické látky – neurologické činidlá, imunomodulátory, kancerostatiká, inhibítory enzýmov, vazoaktívne látky

Streptomycéty skrývajú obrovský potenciál v produkcii rôznych sekundárnych metabolitov, vzhľadom na množstvo klastrov génov, vrátane kryptických, ktoré obsahujú. Práve aktivácia kryptických klastrov génov u vybraných druhov streptomycét by mohla prispieť k identifikácii nových biologicky aktívnych látok (OHNISHI a kol., 2008; TANAKA a kol., 2013). Okrem hľadania spôsobov aktivácie kryptických génových zhlukov sa výskum streptomycét v súčasnosti zameriava aj na neobvyklé, doposiaľ nepreskúmané habitáty (napr. arídne oblasti). Izoláty streptomycét z nových, nepreskúmaných oblastí predstavujú nový zdroj doposiaľ neznámych biologicky aktívnych látok. (MASAND a kol., 2018). WATVE a kol. vypracovali v roku 2001 model, ktorý odhaduje, že streptomycéty sú schopné produkcie viac ako 100 000 rôznych antimikrobiálnych látok. Aj z tohto dôvodu ostávajú streptomycéty v centre záujmu mnohých výskumných skupín.

4 Interakcie streptomycét

4.1 Interakcie s rastlinami a živočíchmi

Vytváranie interakcií medzi baktériami a eukaryotickými organizmami je pomerne bežné. Výnimkou nie sú ani streptomycéty, ktoré často vstupujú do interakcií, pozitívnych alebo negatívnych, s rastlinami, hubami a živočíchmi. Práve interakcie s inými organizmami často vedú u streptomycét k aktivácii určitých biosyntetických dráh a k produkcii širšieho spektra sekundárnych metabolitov, vrátane látok, ktoré nie je možné nájsť v čistej kultúre (SEIPKE a kol., 2011).

Nedávne štúdie dokazujú, že streptomycéty sú kvantitatívne a kvalitatívne dôležité v rizosfére rastlín, kde pozitívne vplývajú na rast rastlín a produkciou sekundárnych metabolitov ju chránia pred pôsobením patogénov (GOPALAKRISHNAN a kol., 2013; SALLA a kol., 2014). Na rozdiel od iných baktérií, filamentárny rast streptomycét im umožňuje kolonizovať korene rastlín a priamo prenikať cez rastlinné bunky do hostiteľa,

čím u nich dochádza k zmene fenotypu na endofytický, prípadne patogénny (COOMBS a FRANCO, 2003a, b; FRANCO a kol., 2007; JOSHI a kol., 2007).

Endofytické streptomycéty nie sú len rastlinné komenzály, ale svojou činnosťou pozitívne vplyvajú na rast rastliny (GOPALAKRISHNAN a kol., 2013), získavanie živín (JAISWAL a kol., 2017), syntézu fytohormónov (BERG, 2009; SADEGHI a kol., 2012) a v neposlednom rade produkciou antibiotík chránia rastlinu pred pôsobením fytopatogénov (JAISLAW a kol., 2017). Vzhľadom na tieto skutočnosti by niektoré endofytické druhy streptomycét mohli nájsť širšie uplatnenie v poľnohospodárstve, kde by pôsobili ako tzv. biokontrolné agens, ktoré chránia plodiny pred pôsobením patogénov (SCHIRAWSKI a PERLIN, 2018).

V rámci rodu *Streptomyces* sa nachádza niekoľko málo druhov, ktoré sú patogénmi viacerých druhov rastlín. Medzi tieto druhy patria napr. *Streptomyces turgidiscabies*, *Streptomyces acidiscabies* a *Streptomyces scabies* (SEIPKE a kol., 2011). Tieto fytopatogénne druhy produkujú fytotoxín thaxtomín čím spôsobujú vznik nekrotických lézií podobných chrasteniu na ekonomicky dôležitých koreňových a hl'uzových plodinách (LORIA a kol., 2003).

Okrem rastlín vytvárajú streptomycéty symbiotické interakcie aj s viacerými druhmi živočíchov, hlavne s bezstavovcami. Úloha streptomycét v týchto interakciách je predovšetkým ochranná, kedy produkciou antimikrobiálnych a antifugálnych látok chránia embryá hostiteľa. Ako príklad môžeme uviesť situáciu, kedy samice kutavky včelej (lat. *Philanthus triangulum* – druh samotárskych ôs) využívajú baktérie rodu *Streptomyces* aby ochránili svoje vajíčka a larvy. Streptomycéty sa nachádzajú v tykadlových žľazách a sú súčasťou sekrétu, ktorý samica vylučuje pri znáške vajec do tzv. materskej komôrky, aby zabezpečila výživu pre potomstvo. Streptomycéty majú v materskej komôrke ideálne podmienky pre rast a produkciu sekundárnych metabolitov, najmä antifugálnych látok, ochraňujú vajíčka a neskôr larvy svojho hostiteľa pred patogénnymi hubami (KALTENPOTH, 2005). Okrem hmyzu sú ďalšie stabilné interakcie vytvárané najmä s morskými bezstavovcami – morskými hubkami a morskými slimákmi z čeľade Conoidea (SEIPKE a kol., 2011).

Niektoré druhy hmyzu vytvárajú mutualistickú symbiózu so streptomycétmi aj vďaka ich schopnosti produkovať široké spektrum enzýmov. Z tohto dôvodu je možné izolovať niektoré druhy z tráviacej sústavy viacerých druhov článkonožcov, napr. termitov. Enzýmy produkované streptomycétami využívajú článkonožce pravdepodobne na

degradáciu polymérov, ako je celulóza a lignín (PASTI A BELLI, 1985; PASTI a kol., 1990; BIGNELL a ANDERSON, 1991; SCHÄFER a kol., 1996).

4.2 Interakcie s človekom

4.2.1 Izolácia patogénnych a nepatogénnych streptomycét z ľudských klinických vzoriek

V rámci rodu *Streptomyces* sa nachádza veľmi málo druhov, ktoré sú považované za kauzálnych pôvodcov symptomatických infekcií u človeka. Okrem zjavných patogénov akými sú druhy *S. somaliensis* a *S. sudanensis* obsahuje rod *Streptomyces* aj druhy, ktoré síce kolonizujú určité časti ľudského tela, avšak nie sú považované za patogénne.

Najčastejšou prezentáciou infekcie spôsobenej baktériami rodu *Streptomyces* je mycetóm, čo je chronická, deštruktívna a progresívna infekcia kože, podkožného tkaniva, prípadne táto infekcia preniká až do kostí. (MCNEIL a BROWN 1994; DEVELOUX a kol., 1999). Toto ochorenie sa vyskytuje najmä v tropických a subtropických oblastiach, kde predstavuje vážny zdravotný problém. Za kauzálnych pôvodcov tohto ochorenia sú okrem iných aktinomycét považované aj dva druhy patriace do rodu *Streptomyces*, a to *S. somaliensis* a *S. sudanensis* (QUINTANA a kol., 2008).

Okrem spomínaného mycetómu sú iné symptomatické infekcie, ktorých pôvodcom sú streptomycéty veľmi vzácne a vyskytujú sa takmer výhradne u imunokompromitovaných pacientov. Ohrození sú pacienti s rakovinou, syndrómom získanej imunitnej nedostatočnosti (prípadne pacienti nakazení vírusom HIV), pacienti s centrálnym venóznym katétrom a s proteticou srdcovou chlopňou. Od roku 1953 do roku 2007 bolo hlásených len 18 nemycetomických invazívnych infekcií spôsobených streptomycétami (KAPADIA a kol., 2007). Jedná sa najmä o infekcie respiračného traktu a o infekcie krvného obehu. Z tohto pohľadu je možné určité druhy streptomycét označiť za oportunistické, resp. fakultatívne patogény (ATAIEKHORASGANI a kol., 2014).

V roku 1998 DUNNE a kol. vyslovili hypotézu, že invazívne infekcie spôsobené streptomycétami by mohli byť oveľa bežnejšie ako sa predpokladá. Táto skutočnosť vyplýva z faktu, že je pomerne náročné určiť, či sa jedná o infekciu spôsobenú streptomycétami alebo nie (KAPADIA a kol., 2007). V klinickej praxi sú niektoré druhy streptomycét bežne prítomné v klinických izolátoch. Zástupcovia *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces albus* a *Streptomyces violaceoruber* boli izolovaní z krvi, krčných mandlí, zubného kazu, pokožky

a zo sputa. Z hnisavého exudátu po zlomenine jablčka (lat. patella) bol získaný izolát *Streptomyces candidus*. Ďalej boli z ľudských klinických vzoriek izolovaní zástupcovia *S. horton* (hnisavý výtok), *S. willmorei* (pečeňový absces), *S. gedaensis* (sputum) (KUTZNER, 1981). Vo všetkých vyššie uvedených prípadoch nepredstavovali uvedené baktérie primárne patogény, pričom ich úloha v priebehu infekcie ostáva nejasná (DUNNE a kol., 1998).

Invazívne infekcie spôsobené streptomycétami sa taktiež vyskytujú u iných cicavcov, najmä u psov a mačiek. Jedná sa najmä o dermatitídy spôsobené druhom *Streptomyces cyaneus* (NICHOLLS a kol., 2014) a o očné infekcie, kde bol ako primárny patogén označený druh *Streptomyces cinnamoneus* (WALTON a kol., 2015).

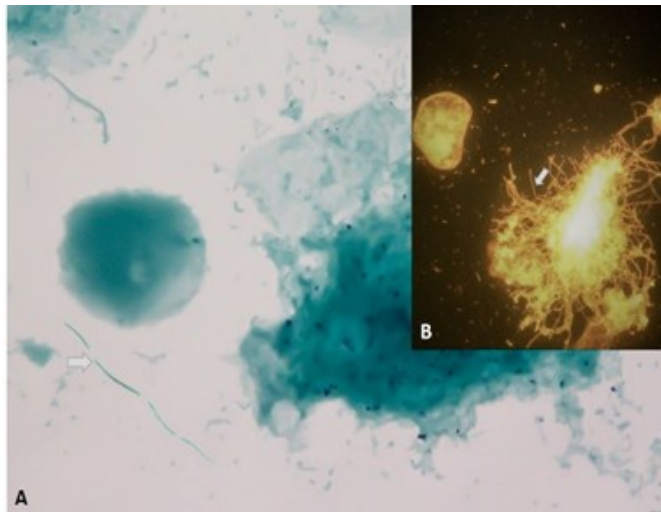
Streptomycéty prítomné v klinických izolátoch sú bežne považované len za kontaminujúce mikroorganizmy. Z tohto dôvodu je potrebné zohľadňovať mikrobiologickú a patologickú koreláciu na odlíšenie toho, či sa jedná o kontaminujúce baktérie alebo nie. Na určenie či sa jedná o infekciu spôsobenú streptomycétami je potrebné: sledovanie klinických prejavov, izolácia mikroorganizmov zo sterilných zdrojov (najlepšie vo veľkých množstvách), priama mikroskopická identifikácia v infikovanom tkanive a vylúčenie iných možných príčin spôsobujúcich daný klinický stav. Kombinácia aspoň dvoch vyššie uvedených kritérií by mala byť postačujúca na definitívne určenie pôvodcu infekcie (KAPADIA a kol., 2007).

4.2.2 Kmene Trutnov a Ostrava

Streptomycéty sú najmä pôdne baktérie, ktoré produkujú veľké množstvo spór. Z tohto pohľadu sa zdá logické, že tieto spóry sa môžu nachádzať v ovzduší a môžu s človekom priamo interagovať. Na základe metagenomyckých štúdií a prostredníctvom metódy MALDI-TOFF bolo potvrdené, že streptomycéty môžu kolonizovať kožu, respiračný a urogenitálny trakt ľudí (OSIPOV a VERKHOVTSEVA, 2011; COLLADO a kol., 2016). Avšak, okrem zjavných patogénov (*S. somaliensis* a *S. sudanensis*) je klinický impakt týchto streptomycét na ľudské zdravie neznámy. Aj z tohto dôvodu vznikla v roku 2014 unikátna zbierka streptomycét, ktoré boli izolované z ľudských klinických vzoriek. Zbierka obsahuje približne 30 izolátov, ktoré boli zhromaždené Národným referenčným laboratóriom pre patogénne aktinomycéty v Trutnove (Česká republika) a ďalších 50 izolovaných Zdravotným ústavom so sídlom v Ostrave. Izoláty dostali laboratórne označenie ako kmene „Trutnov“ (ďalej len TR) a „Ostrava“ (OS) pričom sú všetky považované za nepatogénne. Streptomycéty z tejto zbierky boli izolované najmä

z dekontaminovaného sputa (sputum zbavené rýchlorastúcich baktérií pre cieleňú kultiváciu mykobaktérií) a z bronchoalveolárnej lávaže od pacientov trpiacich akútnymi i chronickými respiračnými ochoreniami. Spoločnou charakteristikou všetkých pacientov bol pobyt alebo práca v prašnom prostredí. Izoláty kmeňov TR pochádzajú z oblastnej nemocnice v Příbrami, čo je oblasť, kde ešte donedávna prebiehala banská činnosť. Kmene OS pochádzajú z ostravského regiónu, ktorý je aj v súčasnosti významnou banskou oblasťou. Okrem streptomycét izolovaných z respiračného traktu tieto zbierky obsahujú aj ojedinelé izoláty z maternice po cisárskom reze a zo spojivkového vaku.

Vo všetkých prípadoch izolácie sa jednalo o masívnu kolonizáciu klinickej vzorky streptomycétou. Na základe tejto skutočnosti je teda možné tvrdiť, že sa nejedná len o kontamináciu spórami streptomycét, ktorá môže vzniknúť pri spracovaní vzorky. Zhluky vlákien, ktoré sú typické pre streptomycéty, bolo možné pozorovať prostredníctvom mikroskopu priamo v spute (Obr. 2, DOBIÁŠ, R., Zdravotný ústav so sídlom v Ostrave, osobné zdelenie).



Obr. 2 Kolonizácia ľudských pľúc streptomycétami u pacienta s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc. A: *Streptomyces* spp. zafarbený malachitovou zelenou, zväčšené 1000x, B: *Streptomyces* spp. pozorovaný fluorescenčnou mikroskopiou, zväčšené 1000x. (DOBIÁŠ, R., Zdravotný ústav so sídlom v Ostrave, osobné zdelenie).

V predloženej práci sa zameriavame na charakterizáciu kmeňa s označením TR42, ktorý bol izolovaný z dekontaminovaného sputa od pacienta s neznámou respiračnou diagnózou. Na základe analýzy 16S rRNA a použitia databázy EzTaxon (YOON, 2017) bol tento kmeň taxonomicky zaradený k skupine *S. costaricanus* - *graminearus* - *griseofuscus* - *murinus* (A. CHROŇÁKOVÁ, osobné zdelenie). Základné informácie o genóme kmeňa TR42 sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1 Analýza genómu kmeňa TR42 (RAST a prokka – programy na rýchlu anotáciu genómov, E. CORRETO, osobné zdelenie)

Analýza genómu kmeňa TR42	
Celková dĺžka (bp)	8507620
Obsah GC párov (%)	71,82
Počet kontigov (>500)	171
rRNA (RAST)	18 (8 16S; 3 23S; 7 5S)
tRNA (prokka)	93

4.3 Hemolýza

Produkcia hemolytických látok (hemolyzínov) spôsobujúcich hemolýzu patrí medzi základné virulénne faktory celého radu patogénnych baktérií. Pri hemolýze dochádza k narušeniu cytoplazmatickej membrány červených krviniek, čím dochádza k uvoľneniu ich obsahu do okolitého prostredia. Uvoľnený obsah červených krviniek obsahuje viacero dôležitých rastových faktorov (napr. ióny železa), ktoré využívajú pre svoj rast invazívne mikroorganizmy (FALKOW, 2004). Schopnosť produkovať hemolytické látky a indukovať tak hemolýzu na štandardnom krvnom agare sa využíva v klasifikácii a identifikácii viacerých druhov mikroorganizmov.

Celkovo rozoznávame 4 typy hemolýzy (Obr. 3): α -hemolýza, β -hemolýza, γ -hemolýza

- α -hemolýza – označovaná aj ako neúplná, čiastočná alebo zelená hemolýza. Pri tomto type sa v hemolytickej zóne nachádzajú neporušené červené krvinky. Hemolytická zóna je zakalená a má zelené zafarbenie v dôsledku bakteriálnej produkcie peroxidu vodíka a následnej oxidácie hemoglobínu na verdoglobín. Táto zóna zasahuje 1 až 2 mm od bakteriálnej kolónie.
- β -hemolýza – označovaná aj ako úplná hemolýza. V hemolytickej zóne obklopujúcej kolónie baktérií sa nenachádzajú žiadne červené krvinky. Hemolytická zóna je svetlá (žltá) a transparentná. Za β -hemolýzu sú okrem iných hemolyzínov zodpovedné najmä exotoxíny streptolysin O a S. (RYAN a RAY, 2004).
- γ -hemolýza- alebo negatívna hemolýza. Ako γ -hemolytické kmene sú označované baktérie, ktoré na štandardnom krvnom agare nevykazujú žiadnu hemolytickú aktivitu (BARBOSA a kol., 2010).



Obr. 3 Porovnanie jednotlivých typov hemolýzy (prebrané a upravené z: <https://orbitbiotech.com/blood-agar-%CE%B1-hemolysis-%CE%B2-hemolysis-%CE%B3-hemolysis-alpha-prime-wide-zone-alpha-hemolysis-composition-procedure-usus/>).

4.3.1 Streptomycéty a hemolýza

Produkcia hemolytických látok nie je u streptomycét bežná, nakoľko sa jedná o primárne pôdne saprofytické mikroorganizmy. Genóm streptomycét je z 2/3 tvorený adaptívnymi génmi (HASANI a kol., 2014), ktoré im umožňujú prispôsobiť sa rôznym typom prostredia a rôznym zdrojom živín. Ako príklad môžeme uviesť typického zástupcu pôdných nepatogénnych streptomycét *S. coelicolor* M145. Táto streptomycéta produkuje tzv. S-hemolyzín, ktorý jej umožňuje rásť na štandardnom krvnom agare. S-hemolyzín je produktom génu *SCO1782* a je zodpovedný za α -hemolytickú aktivitu *S. coelicolor* M145. Tento hemolyzín vykazuje sekvenčnú podobnosť s hemolyzínmi dvoch patogénnych baktérií: *Brachyspira hyodysenteriae* (35%) a *Mycobacterium tuberculosis* (62%), čo môže indikovať ich príbuznosť. U *S. coelicolor* je produkcia hemolyzínu prekvapujúca, vzhľadom na relatívnu nedostupnosť jeho substrátu v pôdnom prostredí (RAJESH a kol., 2013). Na základe predošlých molekulárno-biologických analýz (DNA microarrays) možno vyvodiť, že v komplexnom médiu k expresii génu *SCO1782* nedochádza. Tento gén je teda za bežných podmienok latentný, prípadne je produkt tohto génu u *S. coelicolor* za bežných podmienok degradovaný (HUANG a kol., 2001).

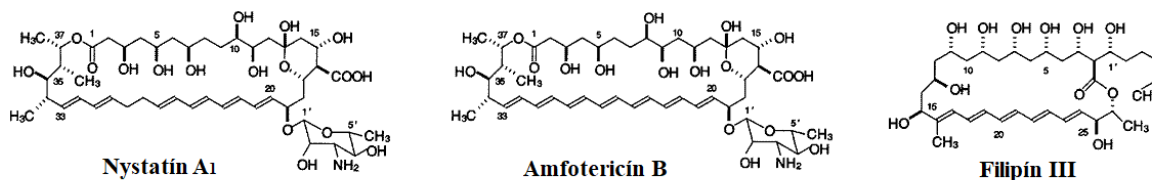
Medzi ďalšie streptomycéty s hemolytickou aktivitou patrí napr. *Streptomyces luridus* So3.2 a *Streptomyces* VITSDK1. *Streptomyces* VITSDK1 bol izolovaný morských sedimentov v južnej Indii. Tento kmeň vykazuje silnú hemolytickú aktivitu voči myším a ľudským erytrocytom, čo môže indikovať jeho klinický význam (SUTHINDHIRAN a KANNABIRAN, 2009). *Streptomyces luridus* So3.2 bol izolovaný v roku 2018 z antarktckej pôdy. Jedná sa o nový kmeň streptomycét s potenciálom produkcie nových

bioemulzifikačných látok. Na štandardnom krvnom agare vykazuje silnú β -hemolytickú aktivitu (LAMILLA a kol., 2018).

V roku 2018 bolo na hemolytickú aktivitu testovaných 10 rôznych kmeňov Trutnov z unikátnej zbierky streptomycét izolovaných z ľudských klinických vzoriek. Všetky testované izoláty vykazovali na štandardnom krvnom agare silnú β -hemolytickú aktivitu (ŽLÁBKOVÁ, 2018). Predpokladá sa, že práve produkcia hemolytických látok by mohla predstavovať jeden z adaptačných mechanizmov, ktorými sa streptomycéty z uvedenej zbierky prispôbili na prostredie ľudského tela.

4.3.1.1 Hemolytická aktivita sekundárnych metabolitov streptomycét

Streptomycéty sú zdrojom veľkého množstva sekundárnych metabolitov, vrátane polyénových antibiotík. Medzi významných zástupcov skupiny polyénových antibiotík produkovaných streptomycétami, ktoré vykazujú hemolytickú aktivitu patrí amfotericín B, nystatín a filipín (Obr. 4).



Obr. 4 Chemická štruktúra vybraných polyénových antibiotík (prebrané a upravené od LOPES a CASTANHO, 2002).

Vzhľadom na chemickú štruktúru a rozdiely v mechanizme interakcie s membránami sa polyénové antibiotiká rozdeľujú do dvoch skupín (KOTLER-BRAJTBURG a kol., 1979, BRAJTBURG a kol., 1980). Prvú skupinu tvoria polyény, ktoré majú vo svojej štruktúre menší laktónový kruh. Do tejto skupiny patrí napríklad filipín obsahujúci pentaén. Polyény s väčším laktónovým kruhom patria do druhej skupiny. Významní zástupcovia tejto skupiny sú amfotericín B a nystatín. (KNOPIK-SKROCKA a BIELAWSKI, 2002).

Filipín je vo svojej podstate zmes 4 zložiek (filipíny I-IV), ktoré spolu vytvárajú filipínový komplex. Najvýznamnejšou zložkou tohto komplexu je filipín III, ktorý je v ňom zastúpený 53 % (CEDER a RYHAGE, 1968; BERGY a EBLE 1968). Mechanizmus účinku filipínu spočíva vo vytváraní veľkých, neselektívnych perforácií v membráne červených krviniek. V dôsledku týchto perforácií sa membrána erytrocytov stáva permeabilná, ako pre

nízkomolekulové látky, tak aj pre makromolekuly vrátane hemoglobínu, čím dochádza k tzv. poškodzujúcej hemolýze (KNOPIK-SKROCKA a BIELAWSKI, 2002).

Amfotericín B a nystatín tvoria v membráne erytrocytov menšie komplexy, organizované v selektívnych kanáloch zodpovedných za permeáciu monovalentných iónov a neelektrolytov s malou molekulovou hmotnosťou (HOLZ a FINKELSTEIN, 1970; DEUTICKE a kol., 1973; DE KRUIJFF a kol., 1984). Táto skutočnosť vedie k tzv. koloidnej osmotickej hemolýze. Predpokladá sa, že každé z týchto dvoch antibiotík tvorí viac transportných systémov v membráne erytrocytov, ktoré sa líšia v molekulárnej organizácii a permeabilite (KNOPIK-SKROCKA a BIELAWSKI, 2002).

Polyénové antibiotiká vykazujú silnú antifugálnu aktivitu, avšak väčšina z nich je príliš toxická na aplikácie v humánnej medicíne. Selektívna toxicita rôznych polyénových antibiotík je daná ich afinitou k rôznym druhom sterolov. Amfotericín B a nystatín vykazujú výrazne vyššiu afinitu k ergosterolu (hlavný sterol v membráne húb) ako k cholesterolu (sterol v bunkách cicavcov) (PAYERO a kol., 2015). Z tohto dôvodu je možné ich použitie na liečbu systémových mykotických infekcií (BOSSCHE, 1995; ABLORDEPPEY a kol., 1999). Na druhej strane je filipín, ktorý vyказuje rovnakú afinitu k obojm typom sterolov, v dôsledku čoho je príliš toxický na použitie v liečbe mykotických infekcií. Filipín ale našiel uplatnenie v diagnostike Niemann-Pickovej choroby typu C, ktorá sa prejavuje v poruche ukladania cholesterolu v bunkách (PAYERO a kol., 2015). Rovnako sa filipín používa aj na detekciu a kvantifikáciu cholesterolu v biologických membránach (GIMPL a GEHRIG-BURGER, 2011).

5 Imunitný systém človeka

Imunitný systém je komplexný dozorný systém zabezpečujúci udržanie homeostázy a integrity organizmu. Jedná sa o fylogeneticky najmladší informačný systém. Jeho základnou funkciou je schopnosť rozpoznať vlastné štruktúry (bunky a molekuly) od cudzích, alebo od vlastných pozmenených buniek (CHAPLIN, 2010). V prípade rozpoznania cudzích látok alebo buniek, navodzuje organizmus tzv. imunitnú odpoveď. Jedná sa o komplex reakcií, ktorými organizmus odpovedá na prítomnosť cudzorodého antigénu. Ako antigén teda označujeme všetky látky alebo bunky, ktoré sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď.

Poznáme dva typy imunitnej odpovede: nešpecifickú, vrodenu (prirodzenú) a špecifickú, získanu (adaptívnu) imunitnú odpoveď. Oba uvedené typy imunitnej odpovede sú vzájomne úzko prepojené, a teda nepôsobia izolovane. Porovnanie a základná charakteristika dvoch typov imunitných odpovedí je uvedená v Tab. 2.

Tab. 2 Porovnanie a základná charakteristika dvoch typov imunitných odpovedí (tabuľka vytvorená na základe článku od CHAPLIN, 2010).

	Nešpecifická, vrodená	Špecifická, získaná
Zložky	Koža, mukózne sekréty epitelu, pH, teplota	Lymfocyty v krvi, v lymfatických uzlinách a epitelochoch
	Proteíny komplementu, cytokíny	Protilátky, cytokíny
	Fagocyty (makrofágy neutrofilny), NK bunky, dendritické bunky, monocyty, eozinofily, bazofily, mastocyty (žírne bunky)	Lymfocyty T a B
Charakteristika	Rozpoznáva štruktúry spoločné pre množstvo rôznych patogénov	Rozpoznáva špecifické cudzorodé molekuly, autoantigény, vlastné pozmenené bunky (nádorové bunky)
	Receptory sú kódované už v zárodočnom vývoji	Receptory vznikajú náhodnou kombináciou počas života
	Nemá imunologickú pamäť	Má imunologickú pamäť (rýchlejšia a silnejšia reakcia pri opakovanej infekcii)
	Reáguje okamžite	Aktivácia trvá niekoľko dní (klonálna expanzia lymfocytov)

Z hľadiska obsahu práce sa ďalej podrobnejšie venujeme nešpecifickej, vrodenej imunitnej odpovedi. Konkrétne sa zameriavame na zápal, makrofágy a na produkciu interleukínu 1 β (ďalej len IL-1 β).

5.1 Nešpecifická, vrodená imunitná odpoveď

5.1.1 Zápal

Dôležitou súčasťou vrodenej imunitnej odpovede je zápal. Jedná sa o imunitnú reakciu na škodlivé stimuly, akou je napríklad prítomnosť patogénnych mikroorganizmov v tele hostiteľa, poškodenie vlastných buniek, prítomnosť toxických zlúčenín alebo

rádioaktívne žiarenie (MEDZHITOV, 2010). Hlavnou úlohou zápalu je odstránenie, alebo ohraničenie škodlivých stimulov a iniciácia procesu hojenia (FERRERO-MILIANI a kol., 2007).

Na tkanivovej úrovni je zápal charakterizovaný začervenaním, opuchom, horúčkou, bolesťou a pri chronickom zápale až stratou funkcie daného tkaniva. Všetky tieto javy sú výsledkom lokálnych imunitných, vaskulárnych a zápalových reakcií buniek na infekciu alebo poranenie (TAKEUCHI a AKIRA, 2007). Medzi dôležité reakcie zápalového procesu patria zmeny vaskulárnej permeability, akumulácia leukocytov, vrátane neutrofilov, lymfocytov a monocytov (prekursorov makrofágov) v poškodenom tkanive a uvoľňovanie zápalových mediátorov – chemokínov a cytokínov (CHERTOV a kol., 2000, FERRERO-MILIANI a kol., 2007).

Zápalová odpoveď spúšťajú faktory, ktoré sú uvoľňované epiteliálnymi a endotelovými bunkami v poškodenom tkanive. Okrem toho, tieto bunky produkujú chemokíny a rastové faktory, ktoré priťahujú neutrofilov a monocytov. Ako prvé sa v mieste zápalu nachádzajú neutrofilov, po ktorých nasledujú monocytov, lymfocytov (NK bunky – natural killers, T a B bunky) a mastocyty (STRAMER a kol., 2007, VAN LINTHOUT a kol., 2014, ROBB a kol., 2016). Monocyty sa môžu diferencovať na makrofágov, ktoré produkujú rôzne prozápalové cytokíny, medzi ktoré patrí aj IL-1 β .

5.1.2 Makrofágov

Makrofágov sú dôležitými zložkami mononukleárneho fagocytového systému a sú nesmierne dôležité pri iniciácii, udržiavaní a rozlišovaní zápalu (FUJIWARA a KOBAYASHI, 2005). Vyvíjajú sa zo spoločnej myeloidnej progenitorovej bunky v kostnej dreni, ktorá je prekursorom mnohých rôznych typov buniek, vrátane neutrofilov, eozinofilov, bazofilov, makrofágov, dendritických buniek a mastocytov. Počas vývoja monocytov myeloidné progenitorové bunky postupne vytvárajú monoblasty, pro-monocyty a nakoniec monocytov, ktoré sa uvoľňujú z kostnej drene do krvného obehu. Monocyty adherujú na cievný endotel a opúšťajú krvné riečište diapedézou, aby doplnili tkanivo špecifické makrofágov v kostiach (osteoklasty), pľúcnych alveolách, centrálnom nervovom systéme (mikrogliaálne bunky), spojivovom tkanive (histiocyty), gastrointestinálnom trakte, pečeni (Kupfferove bunky), slezine a pobrušnici (GORDON a TAYLOR, 2005). Makrofágov sú teda na rozdiel od neutrofilov integrálnymi zložkami rôznych typov tkanív, prispievajú k rozvoju orgánov a udržiavaniu homeostázy (GORDON a MARTINEZ-POMARES, 2017)

Pri vzniku bakteriálnej infekcie, alebo pri poškodení tkaniva sú rezidentné vrodené imunitné bunky (makrofágy a dendritické bunky) aktivované a uvoľňujú prozápalové cytokíny (napr. IL-1 β), čo vedie k vazodilatácii a zvyšovaniu počtu leukocytov (najmä monocytov a neutrofilov) v mieste poškodenia. (RAO a kol., 2014). Táto skutočnosť vedie k vzniku zápalovej reakcie, úlohou ktorej úlohou je odstránenie stimulu, ktorý daný stav vyvolal. (FERRERO-MILIANI a kol., 2007).

Okrem produkcie rôznych chemokínov a cytokínov pri zápalovom procese plnia makrofágy aj úlohu fagocytujúcich a antigén prezentujúcich buniek (FUJIWARA a KOBAJASHI, 2005) čím dochádza k prepojeniu nešpecifickej a špecifickej imunitnej odpovede.

5.1.3 Interleukín 1 β (IL-1 β)

Interleukín 1 β je prozápalový cytokín, ktorý má pleiotropný účinok na rôzne bunky a hrá kľúčovú úlohu pri akútnych, chronických zápalových reakciách a autoimunitných poruchách (REN a TORRES, 2009). Patrí do rodiny interleukín-1, ktorá obsahuje 11 rôznych cytokínov a 10 receptorov, ktoré dané cytokíny rozoznávajú. Členovia rodiny interleukínu-1 sú viac ako ktorákoľvek iná rodina cytokínov úzko spätí so zápalovou odpoveďou (DINARELLO, 2018). Za produkciu IL-1 β sú zodpovedné makrofágy, endotelové a epitelové bunky a fibroblasty. Hlavnou úlohou IL-1 β je: (i) aktivácia endotelových buniek, (ii) indukcia diapedézy neutrofilov, (iii) zvýšenie syntézy cytokínov lymfocytmi (T a B) (DINARELLO, 1991).

IL-1 β sa syntetizuje ako biologicky inaktívny pro-IL-1 β . Za určitých podmienok dochádza k jeho premene na biologicky aktívny IL-1 β prostredníctvom proteolýzy závislej od kaspázy-1 (SUTTERWALA a kol., 2006, EDER, 2009). Nakoľko je kaspáza-1 za fyziologických podmienok väčšinou neaktívna, účinná sekrecia IL-1 β závisí od inflamazómu (MARTINON a kol., 2002). Inflamazóm je intracelulárny multi-proteínový komplex, ktorý plní funkciu dôležitého regulátora zápalu (REN a TORRES, 2009). V inflamazóme sú prítomné receptory, ktoré sú aktivované patogénmi alebo produktmi poškodených buniek (PICCIOLI a RUBARTELLI, 2013) ako reakcia na vznik bakteriálnej infekcie alebo poškodenia tkaniva.

6 Materiál a metódy

6.1 Materiál

6.1.1 Bakteriálne kmene

Trutnov 42 (TR42)

- Kmeň streptomycét izolovaný z dekontaminovaného sputa a z bronchoalveolárnej laváže od pacienta s neznámou respiračnou diagnózou.
- Taxonomický zaradený do skupiny: *Streptomyces costaricanus* - *graminearus* - *griseofuscus* – *murinus* (CHROŇÁKOVÁ, A., ÚPB BC AV ČR, České Budejovice – osobné zdelenie).
- Kmeň izolovaný v oblastnej nemocnici v Příbrami.
- Kmeň poskytl: Národné referenčné laboratórium pre patogénne aktinomycéty v Trutnove, Česká republika.

Escherichia coli SURE

- Kmeň používaný na klonovanie DNA, nakoľko nemá komponenty katalyzujúce prestavby DNA (Stop Unwanted Rearrangement Events). Vďaka funkčnému génu pre β -galaktozidázu umožňuje tzv. modro/bielu selekciu. Je rezistentný ku kanamycínu a tetracyklínu.
- Genotyp: *endA1, glnV44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5 uvrC, e14-, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$ F' [proAB+ lacIq lacZ Δ M15 Tn10]*.
- Kmeň poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Bakteriologické laboratórium, Ústav imunológie a mikrobiológie 1. LF UK).

Escherichia coli ET12567/pUZ8002

- Kmeň používaný pri medzidruhovej konjugácii. Je deficientný v metylácii DNA, preto sa používa na prenos plazmidu do streptomycét, ktoré majú restričný systém pre metylovanú DNA. Obsahuje plazmid pUZ8002, ktorý nesie rezistenciu ku kanamycínu a kóduje „helper“ funkcie potrebné pre konjugáciu (*tra* gén). Kmeň je taktiež rezistentný k tetracyklínu a chloramfenikolu.
- Genotyp: *dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, zjj-202::Tn10, recF143, galK2, galT22, ara-14, lacY1, xyl-5, leuB6, thi-1, tonA31, rpsL136, hisG4, tsx-78, mtl-1, glnV44*.

- Kmeň poskytol: Dr. Bertolt Gust (Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Veľká Británia)

Patogénne a nepatogénne mikroorganizmy

- Vybrané patogénne a nepatogénne mikroorganizmy používané na biologické testy a kokultivačné experimenty sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 Mikroorganizmy používané na biologické testy a kokultivačné experimenty a ich zaradenie do príslušnej skupiny. G⁺ - grampozitívne baktérie, G⁻ - gramnegatívne baktérie.

Mikroorganizmus	Zaradenie
<i>Candida albicans</i>	kvasinka
<i>Bacillus subtilis</i>	G ⁺
<i>Staphylococcus aureus</i>	G ⁺
<i>Neisseria lactamica</i>	G ⁻
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	G ⁺
<i>Citrobacter freundii</i>	G ⁻
<i>Moraxella catarrhalis</i>	G ⁻
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G ⁻

- Kmene poskytol: MUDr. Jan Závora (Oddelenie klinickej mikrobiológie a ATB centra Ústavu lekárskej biochémie a laboratórnej diagnostiky Všeobecnej fakultnej nemocnice v Prahe).

Bunky z línie THP-1

- Monocytová línia THP-1 bola získaná z peritoneálnej krvi ročného chlapca trpiaceho akútnou monocytárnou leukémiou (TSUCHIYA a kol., 1980).
- Kultivácia prebiehala v kompletnom RPMI médiu s antibiotikami.
- Bunkovú líniu poskytol: prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc. (Ústav imunológie a mikrobiológie 1. LF UK a Všeobecná fakultná nemocnica v Prahe).

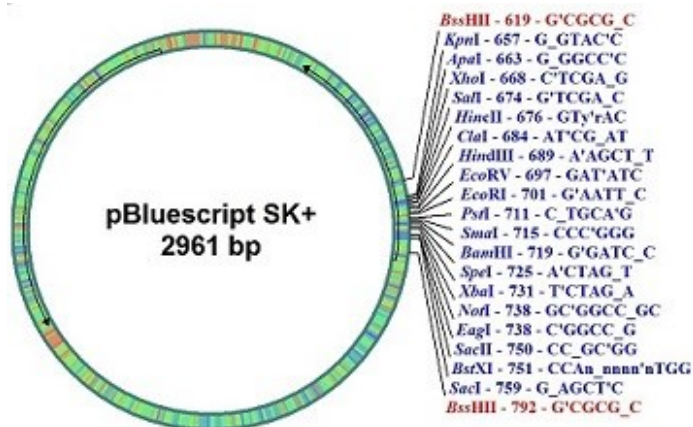
6.1.2 Vektory

pBluescript SK+

- Klonovací vektor obsahujúci gén rezistencie na ampicilín a klonovacie miesto (MCS–MultiCloning Site). Vektor umožňuje v prítomnosti IPTG a X-gal modro/bielu selekciu v prípade neprítomnosti/prítomnosti vloženého fragmentu

(MCS je súčasťou *lacZ* génu, ktorý je zodpovedný za modré sfarbenie kolónií v prípade nevloženia fragmentu).

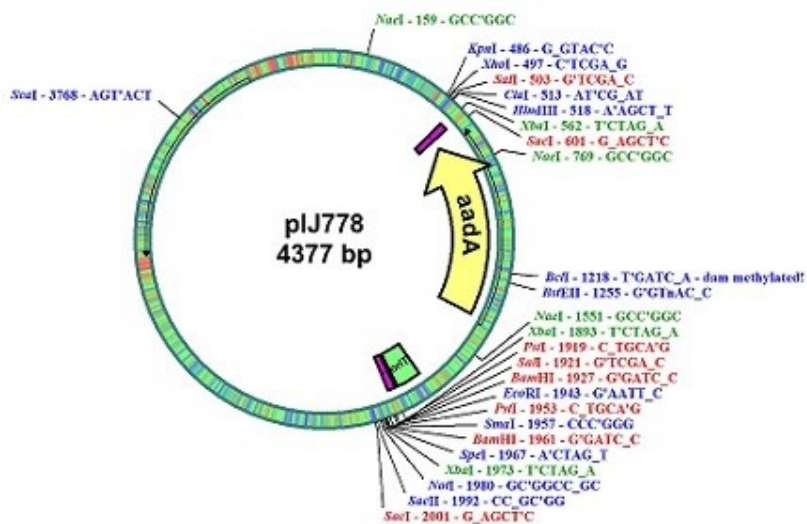
- Restričná mapa pBluescript SK+ je na Obr. 5.
- Vektor poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Bakteriologické laboratórium, Ústav imunológie a mikrobiológie 1. LF UK).



Obr. 5 Restričná mapa pBluescript SK+

pIJ778

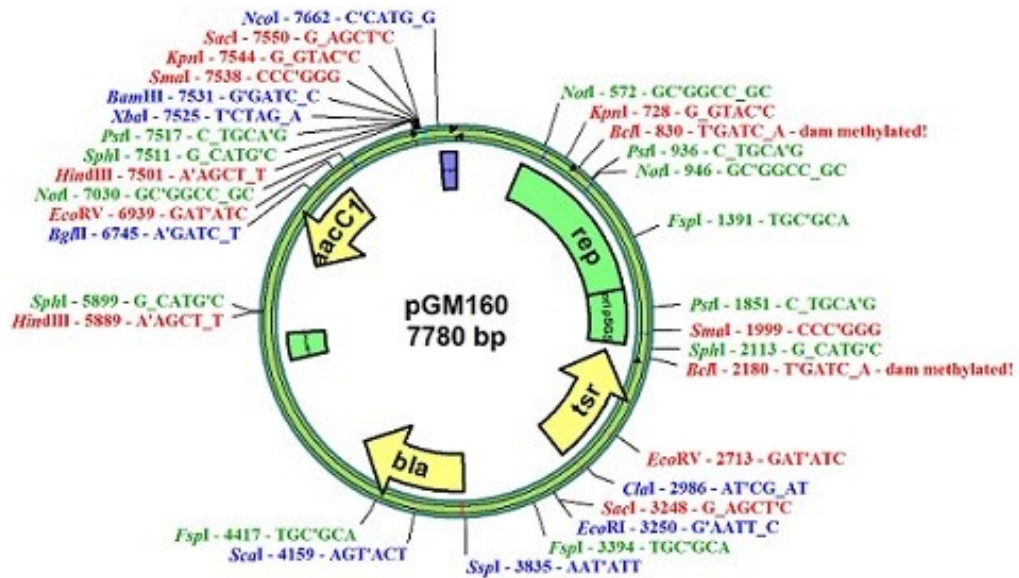
- Vektor, ktorého časť bola použitá na dizrupciu filipínového klastru génov
- Obsahuje tzv. inzerčnú kazetu, ktorá pozostáva z génu rezistencie na spektinomycín *aadA* a *oriT* miesta, ktoré je dôležité pre konjugálny prenos plazmidového konštruktú do streptomycét.
- Restričná mapa pIJ778 je na Obr. 6.
- Vektor poskytol: Dr. Bertolt Gust (Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Veľká Británia)



Obr. 6 Restričná mapa pIJ778

pGM160

- Multikópiový shuttle vektor s termosenzitívnou replikáciou. Nesie rezistenciu na tiosreptón (MUTH a kol., 1989).
- Restričná mapa pGM160 je na Obr. 7 (vektor nie je kompletne osekvenovaný).
- Vektor poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Bakteriologické laboratórium, Ústav imunológie a mikrobiológie 1. LF UK).



Obr. 7 Restričná mapa pGM160

6.1.3 Kultivačné médiá

Pokiaľ nie je uvedené inak, tak:

- pre prípravu médií bola použitá destilovaná voda (dH₂O)
- na úpravu pH boli používané 1M vodné roztoky HCl alebo NaOH
- percentuálne koncentrácie sú uvedené ako pomer hmotnosti a objemu (w/v)
- sterilizácia prebiehala v autokláve (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

6.1.3.1 Tekuté kultivačné médiá

LB (Lennox broth) médium

- 10 g tryptón (Tryptone, Oxoid)
- 5 g kvasnicový extrakt (Yeast extract, Oxoid)
- 5 g NaCl
- doplniť do celkového objemu 1000 ml
- pH 7,2 – 7,4

SOC médium

4 g tryptón (Tryptone, Oxoid)

1 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)

116 mg NaCl

38 mg KCl

- doplniť na celkový objem 200 ml
- pH 6,9 – 7,1
- po sterilizácii pridáme sterilné roztoky (na 200 ml):
 - 2 ml Mg^{2+} roztok (1M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a 1M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
 - 2 ml 2M D-glukóza

YEME médium

3 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)

5 g peptón (Neutralised Bacteriological Peptone, Oxoid)

3 g sladový extrakt (Malt Extract, Oxoid)

10 g glukóza (Lach-Ner)

340 g sacharóza (Lach-Ner)

- doplniť na celkový objem 1000 ml
- pH 7,2
- po sterilizácii pridáme sterilný roztok (na každých 100 ml):
 - 0,2 ml 2,5 M $MgCl_2$

RPMI médium

10 % BOFES (bovine fetal serum, Sigma-Aldrich)

1 % L-glutamín - sterilný (výsledná koncentrácia v médiu 2,92 $\mu g/ml$, Sigma-Aldrich)

0,1 % 2-Merkaptoetanol - sterilný (výsledná koncentrácia v médiu 50 μM)

1 % Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL, Gibco™)

- doplniť RPMI 1640 sterilným médiom (Lonza) na celkový objem 100 ml
- médium bolo pripravované zo sterilných zložiek (nesterilizované v autokláve)
- na kultiváciu streptomycét bolo použité rovnaké RPMI médium, avšak bez antibiotík

2X YT médium

- 16 g tryptón (Tryptone, Oxoid)
- 10 g kvasnicový extrakt (Yeast extract, Oxoid)
- 5 g NaCl
- doplniť na celkový objem 1000 ml
- pH 7,2

GYM médium

- 4 g glukóza (Lach-Ner)
- 4 g kvasnicový extrakt (Yeast extract, Oxoid)
- 10 g sladový extrakt (Malt extract, Oxoid)
- 1 g NZ Amin A (NZ-Amine®, Type A, Wako)
- 2 g NaCl
- 3 ml OB soli
- doplniť na celkový objem 1000 ml
- pH 7,3

OB soli

- 0,166 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0,25 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,12 g $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,3 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- doplniť na celkový objem 100 ml
- skladovať v nádobe z tmavého skla

6.1.3.2 Kultivačné médiá s agarom

MS médium (Mannitol soya flour)

- 20 g manitol (Lach-Ner)
- 20 g sójová múka
- 20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
- doplniť na celkový objem 1000 ml vodou z vodovodu

LB agar

- 1 l LB médium
- 20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)

Živný agar (Nutrient agar)

- 28 g živný agar (Nutrient Agar, Oxoid)
- doplniť na celkový objem 1000 ml

Mueller-Hinton agar s konskou krvou (Oxoid) (ďalej označovaný ako štandardný krvný agar, alebo len krvný agar)

- 2 g hovädzí extrakt
- 17,5 g kyslý hydrolyzát kazeínu
- 1,5 g škrob
- 17 g agar
- 0,02 g NAD
- 50 ml defibrinovaná konská krv
- doplniť na celkový objem 1000 ml
- pH 7,3
- dodávané firmou Thermo Scientific

Sabouraudov agar

- 65 g Sabouraudov agar (SABOURAUD 4% dextrose agar, Merck)
- doplniť na celkový objem 1000 ml
- pH 5,6

6.1.4 Roztoky a pufry

Sklenené mlieko (Glass milk)

V 800 ml dH₂O rosuspendujeme 400 g skleneného prachu, miešame 60 min. a necháme 90 min. stáť. Scentrifugujeme (10 min., 6000 rpm) a vzniknutý sediment rosuspendujeme v 200-300 ml dH₂O. Pridáme HNO₃ do 50% koncentrácie, privedieme takmer k varu a ochladíme. Opäť scentrifugujeme a sediment 4-6 krát premyjeme dH₂O (pH upravíme na

hodnotu 7). Zásobnú 50% suspenziu v dH₂O uchovávame pri teplote -80 °C (pre prácu pri 4 °C).

Roztok NaI

V 250 ml dH₂O rozpustíme 450 g NaI (nasýtený roztok pri izbovej teplote). Roztok pufrujeme 20mM Trisom s pH 7,5. Prefiltrujeme a pridáme 1 g Na₂SO₃. Skladujeme v nádobe z tmavého skla pri 4 °C.

NEW WASH premývací roztok

100mM	NaCl
1mM	EDTA
50 %	etanol (v/v)
10mM	Tris (Sigma-Aldrich)
	- pH 7,5

TAE zásobný pufor (50x koncentrovaný)

2M	Tris (Sigma-Aldrich)
1M	ľadová kyselina octová (ApplyChem)
50mM	EDTA (pH 8.0)
	- v dH ₂ O
	- používame 1x koncentrovaný

Nanášací pufor pre agarózovú elektroforézu (6x koncentrovaný)

0,25 %	brómfenolová modrá (w/v)
30 %	glycerol (w/v)
5 x	TAE pufor
	- v dH ₂ O

MOPS spórový pufor

10mM	MOPS (Sigma-Aldrich)
0,1M	NaCl
	- pH 7,1
	- sterilizovať v autokláve (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

STET pufor

8 g	sacharóza (Lach-Ner)
5 g	triton X-100
10 ml	0,5 M EDTA (pH 8.0)
5 ml	1 M Tris-HCl (pH 8.0)

- doplniť na celkový objem 100 ml dH₂O
- sterilizovať v autokláve (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

Kyslý fenol-chloroform

5 g	fenol
5 ml	chloroform
1 ml	dH ₂ O
5 mg	8-hydroxychinolín

- skladujeme v nádobe z tmavého skla pri 4 °C.

Neutrálny fenol-chloroform

Kyslý fenol-chloroform vytrepávame 10 min. s polovičným objemom 1M Tris-HCl (pH 8,8). Po oddelení fáz odstránime hornú vodnú fázu a zvyšok vytrepeme 10 min. s polovičným objemom 0,1M Tris-HCl (pH 8,0). Po rozdelení opäť odstránime hornú fázu a zvyšný neutrálny fenol-chloroform uchovávame v nádobe z tmavého skla pri 4 °C.

TE pufor

10mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1mM	EDTA (pH 8.0)

- sterilizovať v autokláve (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

2mM dNTPs

2mM	dATP
2mM	dTTP
2mM	dGTP
2mM	dCTP

- v sterilnej dH₂O, uchovávať pri teplote -20 °C

IPTG (izopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranozid)

- 0,2M zásobný roztok v dH₂O
- uchovávame pri teplote -20 °C

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranozid)

- 4% zásobný roztok v dimetylformamide
- uchovávame pri teplote -20 °C

Pufre pre enzýmy

10x T4 DNA ligačný pufor (10x T4 DNA Ligase buffer, Thermo Scientific)

zloženie:

400mM Tris-HCl (pH 7.8 pri 25 °C), 100mM MgCl₂, 100mM DDT, 5mM ATP

10x Klenow pufor (10x Klenow buffer, Thermo Scientific)

zloženie:

500mM Tris-HCl (pH 8.0 pri 25 °C), 50mM MgCl₂, 10mM DDT

10x Tango pufor (Thermo Scientific)

zloženie:

33mM Tris-acetát, 66mM octan draselný, 10mM octan horečnatý, 0,1 mg/ml BSA

10x B pufor (Thermo Scientific)

zloženie:

10mM Tris-HCl (pH 7.5 pri 37 °C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA

10x G pufor (Thermo Scientific)

zloženie:

10mM Tris-HCl (pH 7.5 pri 37 °C), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

10x O pufor (Thermo Scientific)

zloženie:

50mM Tris-HCl (pH 7.5 pri 37 °C), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

10x R pufor (Thermo Scientific)

zloženie:

10mM Tris-HCl (pH 7.5 pri 37 °C), 10mM MgCl₂, 100mM KCl, 0,1 mg/ml BSA

10x EcoRI pufor (Thermo Scientific)

zloženie:

50mM Tris-HCl (pH 7.5 pri 37°C), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA

10x EclI36II, SacI pufor (Thermo Scientific)

Zloženie:

10mM Bis-Tris Propán-HCl (pH 6.5 pri 37°C), 10mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA

10x KpnI pufor (Thermo Scientific)

Zloženie:

10mM Tris-HCl (pH 7.5 pri 37°C), 10mM MgCl₂, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA

Ostatné používané roztoky:

EDTA 50mM (pH 8)

Octan sodný 3M (pH 7)

Glycerol 20%, 10%

MgCl₂ 10mM

Fyziologický roztok (0,9 g NaCl v 100 ml dH₂O)

- všetky tieto roztoky sterilizované v autokláve (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

Lyzozým 10 mg/ml (v dH₂O)

Türk roztok (roztok kryštalickej violeti a kys. octovej)

Trypanová modrá (0,5% roztok v PBS)

Premývací roztok pre ELISA test (100 ml 10x PBS, 900 ml dH₂O, 0,05% Tween-20)

Enzýmy

RNáza A

Roztok RNázy A - koncentrácia 1 mg/ml v sterilnej dH₂O

- inkubovať 10 min. pri teplote 100 °C
- uchovávať pri teplote -20 °C

Klenow fragment

Klenow Fragment (10 U/ μ l, Thermo Scientific)

T4 PNK

T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l, New England Biolabs)

FastAP alkalická fosfatáza

FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ μ l, Thermo Scientific)

DNA ligáza

T4 DNA ligase (5 U/ μ l, Thermo Scientific)

Restričné endonukleázy (Thermo Scientific)

*Bgl*II, *Bst*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Msc*I, *Nae*I, *Not*I, *Pae*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sma*I, *Spe*I, *Sph*I, *Xba*I, *Xho*I

Roztoky antibiotík (Tab. 3)

Pokiaľ nie je uvedené inak, tak:

- na prípravu roztokov antibiotík bola používaná dH₂O
- roztoky antibiotík boli sterilizované filtráciou
- roztoky antibiotík boli uchovávané pri teplote -20 °C

Tab. 3 Používané roztoky antibiotík s uvedením ich zásobnej koncentrácie a výslednej koncentrácie v médiu.

Antibiotikum	Zásobný roztok (mg/ml)	Výsledná konc. v médiu (μg/ml)
Ampicilín	100	100
Apramycín	100	50 alebo 100
Chloramfenikol	25 v 100% etanole	25
Kanamycín	50	50
Kys. nalidixová	25	25
Spektinomycín	100	100
Tiostreptón	30 v DMSO	30

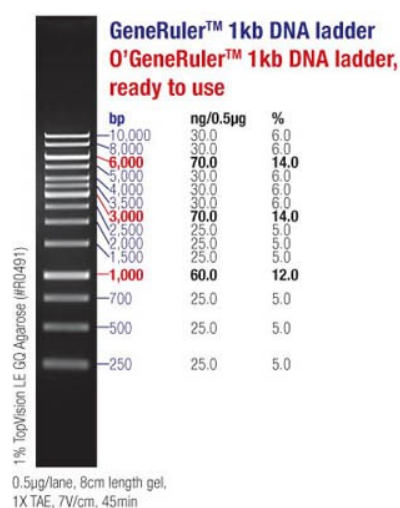
6.1.5 DNA oligonukleotidy a veľkostný štandard

Tab. 4 Názov a sekvencia použitých DNA oligonukleotidov (FIL1F a FIL1R dodané firmou INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, ostatné dodané firmou generi biotech).

Názov DNA oligonukleotidu	Sekvencia (5' - 3')
FIL1F	CAG CAT GTT GGT GGT GGT CT
FIL1R	CTC GAC CAT TTG CAC TCC AC
FILCRO-1F	CTT TAC GAA ATC GGC GAG AC
FILCRO-1R	GCT CGG ACA TGA CTC TCC TT
spec200	ATT TTG CCA AAG GGT TCG TG
spec1300	TCA CCA AGG TAG TCG GCA AA
FILLRout	GCC TTT TCG TTC TCT GTG TGG
FILPRout	TAC ATC CGC TCC GGT ACC TC

DNA veľkostný štandard

Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10 000 bp



Obr. 8 DNA veľkostný štandard používaný pre gélovú elektroforézu. Prevzaté z: <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/fermentas-generuler-1kb-dna-ladder/11823963>.

6.1.6 Komerčné kity

Kit na izoláciu chromozomálnej DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega)

Cell Lysis Solution

Nuclei Lysis Solution

Protein Precipitation Solution

RNase Solution – 4 mg/ml

Roztok RNázy A v DNA Rehydration Solution

DNA Rehydration Solution – 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA (pH 8.0)

- Kit skladovaný pri izbovej teplote.

Kit na izoláciu plazmidovej DNA z *E. coli* (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche)

Suspension Buffer (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8,0)

Rnasa A

Lysis Buffer (0,2M NaOH, 1% SDS)

Binding Buffer (4M guanidín hydrochlorid, 0,5M octan draselný, pH 4,2)

Wash Buffer I (etanol, 5M guanidín hydrochlorid, 20mM Tris-HCl, pH 6,6)

Wash Buffer II (etanol, 20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5)

Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5)

High Pure Filter Tubes

Collection Tubes

- Suspension Buffer skladovaný pri 4 °C. Ostatné komponenty kitu skladované pri izbovej teplote.

KAPA 2G Robust PCR Kit

KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 U/μL)

5X KAPA 2G Buffer A with MgCl₂

5X KAPA 2G Buffer B with MgCl₂

5X KAPA2G GC Buffer with MgCl₂

5X KAPA Enhancer 1

MgCl₂ (25mM)

dNTP Mix (10mM každý dNTP)

- Kit skladovaný pri teplote -20 °C.

Enzymovo viazaný imunosorbentný kit na kvantitatívnu detekciu ľudského IL-1β (Human IL-1beta Uncoated ELISA Kit, Invitrogen)

Capture Antibody (purifikovaná protilátka proti ľudskému IL-1β, konc. 250x)

Detection Antibody (protilátka proti ľudskému IL-1β konjugovaná s biotínom, konc. 250x)

Standard (Rekombinantný ľudský IL-1β na vytvorenie kalibračnej krivky)

Coating buffer (Fosforečnanom pufovaný fyziologický roztok – PBS, konc. 10x)

5x ELISA/ELISASPOT Diluent (konc. 5x)

Enzyme (Avidín-HRP konc. 250x)

Substrate Solution (tetrametylbenzidín - TMB)

96-well plates (96 jamková doštička Corning Costar)

- Kit skladovaný pri teplote 4 °C.

6.2 Metódy

6.2.1 Metódy izolácie DNA

Izolácia plazmidovej DNA z buniek *E. coli*

1. Do 2 ml LB média (prípadne s antibiotikami) zaočkujeme bunkovú kultúru *E. coli*. Kultivujeme cez noc na trepačke (220 rpm) pri 37 °C.
2. Kultúru preniesieme do mikroskúmavky a scentrifugujeme 30 s. pri 14 100 rpm, teplota 22 °C.
3. Odstránime supernatant a pelet dôkladne rosuspendujeme v zostatkovej kvapaline.
4. Pridáme 300 µl pufru STET, ktorý obsahuje 200 µg lyozóymu. Zvortexujeme.
5. Inkubujeme na ľade 10 min.
6. Zmes preniesieme v mikroskúmvkách na dve minúty do termobloku vyhriateho na 100 °C.
7. Scentrifugujeme 25 min. (14 100 rpm) pri teplote 4 °C.
8. Po centrifugácii odoberieme vrchnú vrstvu (200 µl), ktorú preniesieme do novej mikroskúmvky. Pridáme 200 µl izopropanolu s teplotou 4 °C. Precipitujeme 30 min. pri teplote -20 °C.
9. Scentrifugujeme 10 min. pri 4 °C. Supernatant odlejeme.
10. Premývame dvakrát 70% etanolom s teplotou -20 °C. Medzi premývaniami zmes scentrifugujeme (14 100 rpm, 4 °C, 5 min.).
11. Po druhom premývaní necháme pelet vyschnúť. K suchému peletu pridáme 50 µl TE a 1 µl Rnázy A (1 mg/ml). Skladujeme pri 4 °C.

Izolácia plazmidovej DNA z buniek *E. Coli* prostredníctvom komerčného kitu (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche)

1. Do 5 ml LB média (prípadne s antibiotikami) zaočkujeme jednu kolóniu *E. coli*. Kultivujeme cez noc na trepačke (37 °C, 220 rpm).
2. Po kultivácii scentrifugujeme 2 ml narastenej kultúry (5000 rpm, 5 min.).
3. Vzniknutý supernatant odlejeme a jeho zvyšky odstránime preklopením skúmvky na papierový obrúsok. Na dne skúmvky pozorujeme vznik peletu buniek.
4. Pelet buniek dôkladne rosuspendujeme v 250 µl rosuspendačného roztoku s Rnázou (Suspension buffer).

5. K zmesi pridáme 250 μ l lytického pufru (Lysis Buffer). Opatrne premiešame prevracaním skúmavky (3-6 krát). Inkubujeme 5 min. pri izbovej teplote.
6. K zmesi pridáme 350 μ l vychladeného Binding pufru. Opatrne premiešame prevracaním skúmavky (3-6 krát). Inkubujeme na ľade 5 min. Po inkubácii zmes scentrifugujeme (14 500 rpm, 10 min.).
7. High Pure filtračnú kolónu umiestíme do zbernej skúmavky (Collection Tube) a prenesieme sem supernatant. Centrifugujeme 1 min. pri 14 500 rpm.
8. V zbernej skúmavke vzniká tzv. flow-through, ktorý odlejeme. Do kolóny následne napipetujeme 500 μ l premývacieho roztoku I. (Wash Buffer I) a centrifugujeme 1 min. pri 14 500 rpm.
9. Vzniknutý „flow through“ opäť odlejeme a do kolóny pridáme 700 μ l premývacieho roztoku II (Wash Buffer II). Scentrifugujeme 1 min. pri 14 500 rpm.
10. Po druhom premývaní odlejeme flow-through a ešte raz centrifugujeme 1 min. pri 14 500 rpm.
11. High Pure filtračnú kolónu prenesieme do novej, sterilnej mikroskúmavky, pridáme 100 μ l TE a scentrifugujeme 1 min. pri 14 500 rpm. Zachytávame flow-through, ktorý obsahuje plazmidovú DNA. Skladujeme pri 4 °C.

Izolácia genomickej DNA zo streptomycét prostredníctvom komerčného kitu (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega)

1. Požadovaný kmeň streptomycét kultivujeme na trepačke v GYM médiu (prípadne s antibiotikami) cez noc (220 rpm, 30 °C).
2. Do mikroskúmavky prenesieme 1 ml ceznočnej kultúry, scentrifugujeme (14 100 rpm, 5 min.) a odlejeme supernatant.
3. K vzniknutému peletu pridáme 540 μ l EDTA a 60 μ l lyzozýmu, opatrne premiešame viacnásobným vtiahnutím do pipety.
4. Inkubujeme 10 min. pri teplote 37 °C.
5. Scentrifugujeme 7 min. pri rýchlosti 14 100 rpm. Supernatant odlejeme.
6. Pridáme 600 μ l Nuclei Lysis Solution a opatrne rosuspendujeme viacnásobným vtiahnutím do pipety.
7. Inkubujeme 5 min. pri teplote 80 °C. Následne necháme vychladnúť na laboratórnu teplotu.
8. K bunkovému lyzátu pridáme 3 μ l roztoku RNázy. Premiešame prevrátením skúmavky (3-6 krát).

9. Inkubujeme pri 37 °C 45 min., následne ochladíme na izbovú teplotu.
10. K zmesi pridáme 200 µl roztoku precipitujúceho proteínu (Protein Precipitation solution) dôkladne zvertexujeme a inkubujeme na ľade 5 min.
11. Scentrifugujeme 3 min. pri rýchlosti 14 100 rpm.
12. Vzniknutý supernatant prenesieme do novej mikroskúmavky obsahujúcej 600 µl izopropanolu. Premiešame prevracaním skúmavky až kým nie sú viditeľné „vlákna“ DNA.
13. Scentrifugujeme 3 min. pri rýchlosti 14 100 rpm.
14. Odlejeme supernatant. Pelet necháme vyschnúť na vzduchu.
15. Po vysušení pridáme k peletu DNA 600 µl 70% etanolu. Premiešame viacnásobným prevrátením skúmavky.
16. Scentrifugujeme 3 min. pri rýchlosti 14 100 rpm.
17. Odlejeme supernatant a opäť necháme skúmavku „hore dnom“ na filtračnom papieri. Pelet necháme vyschnúť na vzduchu (10-15 min.)
18. K vysušenému peletu pridáme 100 µl TE roztoku a rehydratujeme DNA inkubovaním 1 hod. pri teplote 65 °C, prípadne inkubujeme cez noc pri 4 °C.
19. Izolovanú genomickú DNA skladujeme pri teplote 4 °C.

GLASSMILK izolácia DNA z agarózového gélu

1. Z gélu odrežeme časti, v ktorých boli nanesené veľkostné štandardy. Tieto časti zafarbíme pomocou GelStar Nucleic Acid Gel Stain (15 min.)
2. Po zafarbení gél opäť spojíme dohromady. Na základe zafarbenia veľkostných štandardov zaznačíme pod UV lampou miesto, kde sa na gély nachádza fragment s požadovanou veľkosťou.
3. Časť gélu s izolovaným fragmentom vyrežeme a zvážíme.
4. Na každý jeden gram gélu pridáme 2 – 3 ml roztoku NaI.
5. Za občasného premiešavania inkubujeme pri 53 °C až kým sa agaróza nerozpustí (max. 5 min.).
6. Pridáme 5 µl skleneného mlieka, dobre premiešame.
7. Inkubujeme na ľade 5 – 10 min. Občas premiešame.
8. Scentrifugujeme 15 min. Sediment 3 krát premyjeme NEW WASH roztokom. Po poslednom premytí ešte raz scentrifugujeme a opatrne pipetou odoberieme zvyšok kvapaliny.
9. Rosuspendujeme v 50 µl sterilnej dH₂O/TE a eluujeme DNA 10 min. pri 53 °C.

10. Scentrifugujeme 1 min. a odoberieme supernatant, ktorý obsahuje eluovanú DNA.
- pred ligáciou extrahujeme supernatant neutrálnym fenol–chloroformom a prezrážame etanolom.

6.2.2 Metódy ďalšej práce s DNA

Klonovanie „natupo“

Postup práce s klonovacím vektorom:

- a) Klonovací vektor (pBluescript SK+) štiepime v 10 μ l restričnou endonukleázou (RE) štiepiacou natupo (1 μ l vektor, 1 μ l 10x pufor, 1 μ l RE, 7 μ l dH₂O). Inkubujeme 1,5 hod. pri teplote určenej výrobcom RE.
- b) Po štiepení defosforylujeme konce pridaním 1 μ l FastAP alkalickéj fosfatázy, 1 μ l 10x pufru pre RE a 8 μ l dH₂O. Inkubujeme 10 min. pri 37 °C. Následne inaktivujeme fosfatázu inkubáciou pri teplote 75 °C 5 min.

Postup práce s PCR fragmentom:

- a) Na agarózový gél nanesieme amplifikovanú PCR zmes. Po prebehnutí elektroforézy izolujeme požadovaný fragment metódou GLASSMILK.
- b) Po izolácii eluujeme fragment DNA do 24,5 μ l dH₂O. Pridáme 3 μ l 10xPNK pufor, 1,5 μ l 20mM ATP a 1 μ l PNK.
- c) Zmes inkubujeme 30 min. pri teplote 37 °C. Následne inaktivujeme PNK inkubáciou 10 min. pri 70 °C.
- d) Extrahujeme neutrálnym fenol–chloroformom a scentrifugujeme (14 100 rpm, 5 min.).
- e) Do novej mikroskúmavky odoberieme supernatant (vodnú fázu), ktorý zrážame prídavkom 1/10 octanu sodného (pH 7) a 3 objemov 100% etanolu. Inkubujeme minimálne 40 min. pri -80 °C.
- f) Zmes scentrifugujeme 15 min. pri 4 °C (14 100 rpm) a supernatant odlejeme. K sedimentu pridáme 100 μ l 75% etanolu a scentrifugujeme (5 min, 4 °C, 14 100 rpm). Supernatant odlejeme. Opakujeme dvakrát.
- g) Po druhom premývaní supernatant opäť odlejeme a sediment necháme vysušiť na vzduchu.

- h) Suchý sediment rozpustíme v 17 μl dH_2O , pridáme 2 μl 10x Klenowho pufru, 0,5 μl 2mM dNTP a 1 μl Klenowho enzýmu. Inkubujeme pri 37 °C 15 min. Klenow enzým následne inaktivujeme inkubáciou pri 70 °C 10 min.
1. Takto upravený PCR fragment spojíme s defosforylovaným klonovacím vektorom. Extrahujeme neutrálnym fenol-chloroformom a prezrážame prídavkom etanolu.
 2. Vysušený sediment rozpustíme v 20 μl dH_2O , pridáme 2 μl 10x ligačného pufru s ATP, 1 μl T4 DNA ligázy a 2 μl 50% PEG4000. Inkubujeme pri 22 °C cez noc.
 3. Po ligácii prezrážame etanolom a sediment vysušíme.
 4. K vzniknutému sedimentu pridáme 50 μl elektrokompetentných buniek *E. coli* SURE, ktoré transformujeme elektroporáciou (viď kap. 6.2.4). Transformované bunky vysievame na misky s LB médiom obsahujúcim príslušné antibiotikum, IPTG a X-gal. Kultivujeme cez noc pri 37 °C.

Fenol-chloroformová extrakcia DNA (SAMBROOK a RUSSELL, 2001)

1. K roztoku DNA v mikroskúmavke pridáme rovnaký objem neutrálneho fenol-chloroformu. Dôkladne zvertexujeme.
2. Zmes scentrifugujeme (14 100 rpm, 5 min.). Pozorujeme oddelenie fáz.
3. Vodnú fázu obsahujúcu DNA preniesieme do sterilnej mikroskúmavky a prezrážame etanolom (viď „Zrážanie DNA etanolom“ nižšie).

Zrážanie DNA etanolom (SAMBROOK a RUSSELL, 2001)

1. K roztoku DNA pridáme 1/10 objemu octanu sodného (3 M, pH 6,5) a 2-3 objemy 100% etanolu (-20 °C).
2. Zrážame minimálne 40 min. pri teplote -80 °C.
3. Zmes scentrifugujeme (14 100 rpm, 15 min., 4 °C).
4. Supernatant odstránime a pelet premývame prídavkom 2 objemov 75% etanolu (-20 °C). Opäť scentrifugujeme (14 100 rpm, 5 min., 4 °C). Opakujeme 2 krát.
5. Po druhom premývaní odstránime supernatant a pelet necháme na vzduchu vyschnúť.
6. Vysušený pelet rosuspendujeme v TE alebo dH_2O .

Meranie koncentrácie DNA vo vzorke

Meranie koncentrácie DNA vo vzorku uskutočňujeme na prístroji LKB Biochrom Ultrospec II E pri vlnovej dĺžke 260 nm (absorbčné maximum DNA). Ako blank používame pufor TE

alebo dH₂O v závislosti na tom, v čom je DNA rozpustená. Meriame v kyvetách typu Q (Ultrspec Cells, Q, LKB Biochrom).

1. Roztok DNA a blank riedime stonásobne.
2. Stanovíme blank.
3. Meriame absorbanciu vzorky pri 260 nm (A_{260}).
4. Pre koncentraciu DNA platí: ak $A_{260}=1$, tak potom $c=50 \mu\text{g/ml}$. Z tohto vzťahu a po zohľadnení riedenia určíme koncentráciu DNA vo vzorke.

Restrikčné štiepenie DNA

Restrikčné štiepenie bolo uskutočňované v objeme 10-50 μl restrikčnými enzýmami od firmy Thermo Scientific po dobu 1–2 h. Pufor a teplota štiepenia bola zvolená na základe tabuľky dodávanej výrobcom. V prípade štiepenia dvomi restrikčnými endonukleázami súčasne bol zvolený taký pufor, ktorého zloženie sa najviac približovalo zloženiu ideálnych pufrov oboch použitých enzýmov (na určenie tohto enzýmu sme používali DoubleDigest Calculator od firmy Thermo Scientific, dostupné tu: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>).

Zloženie restrikčnej zmesi: DNA, dH₂O, restrikčná endonukleáza (1/10 prípadne 1/20 objemu), pufor odporúčaný výrobcom.

Defosforylácia 5' koncov DNA

1. DNA štiepime zvolenou restrikčnou endonukleázou v celkovom objeme 10 μl .
2. Po restrikčnom štiepení k zmesi pridáme 1 μl FastAP alkalickéj fosfatázy, 1 μl pufru pre FastAP alkalickú fosfatázu a 8 μl dH₂O. Inkubujeme 10 min. pri 37 °C.
3. Po inkubácii inaktivujeme fosfatázu 5 min. pri 75 °C.

Zatupenie 3' koncov DNA

1. DNA rozpustíme v 17 μl dH₂O, pridáme 2 μl 10x Klenowho pufru, 1 μl Klenowho enzýmu a 0,5 μl 2mM dNTPs.
2. Zmes inkubujeme pri 37 °C 15 min.
3. Po inkubácii inaktivujeme Klenow enzým 10 min. pri 70 °C.

Ligácia DNA

1. DNA po fenol-chloroformovej extrakcii a zrážaní etanolom vysušíme a k vzniknutému peletu pridáme:
 - a) pre ligáciu kohezívnych koncov: 17 μ l dH₂O, 2 μ l 10x konc. T4 DNA ligačného pufru a 1 μ l T4 DNA ligázy.
 - b) pre ligáciu tupých koncov: 15 μ l dH₂O, 2 μ l 10x konc. T4 DNA ligačného pufru, 1 μ l T4 DNA ligázy a 2 μ l PEG4000.
2. Inkubujeme cez noc pri 22 °C.
3. Po inkubácii ligovanú DNA prezrážame etanolom a k suchému peletu pridáme 50 μ l elektrokompetentných buniek *E.coli* SURE.

Gélová elektroforéza (SAMBROOK a RUSSELL 2001)

- Pre elektroforézu používame 1% agarózový gél (SeaKem® LE Agarose, Lonza) v 1x konc. pufru TAE (w/v). Pre zviditeľnenie fragmentov DNA pridávame do agarózového gélu 1/10 000 objemu farbiva GelStar Nucleic Acid Gel Stain. V niektorých prípadoch (napr. pri metóde GLASSMILK) dofarbujeme gél dodatočne v 1x konc. pufru TAE s prídavkom 1/3000 objemu farbiva GelStar Nucleic Acid Gel Stain (inkubujeme 15 min. v tme).
- Ako elektroforetický pufor používame 1x konc. pufor TAE.
- Pre nanášanie pridávame k vzorkám nanášací pufor v objeme 1/5 vzorky.
- Elektroforéza štandardne prebiehala pri napätí 90-120V.
- DNA zviditeľníme nasvietením pod UV svetlom.

6.2.3 PCR reakcie

- Príprava reakčných zmesí prebiehala na ľade s čistými sterilnými špičkami.
- Pre PCR používame zariadenie-termocyklér T-Gradient Thermocycler od Whatman Biometra.
- Teplota nasadenia primerov je zvyčajne o 4 °C nižšia, než je ich teplota topenia (T_m) uvádzaná výrobcom. V prípade rôznych teplôt sa jedná o ich priemernú hodnotu.
- Pre PCR bol využitý komerčne dostupný kit KAPA 2G Robust od firmy Sigma-Aldrich.

Zloženie PCR reakčnej zmesi:

10 µl	5x 2G GC s Mg
5 µl	dNTP 2mM
0,5 µl	primer forward 100mM
0,5 µl	primer reverse 100mM
1 µl	DNA templát
0,4 µl	DNA polymeráza (HotStart DNA Polymerase 5 U/µL)
32,6 µl	dH ₂ O

- zmes dôkladne premiešame a rozdelíme do dvoch skúmaviek pre PCR (vytvorenie teplotného gradientu – nasadenie primerov pri dvoch teplotách).

Priebeh cyklov PCR:

Počet cyklov		Čas	Teplota
1	počiatočná denaturácia	4 min.	95 °C
35	denaturácia	90 s.	94 °C
	nasadenie primerov	60 s.	53/55 °C, 56/58 °C, 58 °C
	elongácia reťazca	70 s.	72 °C
1	finálna elongácia	5 min.	72 °C

- Po dokončení cyklov bola teplota nastavená na 4 °C.
- Teploty 53/55 °C použité na nasadenie primerov pri amplifikácii fragmentu prostredníctvom dvojice: FIL1F a FIL1R (vid' kap. 7.2.1).
- Teploty 56/58 °C použité na nasadenie primerov pri amplifikácii fragmentu prostredníctvom dvojice: FILCRO-1F a FILCRO-1R (vid' kap. 7.2.1).
- Teplota 58 °C bola použitá na nasadenie primerov pri amplifikácii fragmentov prostredníctvom dvojíc (vid' kap. 7.4): spec1300 a FILCRO-1R
FIL1F a spec200
FILLRout a FILPRout
- Správny priebeh PCR bol overený prostredníctvom gélovej elektroforézy: 3 µl PCR produkt, 2 µl dH₂O, 1 µl farbiva.

6.2.4 Génové manipulácie

Príprava buniek *E. coli* SURE a *E. coli* ET12567/pUZ8002 kompetentných pre elektroporáciu

1. 5 ml LB média s príslušnými antibiotikami (*E. coli* SURE – tetracyklín, *E. coli* ET12567/pUZ8002 – kanamycín, chloramfenikol, tetracyklín) zaočkujeme jednou kolóniou daného kmeňa. Kultivujeme cez noc na trepačke (220 rpm) pri 37 °C.
2. Do 200 ml LB média preniesieme 2 ml narastenej ceznočnej kultúry. Kultivujeme pri 37 °C na trepačke (220 rpm) až pokiaľ kultúra nedosiahne OD₆₀₀ ~ 0,7.
3. Kultúru scentrifugujeme vo vychladených centrifugačných skúmavkách (8000 rpm, 5 min., 4 °C).
4. Supernatant odlejeme a pelet buniek rosuspendujeme v 200 µl ľadovej sterilnej dH₂O. Opakujeme dvakrát.
5. Po druhom premývaní ešte raz scentrifugujeme a dôkladne odoberieme všetok supernatant.
6. K bunkám pridáme 1 ml ľadového 10% glycerolu.
7. Bunkovú suspenziu rozdelíme po 50 µl do vychladených mikroskúmaviek. Skladujeme pri -80 °C.

Transformácia kompetentných buniek *E. coli* SURE a *E. coli* ET12567/pUZ8002 elektroporáciou

1. K 50 µl kompetentných buniek pridáme 1–5 µl plazmidovej DNA, premiešame a inkubujeme na ľade 10–30 min.
2. Zmes preniesieme do vychladenej elektroporačnej kyvety a v elektroporátore Electro Square Porator ECM 830, BTX Division of Genetronics vykonáme transformáciu (nastavenie elektroporátora: napätie 2,0 kV, dĺžka pulzu 99 µs, 10 pulzov, šírka medzery v kyvete 1 mm, intenzita poľa 20 kV/cm).
3. Ihneď po elektroporácii k bunkám v kyvete pridáme 1 ml SOC média.
4. Bunky preniesieme do sterilnej mikroskúmavky a kultivujeme na trepačke (220 rpm, 1 hod., 37 °C).
5. Bunky vysievame na misku s LB médiom a príslušnými antibiotikami. Kultivujeme cez noc pri 37 °C.

Konjugačný prenos plazmidu z *E. Coli* ET12567/pUZ8002 do streptomycét

1. Kompetentné bunky *E. Coli* ET12567/pUZ8002 transformujeme požadovaným plazmidom elektroporáciou a selektujeme na miskách s LB médiom obsahujúcim spektinomycín, chloramfenikol a kanamycín.
2. Jednou kolóniou zaočkujeme 10 ml LB média so spektinomycinom, chloramfenikolom a kanamycínom. Kultivujeme cez noc na trepačke (250 rpm) pri 37 °C.
3. 150 µl ceznočnej kultúry prenesieme do 15 ml čerstvého LB média s príslušnými antibiotikami (vid'. bod č. 2). Kultivujeme pri 37 °C na trepačke (250 rpm) približne 4 hod. až pokým $OD_{600} \sim 0,4$.
4. Po kultivácii bunky scentrifugujeme (5000 rpm, 10 min.) a dvakrát premyjeme 10 ml LB média bez antibiotík. Po druhom premývaní bunky rosuspendujeme v 1 ml LB média bez antibiotík.
5. Pre každú konjugáciu prenesieme 10 µl spór streptomycét do 500 µl 2X YT média a inkubujeme 10 min. pri teplote 50 °C. Následne necháme ochladnúť na izbovú teplotu.
6. Zmiešame 500 µl pripravených spór a 500 µl bunkovej suspenzie *E. coli*. Krátko scentrifugujeme, odlejeme väčšinu supernatantu a pelet rosuspendujeme v reziduálnom objeme média (~100 µl).
7. Vysievame na misky s MS médiom obsahujúcom 10mM $MgCl_2$ bez antibiotík. Inkubujeme 16-20 hod. pri teplote 30 °C.
8. Po inkubácii misky prelievame 1 ml dH_2O s obsahom kys. nalidixovej a spektinomycínu.
9. Misky ďalej inkubujeme pri 30 °C až pokiaľ sa neobjavia kolónie.

6.2.5 Analytické a separačné metódy

6.2.5.1 Extrakcia sekundárnych metabolitov z kmeňa TR42

Celkovo boli vykonané 3 rôzne spôsoby kultivácie baktérií kmeňa TR42. Zo získaných kultúr boli neskôr prostredníctvom acetónu a etylacetátu extrahované sekundárne metabolity patriace medzi nepolárne látky.

Spoločný postup pre všetky tri kultivácie (označenie číslami):

1. Do mikroskúmavky prenesieme 0,5 ml spórovej suspenzie kmeňa TR42 v pufre MOPS.
2. V termobloku vykonáme teplotný šok (10 min., 55 °C) na indukciu germinácie spór.

Kultivácia v médiu GYM

- i. Spórami po teplotnom šoku zaočkujeme prelamovanú Erlenmeyerovu banku s 30 ml GYM média. Kultivujeme na trepačke (200 rpm), 48 hod. pri teplote 30 °C.
- ii. Po kultivácii prenesieme 8 ml narastenej kultúry do prelamovanej Erlenmeyerovej banky s 80 ml GYM média. Kultivujeme na trepačke (200 rpm), 72 hod. pri teplote 30 °C.

Kultivácia v médiu GYM a RPMI bez antibiotík

- i. Spórami po teplotnom šoku zaočkujeme prelamovanú Erlenmeyerovu banku s 30 ml RPMI média bez antibiotík. Kultivujeme na trepačke (200 rpm), 6 hod. pri teplote 30 °C.
- ii. Po 6 hodinách kultivácie pridáme ku kultúre 50 ml RPMI média bez antibiotík. Pokračujeme v kultivácii na trepačke (200 rpm), 48 hod. pri teplote 30 °C.
- iii. Z kultúry odoberieme 8 ml suspenzie a scentrifugujeme 10 min. pri rýchlosti 6000 rpm.
- iv. Vzniknutý pelet buniek prenesieme do prelamovanej Erlenmeyerovej banky s 80 ml GYM média. Kultivujeme na trepačke (200 rpm), 72 hod. pri teplote 30 °C.

Kultivácia v médiu GYM a RPMI bez antibiotík spolu s bunkami z línie THP-1

- i. Spórami po teplotnom šoku zaočkujeme prelamovanú Erlenmeyerovu banku s 30 ml RPMI média bez antibiotík. Kultivujeme na trepačke (200 rpm), 6 hod. pri teplote 30 °C.
- ii. Po 6 hodinách kultivácie pridáme ku kultúre 50 ml RPMI média bez antibiotík, ktoré obsahuje bunky z línie THP-1 v koncentrácii 10^5 buniek/ml. Pokračujeme v kultivácii na trepačke (200 rpm), 48 hod. pri teplote 30 °C.
- iii. Z kultúry odoberieme 8 ml suspenzie a scentrifugujeme 10 min. pri rýchlosti 6000 rpm.
- iv. Vzniknutý pelet buniek prenesieme do prelamovanej Erlenmeyerovej banky s 80 ml GYM média. Kultivujeme na trepačke (200 rpm), 72 hod. pri teplote 30 °C.

3. Po 72 hod. kultivácie kultúru scentrifugujeme (5000 rpm, 10 min., 22 °C). Supernatant zlejeme do sklenenej kadičky. Ďalej pracujeme zvlášť so supernatantom, a zvlášť so sedimentovanými bunkami.

Práca so supernatantom

- i. V supernatante rozpúšťame NaCl až do 5M koncentrácie (nasýtený roztok).
- ii. K roztoku pridáme 1/3 objemu etylacetátu a celú zmes preniesieme do deliaceho hruškovitého lievika. Zmes inkubujeme na recipročnej trepačke (250 rpm) v chladovej miestnosti (4 °C) a v tme (30 min.).
- iii. Po inkubácii zmes scentrifugujeme (5000 rpm, 10 min.). Pozorujeme oddelenie fáz.
- iv. Hornú etylacetátovú fázu preniesieme do odparovacej banky, zazátkujeme a uložíme do -20 °C pokiaľ nebudeme hotoví s prácou so sedimentovanými bunkami.

Práca so sedimentovanými bunkami

- i. K peletu sedimentovaných buniek pridáme acetón o objeme ¼ z celkového objemu kultúry.
 - ii. Zmes trepeme 30 min. v deliacom hruškovitom lieviku na recipročnej trepačke v chladovej miestnosti (4 °C), v tme a pri rýchlosti 250 rpm.
 - iii. Po inkubácii zmes scentrifugujeme (5000 rpm, 10 min.).
 - iv. Supernatant prelejeme do odparovacej banky a odparujeme na rotačnej vákuovej odparke (LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments) pri teplote vodného kúpeľa 37 °C a podtlaku 140 mbar, až pokiaľ neostáva v banke malé množstvo vodnej fázy, ktoré nie je možné odpariť.
 - v. K zvyškovému objemu pridáme 3 objemy etylacetátu, preniesieme do deliaceho hruškovitého lievika a trepeme 30 min. na recipročnej trepačke v chladovej miestnosti (4 °C) v tme pri rýchlosti 250 rpm.
 - vi. Zmes scentrifugujeme (5000 rpm, 10 min.). Pozorujeme oddelenie fáz.
 - vii. Hornú etylacetátovú fázu pridáme do odparovacej banky, ktorá obsahuje etylacetátovú fázu z extrakcie supernatantu.
4. Etylacetátovú fázu odparujeme do sucha na rotačnej vákuovej odparke pri teplote vodného kúpeľa 37 °C a podtlaku 140 mbar.

5. Po ukončení odparovania pridáme do odparovacej banky malé množstvo chloroformu (600 µl). Za použitia Pasteurovej pipety dôkladne opláchneme steny banky.
6. Vzniknutý roztok obsahujúci sekundárne metabolity prenesieme do vialky z tmavého skla, uzavrieme a skladujeme pri teplote -80 °C.

6.2.5.2 Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s UV detekciou diódového poľ'a a hmotnostnou detekciou doby letu (UHPLC-DAD-ToF-MS)

Extrakty sekundárnych metabolitov získané zo streptomycét boli analyzované prostredníctvom UHPLC. Kvapalinový chromatograf Acquity UPLC System (Waters) pozostáva z Acquity UPLC vysokotlakového čerpadla, Acquity UPLC dávkovača vzoriek, Acquity UPLC kolónového termostatu, Acquity PDA 2996 detektora s diódovým poľ'om (DAD), hmotnostného detektora LCT Premier XE (Waters) s elektrosprejom (ESI – Electrospray Ionization) a ortogonálne usporiadaného analyzátora doby letu (ToF – Time of Flight, Waters). Získané dáta boli spracované a vyhodnotené dodávaným programom MassLynx™, verzia 4.1 (Waters).

UHPLC sa používa k oddeleniu jednotlivých zložiek vzorky. Tieto zložky sú analyzované prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie, ktorá rozdeľuje fragmenty látok na základe pomeru hmotnosti k náboju. Pomocou programu MassLynx™ je potom k získaným hodnotám navrhnuté elementárne zloženie analyzovaných látok (merané a vyhodnocované Ing. Matoušem Čihákem).

Podmienky merania:

UHPLC

- Kolóna Acquity UPLC BEH C18 (50×2,1 mm, veľkosť častíc 1,7 µm; Waters).
- Mobilná fáza: A – 0,1% kyselina mravčia v dH₂O; B – 100% acetonitril.
- Rýchlosť prietoku: 0,4 ml/min, celková doba analýzy: 18 min.
- Gradientová elúcia (min/%A): 0/90, 12/40, 15/20, 16/20, 18/0, 20/90.
- Teplota kolóny: 25 °C; teplota vzorky: 10 °C.
- Objem nástreku: 2-5 µl.

MS

- Pozitívna ionizácia elektrosprejom (ESI+).
- Napätie na vstupnom kuželi: ± 40 V; napätie na kapiláre: $\pm 2\,500$ V.
- Teplota bloku iónového zdroja: 120 °C.
- Teplota desolvatačného plynu (N₂): 350 °C.
- Prietok desolvatačného plynu: 800 l/h.
- Prietok plynu na vstupnom kuželi: 50 l/h.
- Teplota kolóny: 25 °C; teplota vzorky: 10 °C.
- Merané vo „W“ móde, doba skenu $0,1$ s, oneskorenie medzi skenmi $0,01$ s.
- Špecifické [M-H]⁻ a [M+H]⁺ ióny boli extrahované s hmotnostným oknom $0,05$ Da.

6.2.5.3 Chromatografia na tenkej vrstve (TLC)

Pri tenkovrstvovej chromatografii (TLC) bola ako stacionárna fáza použitá TLC hliníková fólia pokrytá vrstvou silikagélu s fluorescenčným indikátorom F₂₅₄ (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck). Ako mobilnú fázu pre TLC sme použili zmes benzénu a acetónu v pomere 3:2 (v/v)

1. Pripravíme si TLC fóliu v takých rozmeroch, aby bolo možné nanášať vzorky $1,5$ cm od bočných krajov a zároveň $1,5$ cm od susednej vzorky. Vzorky nanášame na tzv. štartovaciu líniu, ktorá sa nachádza $1,5$ cm od spodného okraja.
2. Vzorku (acetylát/chloroformový extrakt) nanášame postupne po malých kvapkách prostredníctvom mikrostriekačky Hamilton tak, aby vznikla škvrna s priemerom maximálne 3 mm. Necháme zaschnúť.
3. Do vyvíjacej kolóny nalejeme do výšky 1 cm mobilnú fázu a vložíme sem TLC fóliu so vzorkou. Kolónu uzavrieme skleneným vrchnákom.
4. Necháme vyvíjať až pokiaľ čelo mobilnej fázy nedosiahne asi 1 cm od horného okraja TLC fólie. Fóliu vyberieme a necháme uschnúť.
5. Takto vyvinutú TLC fóliu použijeme na biologický test (viď ďalej).

6.2.5.4 Biologický test prítomnosti antimikrobiálnych látok

Na určenie prítomnosti biologicky aktívnych látok v acetylát/chloroformovom extrakte z kmeňa TR42 boli použité biologické testy. Testy boli vykonané na siedmich zástupcoch baktérií a jednom zástupcovi húb (viď Tab. 5).

1. Do Petriho misky nalejeme vhodné agarové médium podľa kultivovaného druhu mikroorganizmu (viď Tab. 5) a necháme stuhnúť.

Tab. 5 Mikroorganizmy použité na biologické testy s uvedením médií použitých na ich kultiváciu.

Mikroorganizmus	Typ média
<i>Candida albicans</i>	Saboraudov agar
<i>Bacillus subtilis</i>	Živný agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	MH agar s konskou krvou
<i>Neisseria lactamica</i>	MH agar s konskou krvou
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH agar s konskou krvou
<i>Citrobacter freundii</i>	MH agar s konskou krvou
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH agar s konskou krvou
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MH agar s konskou krvou

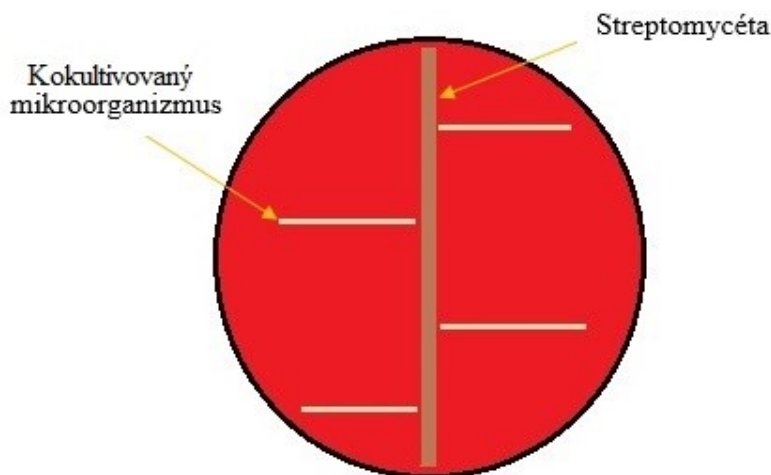
2. V 2 ml fyziologického roztoku si pripravíme mierne zakalenú suspenziu daného mikroorganizmu, ktorú prenesieme na povrch agarovej platne. Prostredníctvom sterilnej vatovej tyčinky suspenziu rozotrieme rovnomerne po celom povrchu. Necháme zaschnúť.
3. Na takto zaočkovaný agar priložíme práve vyvinutú TLC doštičku. Opatrne odstránime bubliny, ktoré by mohli brániť difúzii látok. TLC doštičku necháme na agare priloženú 15 min., potom ju odstránime.
4. Misky inkubujeme cez noc pri teplote 37 °C.
5. V prípade prítomnosti antimikrobiálnych látok voči danému mikroorganizmu pozorujeme nasledujúci deň vznik inhibičných zón v miestach, kde tieto látky difundovali do média.

6.2.6 Ostatné metódy

Kokultivácia streptomycét kmeňa TR42 s vybranými zástupcami patogénnych a nepatogénnych mikroorganizmov

1. Misku s krvným agarom zaočkujeme príslušným kmeňom streptomycét (jedna vertikálna čiara prechádzajúca stredom misky).

2. Inkubujeme 48 hod. pri teplote 30 °C.
3. Po uplynutí doby kultivácie zaočkujeme na danú miskú vybrané druhy mikroorganizmov (vid' Tab. 5). Tieto mikroorganizmy očkujeme jednou čiarou, kolmo na pás, kde narástla streptomycéta (max. 4 mikroorganizmy na miskú, Obr. 9).



Obr. 9 Schéma nanášania streptomycéty a vybraných druhov mikroorganizmov pri kokultivačnom experimente.

4. Pokračujeme v kultivácii pri teplote 37 °C, 24 hod.
5. Po uplynutí doby kultivácie experiment vyhodnotíme.

Príprava spórovej suspenzie kmeňa TR42

1. Celý povrch Petriho misky s MS médiom zaočkujeme spórami TR42. Inkubujeme pri 30 °C 96 h.
2. Po ukončení kultivácie, za použitia sterilnej hokejky, preniesieme spóry z Petriho misky do 2 ml spórového pufru MOPS.
3. Pre určenie koncentrácie spór v pôvodnej suspenzii (bod č. 2) bolo desiatkovým riedením vytvorená sada riedení od 10^{-5} po 10^{-9} .
4. Z každého riedenia bolo odobratých 100 μ l suspenzie, ktorou bola zaočkovaná Petriho miska s MS agarom. Suspenzia bola rovnomerne rozotretá po celom povrchu misky. Misky boli kultivované pri 30 °C 72 h.
5. Po kultivácii vyberieme miskú s vhodným počtom kolónií (30-300) a určíme ich presný počet.
6. Na základe počtu kolónií a po zohľadnení použitého dilučného faktoru stanovíme koncentráciu východiskovej spórovej suspenzie.

7. Zásobná spórová suspenzia bola nariadená tak, aby obsahovala 10^8 spór/ml a bola skladovaná pri 4 °C.

Príprava buniek z línie THP-1

1. Bunky z línie THP-1 kultivujeme v kompletnom RPMI médiu s antibiotikami pri 37 °C a 5,7% CO₂.
2. Po kultivácii kultúru scentrifugujeme (1680 rpm, 5 min.). Po centrifugácii k peletu buniek pridáme 1 ml kompletného RPMI média bez antibiotík.
3. 50 µl suspenzie preniesieme do 950 µl Türkovho roztoku, zvortexujeme a spočítame bunky v Bürkerovej komôrke.
4. Na základe tejto informácie stanovíme celkový počet buniek v suspenzii a určíme taký objem suspenzie, v ktorom sa nachádza 10^6 buniek.

Test toxicity extraktov zo streptomycét pre bunky z línie THP-1

Nasledujúci experiment prebiehal v triplikátoch.

1. Jednotlivé extrakty v chloroforme boli prevedené do 600 µl DMSO.
2. Bunky z línie THP-1 scentrifugujeme (1680 rpm, 10 min.) a vzniknutý pelet rosuspendujeme v 1 ml kompletného RPMI média s antibiotikami.
3. Prostredníctvom Bürkerovej komôrky určíme počet buniek THP-1 vo vzniknutej suspenzii.
4. Na test toxicity použijeme 24 jamkovú sterilnú kultivačnú doštičku (TPP).
5. Do jednotlivých jamiek kultivačnej doštičky napipetujeme jednotlivé extrakty (viď Tab. 6), bunky z línie THP-1 (koncentrácia $1 \cdot 10^6$ buniek/ml) a doplníme na celkový objem 1 ml kompletným médiom RPMI s antibiotikami. Okrem tejto sady vzoriek, boli vytvorené aj vzorky, kde boli bunky z línie THP-1 aktivované bakteriálnym LPS. Postup na získanie týchto vzoriek bol rovnaký ako v predchádzajúcom prípade, avšak po pridaní extraktu zo streptomycét bol do jamiek TPP doštičky pridaný LPS v celkovej koncentrácii 1 µg na jamku. Ako kontrolné vzorky (K1-4) použijeme bunky z línie THP-1 v: médiu RPMI (K1), v médiu RPMI s prídavkom 5 µl DMSO + LPS (K2), v médiu RPMI s prídavkom 5 µl extraktu z média GYM (čisté médium bez streptomycét) (K3), 5 µl extraktu z média GYM + LPS (K4).

Tab. 6 Množstvá použitých extraktov streptomycét z troch odlišných kultivácií na určenie toxicity pre bunky z línie THP-1. (10x = extrakt zo streptomycét 10x riedený v DMSO, 100x = extrakt zo streptomycét 100x riedený v DMSO. Použité riedenia boli zvolené na základe predošlých pilotných štúdií).

Kultivácia v médiu GYM		Kultivácia v médiu RPMI		Kultivácia s bunkami THP-1	
Riedenie	Extrakt (μl)	Riedenie	Extrakt (μl)	Riedenie	Extrakt (μl)
1:5 000	10 (10x)	1:500	10	1:500	10
1:10 000	5 (10x)	1:1 000	5	1:1 000	5
1:50 000	1 (10x)	1:5 000	1	1:5 000	1
1:10 0000	5 (100x)	1:10 000	5 (10x)	1:10 000	5 (10x)
1:50 0000	1 (100x)	1:50 000	1 (10x)	1:50 000	1 (10x)

- Kultivačnú doštičku inkubujeme v termostate pri 37 °C a 5,7 % CO₂ po dobu 24 h.
- Po uplynutí doby inkubácie preniesieme suspenzie z jednotlivých jamiek do mikroskúmaviek. Scentrifugujeme (1680 rpm, 10 min.), supernatanty uschováme pre ďalšie experimenty. Vzniknuté pelety buniek rosuspendujeme v reziduálnom objeme média.
- K 5 μl suspenzie buniek pridáme 5 μl trypanovej modrej. Pod mikroskopom pozorujeme viabilitu buniek a určíme mieru toxicity jednotlivých riedení extraktov na tieto bunky.
- Pre ďalšie experimenty vyberáme 3 koncentrácie extraktov, kde: (i) začína stúpať životnosť buniek, (ii) prežívanie buniek je na úrovni zhruba 40-70%, (iii) sa neprejavuje toxický efekt na bunky z línie THP-1.

Kvantitatívna detekcia ľudského IL-1β prostredníctvom ELISA kitu (Human IL-1beta Uncoated ELISA Kit, Invitrogen)

- Coating Buffer nariedime v dH₂O v pomere 1:10.
- Do 96 jamkovej ELISA doštičky napipetujeme po 100 μl Capture Antibody, ktorá bola nariedená v Coating Buffer v pomere 1:250. Doštičku prikryjeme a inkubujeme cez noc pri 4 °C.
- Pripravíme si premývací roztok (100 ml 10x PBS, 900 ml dH₂O, 0,05% Tween-20). Po inkubácii týmto roztokom premývame doštičku 3x (250 μl/jamka). Medzi premývaniami inkubujeme doštičku 1 min. (tento roztok a podmienky premývania používame počas celého ELISA testu – vid' body: 6, 10, 12, 14).
- Po premývaní pridáme do jamiek po 200 μl ELISA/ELISASPOT Diluent (nariedený v dH₂O 1:5, ďalej len diluent). Inkubujeme pri izbovej teplote 1 hod.

5. Pripravíme štandard na vytvorenie kalibračnej krivky. Do vialky s ľudským IL-1 β pridáme 1 ml dH₂O, zvertexujeme a inkubujeme aspoň 10 min. pri izbovej teplote.
6. Z doštičky odstránime diluent a premyjeme 1x.
7. Dvojkovým riedením štandardu (bod 5) vytvoríme kalibračnú krivku s 8 bodmi. Do jamiek na doštičke pridáme 100 μ l diluentu, pričom prvé jamky necháme prázdne. Do prvých prázdnych jamiek A1/A2 pridáme po 200 μ l štandardu (bod 5). Z jamiek A1/A2 prenosieme po 100 μ l do jamiek B1 / B2. Obsah jamiek B1 a B2 premiešame opakovaným vtiahnutím do pipety. Z týchto jamiek prenosieme 100 μ l do jamiek C1/C2. Tento postup zopakujeme ešte 5x.
8. Vzorky, v ktorých chceme detekovať IL-1 β nariedime 10x v diluente. Premiešame, a pipetujeme 100 μ l vzorky na jamku (pracujeme v duplikátoch). Ako negatívnu kontrolu použijeme jeden rad jamiek, do ktorých napipetujeme 100 μ l diluentu.
9. Doštičku prikryjeme a inkubujeme pri 4 °C cez noc.
10. Po inkubácii vzorky z doštičky odstránime a premyvame 4x. Medzitým si pripravíme Detection Antibody (nariedime v diluente v pomere 1:250).
11. Do všetkých jamiek pridáme po 100 μ l nariedenej Detection Antibody. Doštičku prikryjeme a inkubujeme pri izbovej teplote 1 hod.
12. Po inkubácii Detection Antibody odstránime a doštičku premyjeme 4x.
13. V diluente nariedime Avidin-HRP (1:250), z ktorého pridáme do každej jamky 100 μ l. Doštičku prikryjeme a inkubujeme 30 min. pri izbovej teplote.
14. Avidin-HRP odstránime a doštičku premyjeme 6x.
15. Do jamiek pridáme 100 μ l roztoku TMB. Inkubujeme v tme, 10 min. pri izbovej teplote.
16. Po inkubácii do jamiek pridáme po 50 μ l stop roztoku (0,5M H₂SO₄).
17. Doštičku vyhodnocujeme na spektrofotometri pre ELISA testy pri vlnovej dĺžke 450 nm.

7 Vypracovanie a výsledky

7.1 Identifikácia kmeňa TR42 ako producenta filipínu

Na základe *in silico* analýzy genómových dát kmeňa TR42 (E. CORRETO, osobné zdelenie) v programe AntiSMASH (vyhľadávač génových zhlukov pre sekundárne metabolity, dostupné tu: <https://antismash.secondarymetabolites.org>) bolo zistené, že analyzovaný genóm obsahuje celkovo 43 klastrov, pričom 9 z nich vykazuje vysokú podobnosť (nad 70%) so známymi klastrami uloženými v databáze (viď Tab. 6). Medzi uvedenými génovými zhlukmi sa nachádza aj filipínový klaster génov vykazujúci 100% zhodu s databázou. Vysoký počet génových zhlukov v genóme TR42 však nemožno považovať za smerodajný, nakoľko genóm TR42 nie je doposiaľ kompletne zostavený a nachádza sa len v štádiu tzv. kontigov (8 507 620 bp v 171 kontigách).

Tab. 6 Látky potenciálne kódované klastrami v genóme TR42, ktoré vykazujú najvyššiu sekvenčnú podobnosť so známymi klastrami v databáze (tabuľka vytvorená na základe analýzy genómu TR42 v programe AntiSMASH).

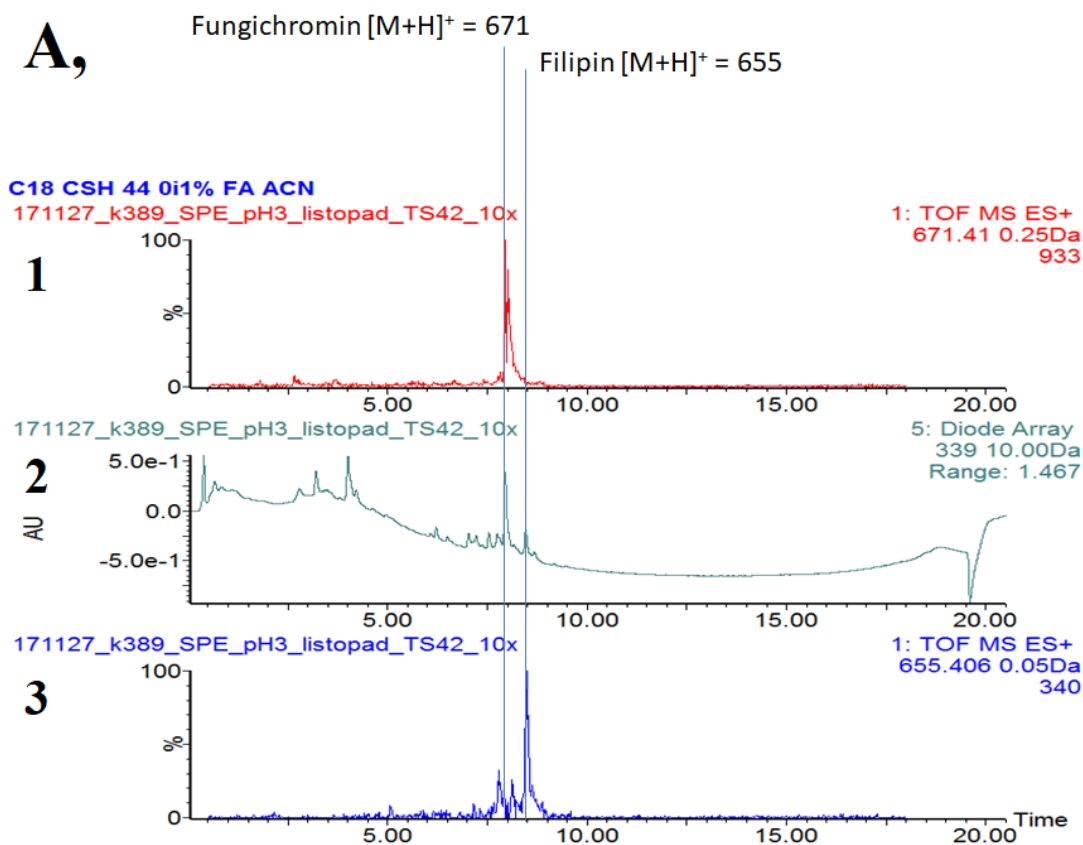
Produkováaná látka	Sekvenčná podobnosť (v %)
Filipín	100
Aktinomycín	89
2-metylisoborneol	100
Hopén	92
Spórový pigment	83
Melanín	100
Mirubaktín	78
Ektoín	100
Albaflavenón	100

Predikovaná produkcia filipínu programom AntiSMASH bola najskôr overená testom na štandardnom krvnom agare, nakoľko sa filipín radí k látkam s hemolytickou aktivitou. Po acetón-etylacetátovej extrakcii nepolárnych látok z kmeňa TR42 po štandardnej kultivácii v médiu GYM (viď kap. 6.2.5.1) bolo 10 µl z extraktu v chloroforme kvapnutých na krvný agar. Po inkubácii (24 hod., 37 °C) sme na agare pozorovali vznik β-hemolytickej zóny (Obr. 10).

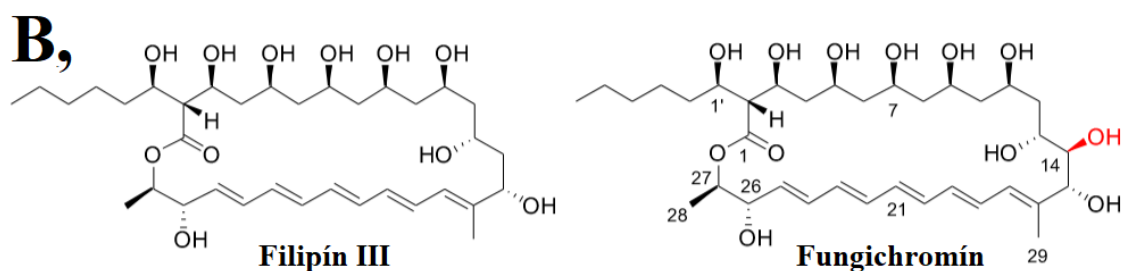


Obr. 10 Potvrdenie prítomnosti hemolyzínov v extrakte nepolárnych látok z kmeňa TR42. Test bol uskutočnený kvapnutím 10 µl extraktu v chloroforme na štandardný krvný agar. Ako kontrolu sme použili 10 µl chloroformu.

Prítomnosť filipínu v extrakte nepolárnych látok z kmeňa TR42 po štandardnej kultivácii v médiu GYM bola definitívne potvrdená prostredníctvom ultra-vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s MS detektorom (Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Time-of-Flight Mass spectroscopy detector, ďalej len UHPLC-ToF-MS, vid' kap. 6.2.5.2). UHPLC-ToF-MS potvrdila, že v extrakte sa okrem filipínu nachádza aj ďalšia látka radená medzi polyénové antibiotiká-fungichromín (Obr. 11).



Popis obrázka je na ďalšej strane.



Obr. 11 A1, a A3, – extrahované iónové chromatogramy z UHPLC-DAD-ToF MS analýzy extraktu nepolárnych látok z kmeňa TR42. Meranie bolo uskutočňované v pozitívnom ESI móde. A1 – os X – retenčný čas (t_R), os Y – intenzita detekcie látky (v %) o monoizotopickej hmote 670,410 Da, čo zodpovedá fungichromínu $C_{35}H_{58}O_{12}$ (pseudomolekulový ión $C_{35}H_{59}O_{12}^+$, m/z hodnota: 671,410). V $t_R=8,045$ min. je možné pozorovať pík pre fungichromín. A3 – os X – retenčný čas (t_R), os Y – intenzita detekcie látky (v %) o monoizotopickej hmote 654,406 Da, čo zodpovedá filipínu $C_{35}H_{58}O_{11}$ (pseudomolekulový ión $C_{35}H_{59}O_{11}^+$, m/z hodnota: 655,406). V $t_R=8,52$ min. je možné pozorovať pík pre filipín. A2 – chromatogram z merania absorbancie látok pri 339 nm svedčí o prítomnosti 5 konjugovaných väzieb, čo zodpovedá filipínu a fungichromínu (merané a vyhodnocované Ing. Matoušom Čihákem). B, chemická štruktúra filipínu III a fungichromínu (prebrané a upravené od ZHOU a kol., 2019).

Na zistenie toho, či je filipín jedinou hemolytickou látkou produkovanou baktériami kmeňa TR42 a či sa na β hemolyze podieľajú ďalšie faktory typu proteínových hemolyzínov bola navrhnutá dizrupcia filipínového klastru génov, pričom sme sledovali vplyv tejto dizrupcie na hemolytickú aktivitu daného kmeňa.

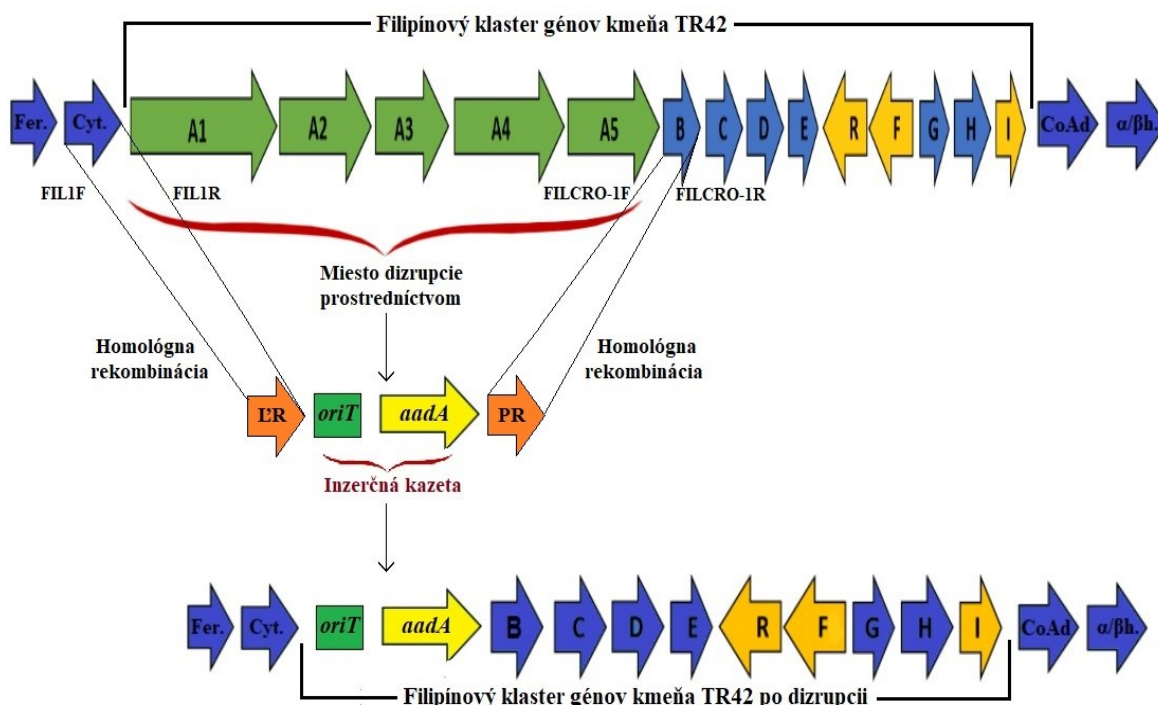
7.2 Dizrupcia filipínového klastru génov kmeňa TR42

Dizrupcia určitého klastru génov spočíva v integrácii inzerčnej kazety do jedného alebo viacerých génov nachádzajúcich sa v danom génovom zhľuku. Inzerčná kazeta je spravidla súčasťou plazmidového konštruktú, ktorý je vytvorený klonovacími metódami. Filipínový klastor kmeňa TR42 obsahuje 14 génov, z toho 5 génov pre polyketid syntázy (Tab. 7). Dizrupcia bola zameraná práve na odstránenie všetkých 5 génov pre polyketid syntázy (PKS) z génového zhľuku.

Na dizrupciu kompletného úseku, ktorý kóduje 5 PKS I génov z filipínového klastru sme využili homológnu rekombináciu. Vytvorili sme inzerčnú kazetu, ktorá nesie gén kódujúci rezistenciu k spektinomycínu *aadA* a *oriT* miesto dôležité pre konjugačný prenos celého dizrupčného konštruktú do kmeňa TR42. Pre integráciu do chromozómu v správnom mieste, a teda aby bol nahradený úsek kódujúci PKS I gény, sme inzerčnú kazetu spojili na ľavej strane s 1,1 kbp dlhým úsekom nachádzajúcim sa na chromozóme TR42 pred génom A1 a na pravej strane s 1,3 kbp dlhým fragmentom homológny k oblasti za A5 génom (Obr. 12).

Tab. 7 Filipínový klastér génov z kmeňa TR42. Tabuľka obsahuje označenie génov a ich funkciu.

Označenie génov filipínového klastru	Funkcia génu
A1	Modulárna polyketid syntáza
A2	Modulárna polyketid syntáza
A3	Modulárna polyketid syntáza
A4	Modulárna polyketid syntáza
A5	Modulárna polyketid syntáza
B	Crotonyl-CoA reduktáza
C	Cytochróm P450
D	Cytochróm P450
E	Feredoxín
R	Transkripčný regulátor, SARP rodina
F	Transkripčný regulátor, PAS-LuxR
G	Oxidoreduktáza
H	Tioesteráza
I	Transkripčný regulátor, PadR rodina



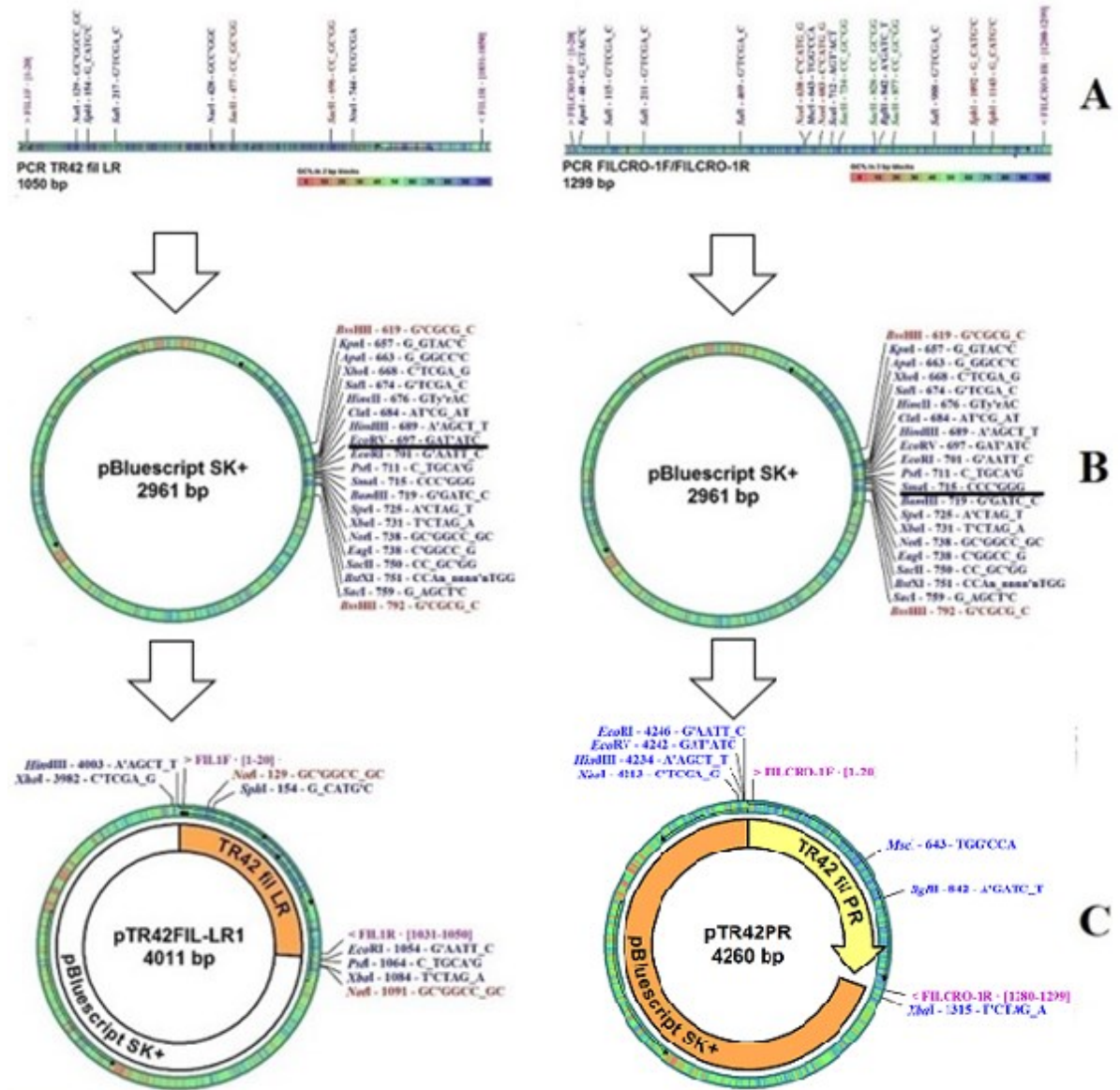
Obr. 12 Schematické znázornenie integrácie inzerčnej kazety do filipínového klastru génov kmeňa TR42 a jeho konečná podoba po dizrupcii (Fer. – feredoxín, Cyt. – cytochróm P450, CoAd. – acyl-CoA dehydrogenáza, α/βh. – alfa/beta hydroláza, ER – ľavé rameno, *oriT* – replikačný počiatok dôležitý pre konjugáciu, *aadA* – gén rezistencie na spektiomycín, PR – pravé rameno. FIL1F a FIL1R – primery použité na amplifikáciu ľavého ramena, FILCRO-1F a FILCRO-1R – primery použité na amplifikáciu pravého ramena. Označenie a funkcia génov filipínového klastru – vid' Tab. 7.

Požadovaný konštrukt s inzerčnou kazetou bol získaný klonovacími metódami. Klonovanie prebiehalo v bunkách *E. coli* SURE, z ktorých bol finálny konštrukt prenesený do buniek *E. coli* ET12567/pUZ8002. Z týchto buniek sme konštrukt preniesli do streptomycét prostredníctvom konjugácie. Postup a jednotlivé klonovacie kroky vedúce k získaniu finálneho plazmidového konštraktu s inzerčnou kazetou sú uvedené v kap. 7.2.1-7.2.4.

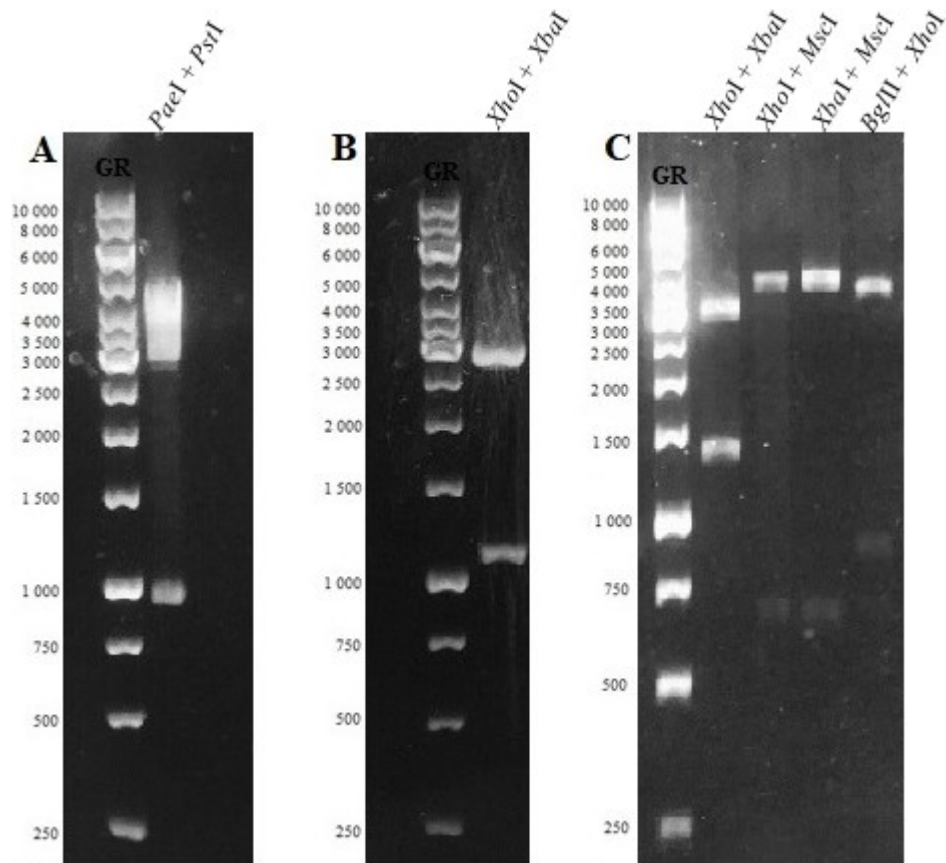
7.2.1 Amplifikácia pravého a ľavého ramena a ich vloženie do plazmidu

Na získanie pravého a ľavého ramena, ktoré sú dôležité pre homológnu rekombináciu a správne vloženie inzerčnej kazety sme navrhli dve dvojice primerov. Dvojica FIL1R-FIL1F na amplifikáciu LR (očakávaná veľkosť fragmentu: 1050 bp) a FILCRO-1F-FILCRO-1R na amplifikáciu PR (očakávaná veľkosť fragmentu: 1299 bp) (Obr. 13A). Amplifikácia prebehla prostredníctvom PCR (viď kap. 6.2.3), kedy bola ako DNA templát použitá izolovaná genomická DNA divokého kmeňa TR42 (viď kap. 6.2.1). Produkty PCR reakcie sme naniesli na gélovú elektroforézu (po 20 μ l) a požadované fragmenty sme izolovali metódou GLASSMILK (viď kap. 6.2.1). Ako vektor na vloženie fragmentov sme použili plazmid pBluescript SK+ (2961 bp) (Obr. 13B). Fragmenty boli vkladane samostatne podľa protokolu „klonovanie natupo“ (viď kap. 6.2.2). Vektor, do ktorého sme vložili LR bol naštiepený prostredníctvom RE *EcoRV* (1 μ l vektoru štiepeného v celkovom objeme 10 μ l, 2 hod., 37 °C). PR bolo vložené do vektoru štiepeného *SmaI* (1 μ l vektoru štiepeného v celkovom objeme 10 μ l, 2 hod., 25 °C). Ligácia prebiehala cez noc pri teplote 22 °C (viď kap. 6.2.2). Po ligácii boli vzniknuté konštrukty prenesené prostredníctvom elektroporácie do buniek *E. coli* SURE (viď kap. 6.2.4). Bunky sme vysiali na misky s LB médiom, ktoré obsahovalo ampicilín, IPTG a X-gal. Inkubácia prebiehala cez noc pri 37 °C. Prítomnosť X-gal a IPTG umožňuje tzv. modro/bielu selekciu na neprítomnosť/prítomnosť vloženého fragmentu. Na základe tejto skutočnosti boli z misiek izolované len biele kolónie. Tieto kolónie boli zaočkované do 2 ml LB média s ampicilínom a inkubované na rotačnej trepačke cez noc pri 37°C. Následne bola z jednotlivých kolónií izolovaná plazmidová DNA (viď kap. 6.2.1), ktorá bola podrobená restriktívnej analýze na overenie prítomnosti vkladaneho fragmentu. Prostredníctvom restriktívnej analýzy bola taktiež potvrdená správna orientácia vložených fragmentov, ktorá musí byť v smere hodinových ručičiek (z ľava do prava). Konštrukt s LR bol nazvaný ako pTR42FIL-LR s veľkosťou 4011 bp (Obr. 13C vľavo). Na restriktívnu analýzu boli použité nasledovné RE: *PaeI* + *PstI* (veľkosť vzniknutých

fragmentov: 3101 bp, 910 bp, Obr. 14A) a *XhoI* + *XbaI* (2898 bp, 1113 bp, Obr. 14B). Konštrukt s PR bol nazvaný pTR42PR s veľkosťou 4260 bp (Obr. 13C vpravo) Na jeho restriktčnú analýzu boli použité RE: *XhoI* + *XbaI* (2898 bp, 1362 bp), *XhoI* + *MscI* (3570 bp, 690 bp), *XbaI* + *MscI* (3588 bp, 672 bp), *XhoI* + *BglII* (3371 bp, 889 bp) (obr. 14C).



Obr. 13 Postup klonovania na získanie konštraktu pTR42filLR (vľavo) a pTR42PR (vpravo). A: očakávané PCR produkty, B: klonovací vektor pBluescript SK+ s vyznačenou RE, ktorá bola použitá na vloženie fragmentu z PCR, C: požadované konštruktory

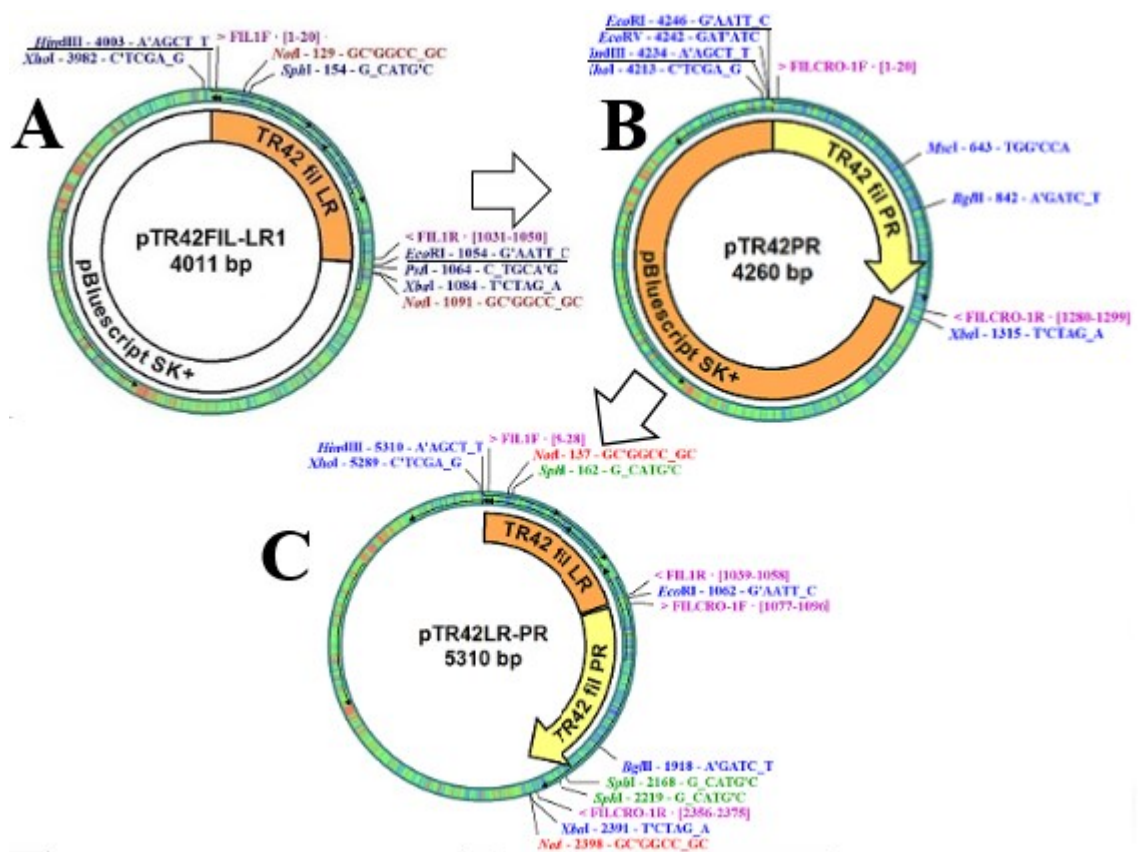


Obr. 14 Restričková analýza pTR42FIL-LR (A a B) a pTR42PR (C). V jednotlivých dráhach sú uvedené použité RE. Čísla na krajoch uvádzajú veľkosti fragmentov na základe použitého DNA veľkostného štandardu (označený ako GR – Gene Ruler, viď kap. 6.1.5).

7.2.2 Spojenie pravého a ľavého ramena

Ďalším krokom klonovania bolo spojenie pravého a ľavého ramena do jedného konštruktu. V tomto prípade sme ako klonovací vektor použili pTR42PR. 5 μ l pTR42PR bolo štiepených v celkovom objeme 20 μ l dvojicou RE: *EcoRI* a *HindIII* (2 hod., 37 °C) (Obr. 15B). Z pTR42FIL-LR bolo LR vyštiepené rovnakou dvojicou enzýmov (Obr. 15A), čím bolo možné využiť pri klonovaní vzniknuté kohezívne konce. 10 μ l pTR42FIL-LR bolo štiepených v objeme 25 μ l. Po štiepení sme túto zmes naniesli na elektroforetický gél. Vzniknutý fragment s veľkosťou 1050 bp sme z gélu izolovali metódou GLASSMILK. Fragment sme eluovali do 50 μ l dH₂O a spojili s vektorom, ktorý bol predtým defosforylovaný FastAP alkalickou fosfatázou. Po fenol-chloroformovej extrakcii a prezrážaní etanolom bol fragment ľavého ramena vložený do pTR42PR prostredníctvom T4 DNA ligázy (viď kap. 6.2.2). Pri štiepení vektora nami zvolenými RE došlo v mieste vkladania fragmentu k vyštiepeniu krátkej, 12 bázových párov dlhej sekvencie, ktorá

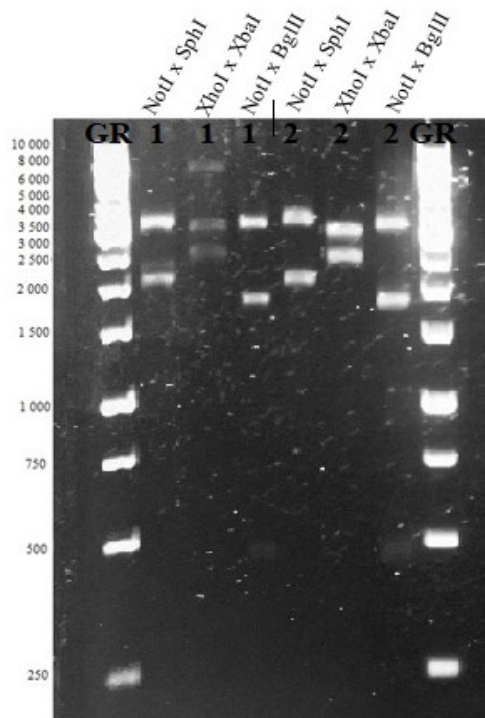
obsahuje rozpoznávacie miesto pre RE *EcoRV*. Túto skutočnosť sme využili na dodatočné štiepenie po ligácii, kedy štiepením *EcoRV* (1 hod., 37°C) došlo k eliminácii prázdnych vektorov. Po tomto štiepení sme ligázu inaktivovali inkubáciou 10 min. pri teplote 75 °C. Po prezrážaní etanolom boli vzniknutým konštruktom transformované bunky *E. coli* SURE, ktoré sme po transformácii vysiali na misky s LB médiom obsahujúcim ampilicín (inkubácia cez noc, 37 °C). Z narastených kolónií bola následne izolovaná plazmidová DNA. Vzniknutý konštrukt s veľkosťou 5310 bp dostal označenie pTR42LR-PR (Obr. 15C) a bol podrobený restriktčnej analýze na potvrdenie prítomnosti LR a jeho správnej orientácie v konštrukte (zľava doprava). Na definitívne určenie orientácie boli ramená osekvenované, pričom sekvenácia potvrdila ich správnu orientáciu.



Obr. 15: Spojenie pravého a ľavého ramena do jedného konštruktu pTR42LR-PR. Podčiarknuté sú RE využité pri klonovaní.

Restriktčná analýza pTR42LR-PR (čísla uvádzajú veľkosť očakávaných fragmentov, Obr. 16):

- *Not*I + *Sph*I: 25 bp, 51 bp, 179 bp, 2006 bp, 3049 bp
- *Xho*I + *Xba*I: 2412 bp, 2898 bp
- *Not*I + *Bgl*II: 480 bp, 1781 bp, 3049 bp

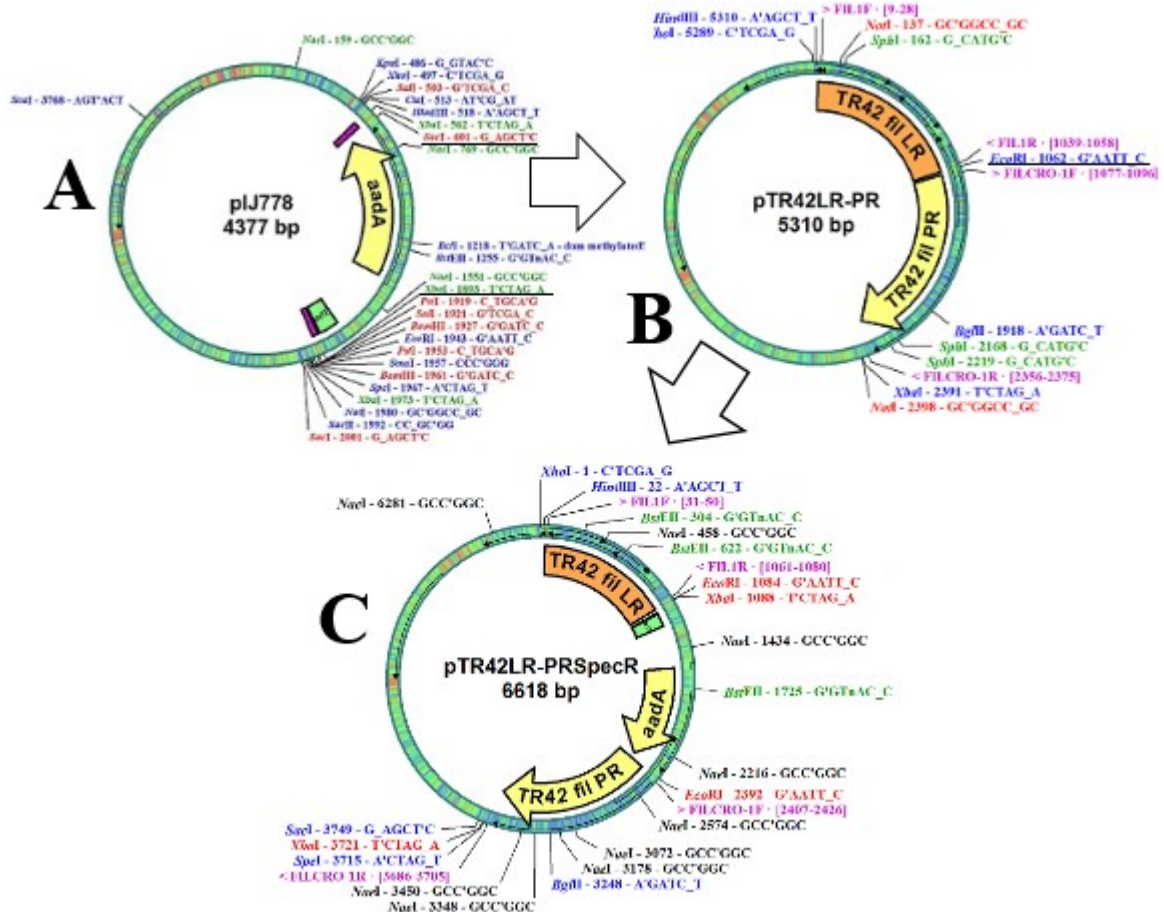


Obr. 16 Restričná analýza pTR42LR-PR izolovaného z dvoch klonov (klony sú označené ako 1 a 2). V jednotlivých dráhach sú uvedené použité RE. Čísla na kraji uvádzajú veľkosti fragmentov na základe použitého DNA veľkostného štandardu (označený ako GR – Gene Ruller).

7.2.3 Vloženie inzerčnej kazety do pTR42LR-PR

Použitá inzerčná kazeta obsahuje gén rezistencie na spektinomycín *aadA* a *oriT* miesto dôležité pre konjugačný prenos z *E. coli* do streptomycét. Získaná bola z plazmidu pIJ778 restričným štiepením prostredníctvom *SacI* a *XbaI* (Obr. 17A). Štiepených bolo 20 μl pIJ778 v celkovom objeme 50 μl (2 hod., 37 °C). Po štiepení sme túto zmes naniesli na gélovú elektroforézu a požadovaný fragment s veľkosťou 1292 bp sme z gélu izolovali metódou GLASSMILK. Fragment bol eluovaný do 17 μl dH₂O a zatupený prostredníctvom Klenowho fragmentu (viď kap. 6.2.2). Ako klonovací vektor na vloženie inzerčnej kazety sme použili pTR42LR-PR (Obr. 17B). Vektor (5 μl) bol štiepený v celkovom objeme 20 μl RE *EcoRI* (2 hod., 37 °C). Podobne ako v prípade fragmentu bol aj vektor po štiepení zatupený Klenovým fragmentom, čím bolo možné pokračovať v klonovaní „natupo“. Po zatupení sme vektor extrahovali fenol-chloroformom a prezrážali etanolom. Vzniknutý pelet bol rozpustený v 17 μl dH₂O, kde bola pridaná FastAP alkalická fosfatáza na defosforyláciu vektora. Po tepelnej inaktivácii FastAP alkalickéj fosfatázy sme vektor spojili s fragmentom. Vzniknutá zmes bola extrahovaná fenol-chloroformom, prezrážaná etanolom a ligovaná cez noc prostredníctvom T4 DNA ligázy. Po inkubácii sme ligovanú DNA prezrážali etanolom

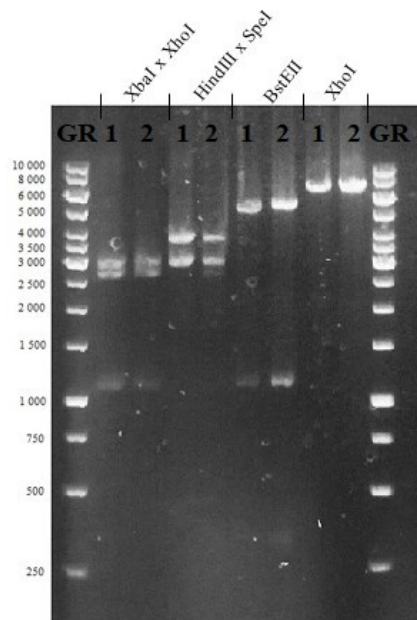
a k vzniknutému peletu sme pridali 50 μ l elektrokompetentných buniek *E. coli* SURE, ktoré sme prostredníctvom elektroporátora transformovali vzniknutým konštruktom. Bunky boli vysiate na misky s LB médiom, ampicilínom a spektinomycínom (inkubácia cez noc, 37 °C). Zo vzniknutých kolónií sme izolovali plazmidovú DNA, ktorú sme podrobili restriktívnej analýze na overenie, či došlo k vloženiu inzerčnej kazety do konštruktu. Orientácia inzerčnej kazety nebola v tomto prípade podstatná, dôležité bolo jej umiestnenie medzi pravé a ľavé rameno v konštrukte, ktorý dostal označenie pTR42LR-PRSpecR (Obr. 17C).



Obr. 17 Vloženie inzerčnej kazety z pIJ778 do pTR42LR-PR za vzniku pTR42LR-PRSpecR. Podčiarknuté sú RE použité pri klonovaní.

Restriktívna analýza pTR42LR-PRSpecR (čísla uvádzajú veľkosť očakávaných fragmentov) (Obr. 18):

- *XbaI* + *XhoI*: 1088 bp, 2633 bp, 2897 bp
- *HindIII* + *SpeI*: 2925 bp, 3693 bp
- *BstEII*: 318 bp, 1103 bp, 5197 bp
- *XhoI*: 6618 bp (linearizácia plazmidu)



Obr. 18 Restrikčná analýza pTR42LR-PRcroSpecR izolovaného z dvoch klonov (znázornené ako 1 a 2). V jednotlivých dráhach sú uvedené použité RE. Čísla na kraji uvádzajú veľkosti fragmentov na základe použitého DNA veľkostného štandardu (označený ako GR – Gene Ruller)

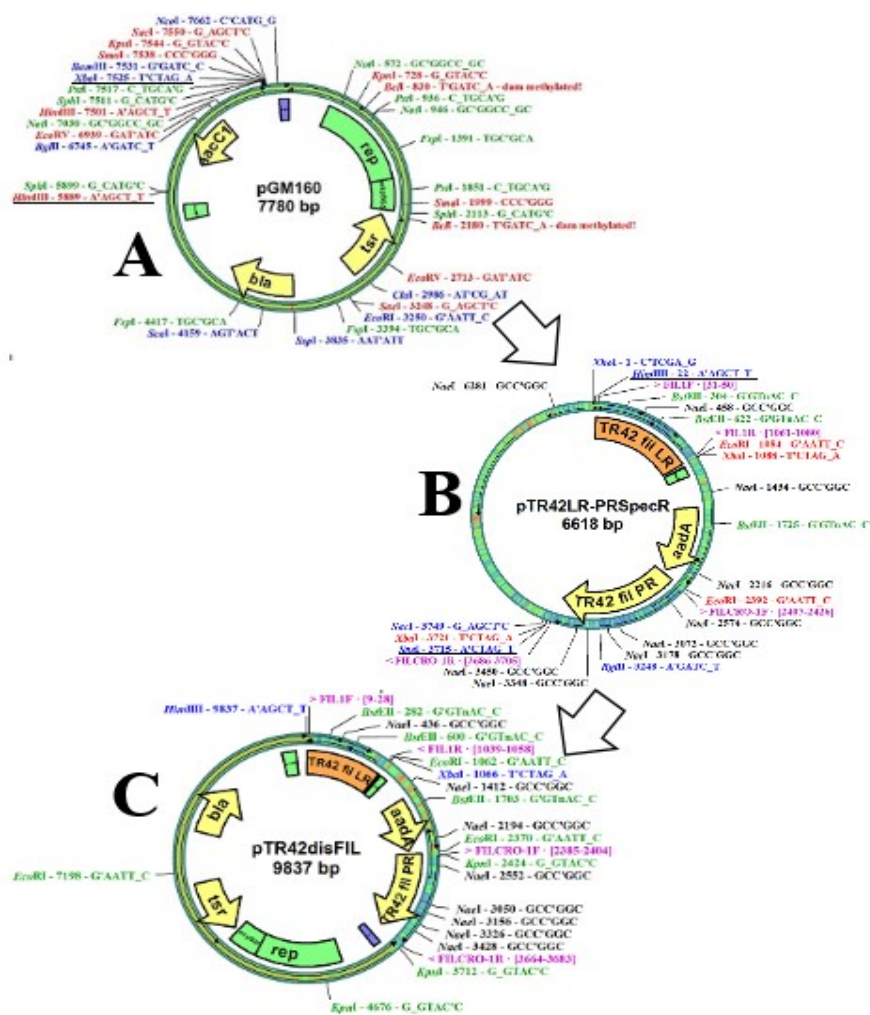
7.2.4 Vytvorenie finálneho konštruktú

Finálny konštrukt potrebný pre dizrupciu bol vytvorený spojením dvoch fragmentov: fragment *HindIII* + *SpeI* z pTR42LR-PRSpecR (Obr. 19B) a fragment *HindIII* + *XbaI* z pGM160 (Obr. 19A). Plazmid pGM160 je vysokokópiový a patrí medzi tzv. shuttle vektory. Výhodou shuttle vektorov je ich stabilná replikácia a prenos medzi dvomi bakteriálnymi druhmi. So shuttle vektormi je teda možné manipulovať v jednoduchších, rýchlo rastúcich systémoch, napr. v *E. coli*, a následne ich preniesť do zložitejších, pomalšie rastúcich buniek (v našom prípade do streptomycét). Ďalšou výhodou plazmidu pGM160 je jeho termosenzitívna replikácia v streptomycétach, čo je možné využiť na vytvorenie selekčného tlaku na integráciu inzerčnej kazety do chromozómu.

20 μ l pTR42LR-PRSpecR bolo štiepených v 50 μ l dvojicou RE *HindIII* a *SpeI* (2 hod, 37 °C.). Táto zmes bola nanosená na gélovú elektroforézu, z ktorej bol metódou GLASSMILK izolovaný požadovaný fragment s veľkosťou 3693 bp. Fragment bol eluovaný do 20 μ l dH₂O. Podobným spôsobom sme postupovali aj v prípade získania fragmentu z pGM160. 20 μ l pGM160 bolo štiepených v 50 μ l RE *XbaI* a *HindIII* (2 hod., 37 °C). Zmes sme naniesli na gélovú elektroforézu a metódou GLASSMILK sme izolovali fragment s veľkosťou 6144 bp. Fragment sme eluovali do 17 μ l dH₂O, kde bola kvôli defosforylácii pridaná FastAP alkalická fosfatáza. Dvojice restrikčných endonukleáz

boli zvolené tak, aby vzniknuté kohezívne konce oboch fragmentov boli komplementárne, čím sa zvýšila pravdepodobnosť vytvorenia požadovaného konštrukt (klonovanie cez kohezívne konce ja spravidla účinnejšie ako tzv. klonovanie „natupo“).

Po defosforylácii fragmentu z pGM160 a tepelnej inaktivácii FastAP alkalickéj fosfatázy boli oba fragmenty spojené dohromady. Vzniknutá zmes bola extrahovaná fenolchloroformom, prezrážaná etanolom a ligovaná cez noc prostredníctvom T4 DNA ligázy. Po ligácii bola zmes prezrážaná etanolom a k vzniknutému peletu DNA bolo pridaných 50 µl elektrokompetentných buniek *E. coli* SURE, ktoré boli transformované vzniknutým konštruktom prostredníctvom elektroporátora. Bunky sme vysiali na misky s LB médiom, tiosreptónom a spektinomycínom (inkubácia cez noc, 37 °C). Po inkubácii bola z kolónií izolovaná plazmidová DNA, ktorá bola podrobená restriktívnej analýze na potvrdenie prítomnosti finálneho konštrukt. Tento konštrukt s veľkosťou 9837 bp dostal označenie pTR42disFIL (Obr. 19C).

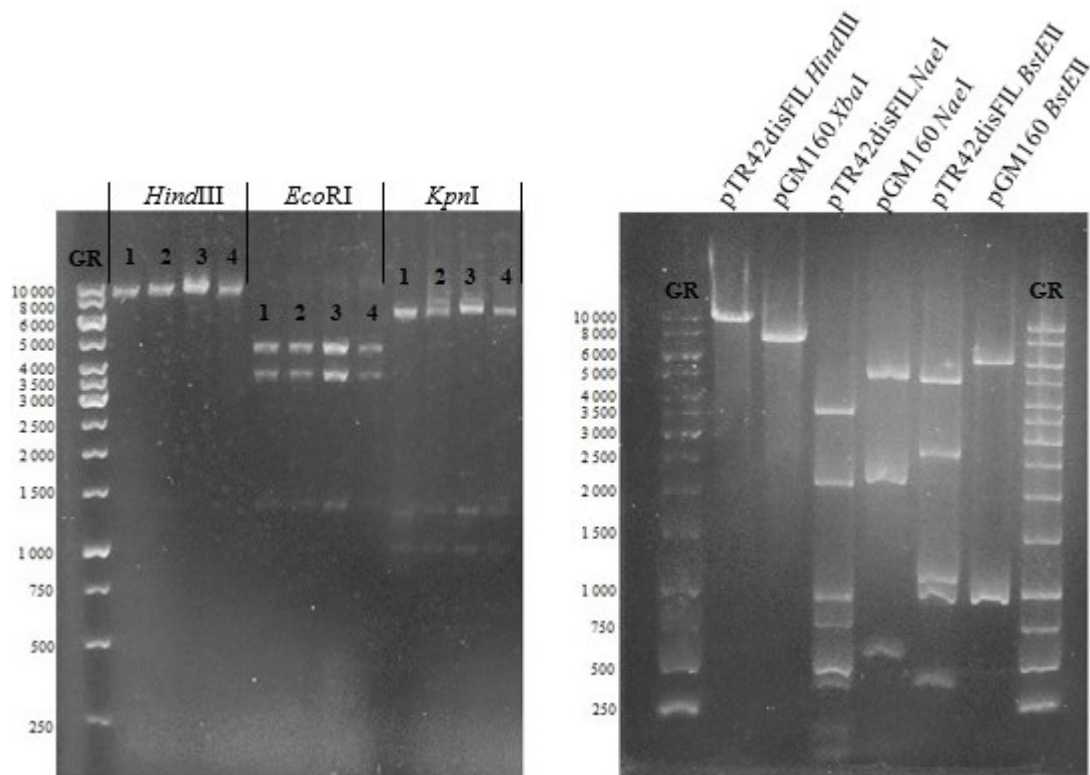


Obr. 19 Vytvorenie finálneho konštrukt pTR42disFIL (C), ktorý vznikol spojením dvoch fragmentov: fragmentu *HindIII* + *SpeI* z pTR42LR-PRSpecR (B) a fragmentu *HindIII* + *XbaI* z pGM160 (A). RE použité pri klonovaní sú podčiarknuté.

Restrikčná analýza pTR42disFIL (čísla uvádzajú veľkosť očakávaných fragmentov, Obr. 20)

- *Hind*III: 9837 bp (linearizácia plazmidu)
- *Eco*RI: 1308 bp, 3701 bp, 4828 bp
- *Kpn*I: 964 bp, 1288 bp, 7585 bp

Okrem uvedených RE bol pTR42disFIL štiepený aj RE *Bst*EII a *Nae*I. Veľkosť a počet fragmentov vzniknutých pri štiepení týmito RE sa nezhoduje s restrikčnou mapou pTR42disFIL, nakoľko fragment z pGM160 nie je kompletne osekvenovaný. Z tohto dôvodu sme porovnávali štiepny profil pGM160 a pTR42disFIL po štiepení týmito RE (Obr. 20 vpravo). Týmito štiepeniami sme dokázali prítomnosť fragmentu pTR42LR-PRSpecR vo finálnom konštrukte. Na linearizáciu plazmidu pGM160 sme použili *Xba*I. Porovnávacia analýza potvrdila správnosť finálneho konštruktu.



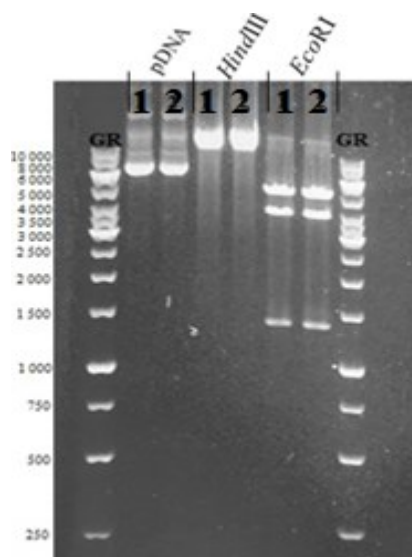
Obr. 20 Vľavo – restrikčná analýza pTR42disFIL izolovaného zo 4 klonov (označené číslami). Vpravo sa nachádza porovnanie štiepneho profilu pTR42disFIL a pGM160 na overenie prítomnosti inzerčnej kazety. V jednotlivých dráhach sú uvedené použité RE. Čísla na kraji uvádzajú veľkosti fragmentov na základe použitého DNA veľkostného štandardu (označený ako GR – Gene Ruller).

7.3 Transformácia buniek *E. coli* ET12567/pUZ8002 s pTR42disFIL a konjugáčny prenos konštrukt do kmeňa TR42

V medzidruhovej konjugácii sa na prenos plazmidového konštrukt používa kmeň *E. coli* ET12567/pUZ8002. Streptomycéty majú restričný systém pre metylovanú DNA. Bežné kmene *E. coli* majú DNA metylovanú prostredníctvom metyláz Dam a Dcm na adeníne a cytozíne. Z tohto dôvodu je pri konjugácii nutné použiť kmeň, ktorý je v metylácii DNA deficientný. Medzi takéto kmene patrí aj kmeň *E. coli* ET12567/pUZ8002.

Kmeň *E. coli* ET12567 je rezistentný na chloramfenikol a tetracyklín. Okrem toho obsahuje plazmid pUZ8002, ktorý nesie rezistenciu na kanamycín. Tento plazmid taktiež kóduje *in trans* ostatné konjugatívne funkcie dôležité pre správny priebeh konjugácie, nakoľko náš konštrukt nesie len *oriT*. Plazmid pUZ8002 má mutáciu práve v *oriT* mieste, v dôsledku čoho síce umožňuje prenos požadovaného konštrukt do streptomycét, ale sám sa pri konjugácii prenáša s tisíckrát menšou účinnosťou ako plazmid RK2, z ktorého je odvodený.

Bunky *E. coli* ET12567/pUZ8002 boli transformované prostredníctvom elektroporácie. K 50 µl suspenzie buniek sme pridali 2 µl pTR42disFIL, ktorý bol izolovaný z buniek *E. coli* SURE. Po elektroporácii boli bunky vysiate na LB médium s chloramfenikolom, kanamycínom a spektinomycínom (inkubácia cez noc, 37 °C). Zo vzniknutých kolónií bola izolovaná plazmidová DNA, ktorú sme podrobili restričnej analýze (Obr. 21).



Obr. 21: Restričná analýza pTR42disFIL izolovaného z dvoch klonov *E. coli* ET12567 (označené číslami). V prvých dvoch dráhach je nanosená neštiepená plazmidová DNA. Veľkosť fragmentu pri štiepení *Hind*III: 9837 bp (linearizácia), *Eco*RI: 1308 bp, 3701 bp, 4828 bp. Čísla na kraji uvádzajú veľkosti fragmentov na základe použitého DNA veľkostného štandardu (označený ako GR – Gene Ruller).

Prenos plazmidového konštruktu do streptomycét prebiehal štandardnou konjugáciou (vid' kap. 6.2.4). Celkovo bolo izolovaných 5 kolónií streptomycét, ktoré sme preočkovali na misky s MS médiom, spektinomycínom a kys. nalidixovou (inkubácia 5 dní, 30 °C). Kys. nalidixová bola do média pridaná na úplné odstránenie reziduálnych buniek *E. coli*. Streptomycéty sú na ňu prirodzene rezistentné.

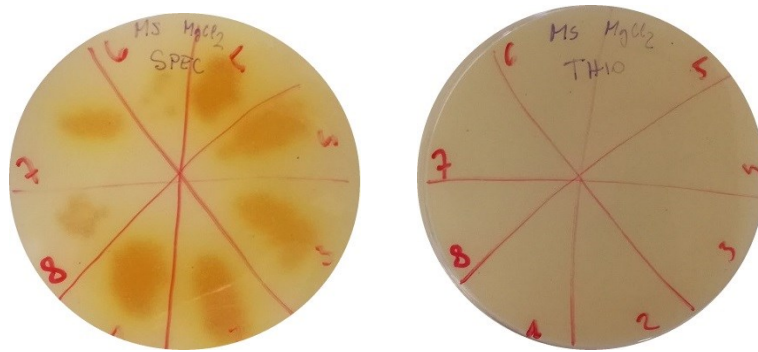
7.4 Integrácia inzerčnej kazety do chromozómu a dizrupcia filipínového klastru génov

Zo vzniknutých kolónií pri konjugácii bola izolovaná jedna, ktorá bola zaočkovaná do prelamovanej Erlenmeyerovej banky s 80 ml YEME média obsahujúceho spektinomycín. Kultivácia prebiehala pri 30 °C na trepačke (220 rpm) 48 hod. Po kultivácii bola banka s kultúrou prenesená do vyššej, tzv. nepermissívnej teploty (39 °C). Podstatná časť pTR42disFIL pozostáva z plazmidu pGM160. Pri dizrupcii využívame práve tri atribúty tohto plazmidu: (i) nesie rezistenciu na tiostreptón, (ii) je multikópiový a (iii) má termosenzitívnu replikáciu. Pri permissívnej teplote (30 °C) dochádza k jeho bežnej replikácii, pričom sa v každej bunke nachádza vo viacerých kópiách. Po prenesení do nepermissívnej teploty sa replikácia tohto plazmidu zastavuje a je vytvorený selekčný tlak na integráciu inzerčnej kazety do chromozómu. Integrácia prebieha na základe homológnej rekombinácie medzi sekvenciami pravého a ľavého ramena a časťou chromozómu, kde je lokalizovaný filipínový klaster génov. Týmto spôsobom dochádza k dizrupcii, kedy sú deletované vybrané gény pre polyketid syntázy a na ich miesto je vložená inzerčná kazeta s rezistenciou na spektinomycín.

Po troch dňoch kultivácie v nepermissívnej teplote bol z banky odobraný 1 ml suspenzia. Táto suspenzia bola nariadená stovkovou radou (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}) v sterilnom fyziologickom roztoku. Z každého riedenia bolo odobraných 100 μ l, ktoré boli vysiate na misku s MS médiom a spektinomycínom a 100 μ l z toho istého riedenia bolo vysiate na misku s MS médiom a tiostreptónom (inkubácia 5 dní, 30 °C). V prípade úspešnej integrácie inzerčnej kazety do chromozómu dôjde k strate rezistencie na tiostreptón, avšak rezistencia na spektinomycín ostane zachovaná.

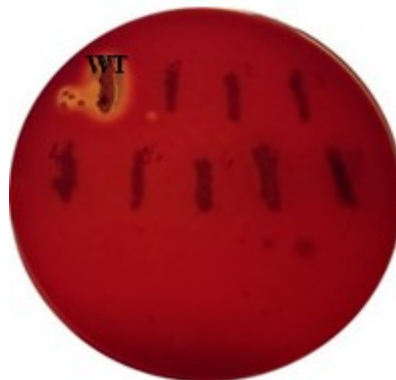
Na miske s riedením 10^{-2} vyrástlo 8 kolónií. Každá z kolónií bola zaočkovaná zároveň na misku s MS médiom a spektinomycínom a na misku s MS médiom a tiostreptónom. Hľadali sme stav, kedy kolónia rástla na miske so spektinomycínom, avšak nerástla na miske s tiostreptónom. Tento stav nastal u všetkých 8 izolovaných kolónií (Obr.

22). Táto skutočnosť bola prvým náznakom úspešnej integrácie inzerčnej kazety do chromozómu a straty zvyšku plazmidu pGM160.



Obr. 22 Jednotlivé kolónie preočkované na misky s MS médiom a spektinomycínom (vľavo) a na rovnaké miesto na misku s MS médiom a tiostreptónom (vpravo).

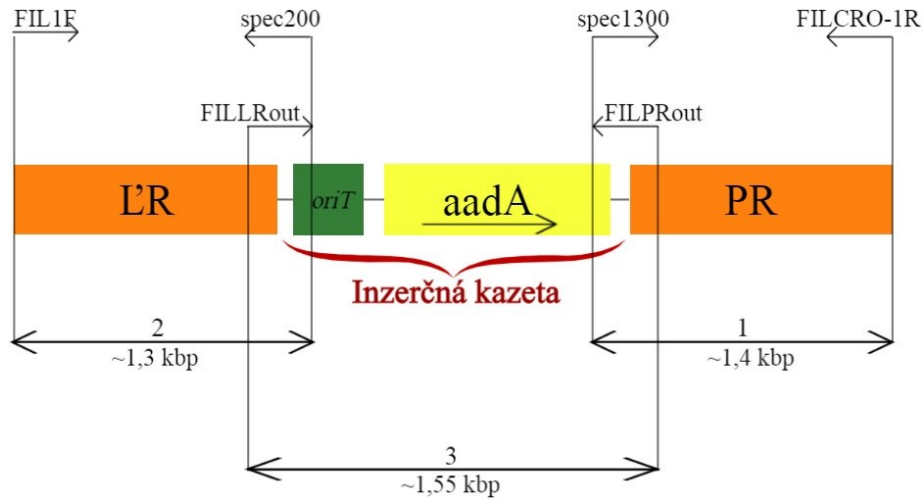
Ďalším spôsobom overenia úspešnosti dizrupcie filipínového klastru génov bol test na štandardnom krvnom agare. Všetkých 8 kolónií bolo preočkovaných na krvný agar, kde sme pozorovali vplyv dizrupcie na hemolytickú aktivitu (inkubácia 48 hod., 37 °C). U všetkých kolónií došlo k zmene fenotypu v porovnaní s divokým kmeňom (WT). Dizrupcia filipínového klastru génov viedla u týchto izolátov k úplnej strate β hemolytickej aktivity (Obr. 23). Filipín je teda jediný hemolyzín produkovaný kmeňom TR42.



Obr. 23 Overenie dizrupcie na štandardnom krvnom agare. Ako kontrolu sme použili divoký kmeň (označený ako WT), ktorý vykazuje silnú β hemolytickú aktivitu. Ani u jednej z izolovaných kolónií (1-8) nebola hemolytická aktivita pozorovaná.

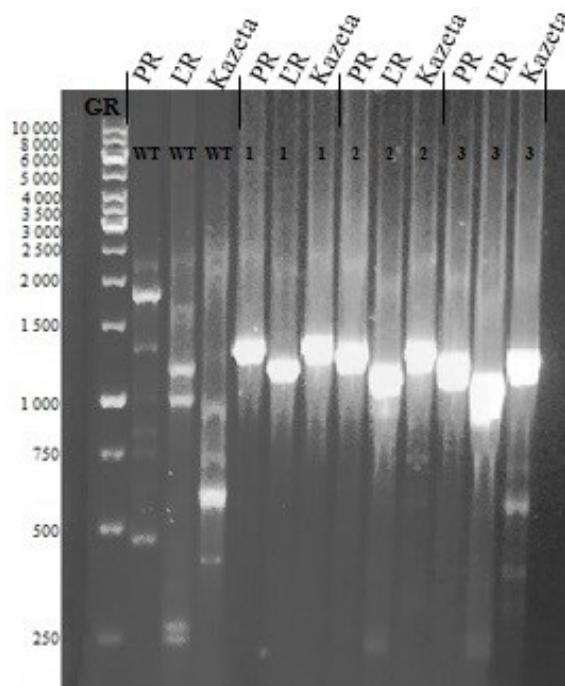
Na definitívne potvrdenie dizrupcie bola z troch vybraných kolónií izolovaná genomická DNA prostredníctvom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) (viď kap. 6.2.1). Táto DNA následne slúžila ako templát pre PCR reakcie, ktorými sme overili skutočnú integráciu inzerčnej kazety do chromozómu. Na toto overenie boli navrhnuté tri dvojice primerov (Obr 24):

1. spec1300 + FILCRO-1R (amplifikácia „pravého ramena“, fragment ~ 1,4 kbp)
2. FIL1F + spec200 (amplifikácia „ľavého ramena“, fragment ~ 1,3 kbp)
3. FILLRout + FILPRout (amplifikácia inzerčnej kazety, fragment ~ 1,55 kbp)



Obr. 24 Schematické znázornenie miest nasadenia použitých primerov a úseky amplifikované danou dvojicou. Na obrázku je taktiež vyznačená inzerčná kazeta a veľkosti očakávaných fragmentov po prebehnutí PCR. LR = ľavé rameno, PR = pravé rameno, *oriT* = replikačný počiatok dôležitý pre konjugačný prenos, *aadA* = rezistencia na spektinomycín (šípka označuje orientáciu génu).

Po prebehnutí PCR boli produkty tejto reakcie vizualizované gélovou elektroforézou (3 μ l PCR zmesi, 2 μ l dH₂O, 1 μ l farbiva). Ako kontrolu sme použili PCR zmes, kde ako templát slúžila genomická DNA divokého kmeňa TR42 (Obr. 25).

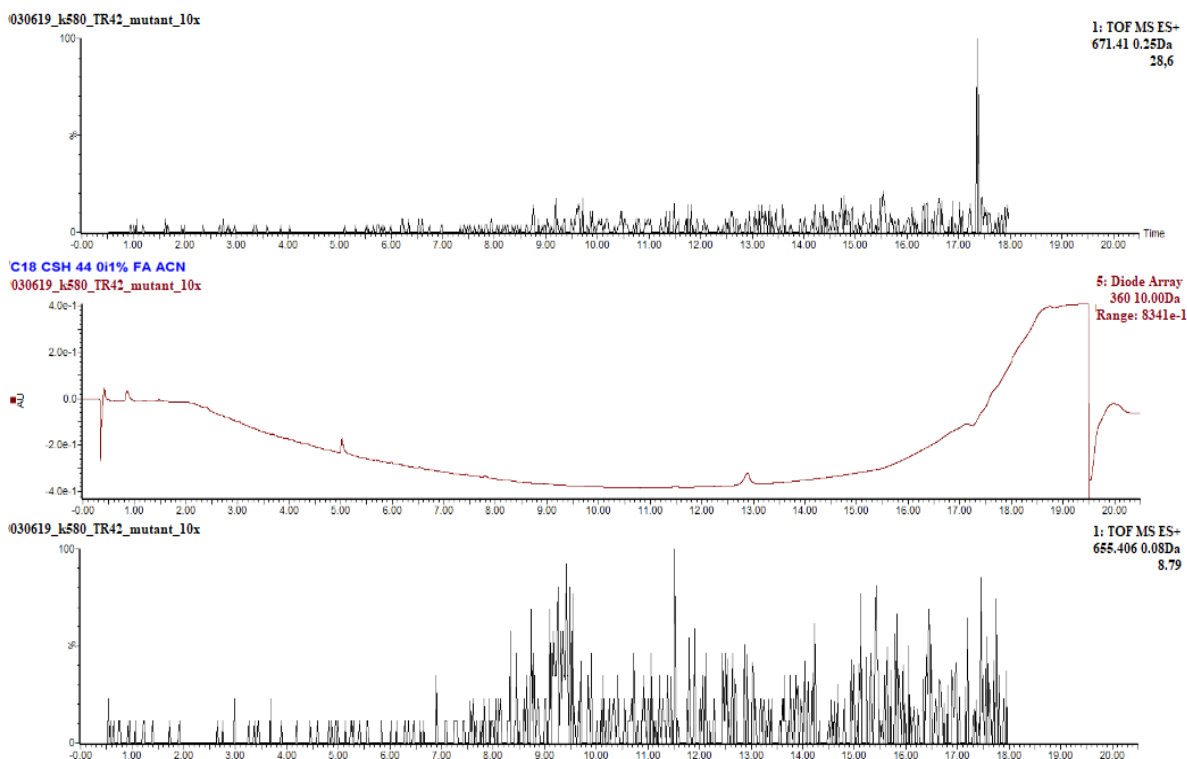


Popis obrázka je na ďalšej strane.

Obr. 25: Overenie dizrupcie filipínového klastru génov na základe vizualizácie vzniknutých PCR produktov. Analýza 3 klonov (označené číslami), WT – divoký typ, kazeta = inzerčná kazeta. Na hornom okraji je uvedený amplifikovaný úsek (viď obr. 15). Čísla na kraji vľavo uvádzajú veľkosti fragmentov na základe použitého DNA veľkostného štandardu (označený ako GR – Gene Ruller).

Gélová elektroforéza potvrdila integráciu inzerčnej kazety do chromozómu vo všetkých troch testovaných klonoch. V prípade divokého kmeňa došlo pri PCR k amplifikácii určitých, nešpecifických fragmentov. Veľkosť týchto fragmentov sa ale nezhodovala s veľkosťou fragmentov, ktoré behom PCR vznikali u inzerčného mutantu a niektoré z nich sme mohli slabo pozorovať aj u mutantných klonov.

Definitívne bola úspešnosť dizrupcie potvrdená prostredníctvom UHPLC, kde bol analyzovaný extrakt nepolárnych látok z mutantného kmeňa (Obr. 26). Analýza bola zameraná na detekciu prítomnosti filipínu a fungichromínu. Ani jedna z týchto látok detekovaná nebola, čím sme potvrdili úspešnú dizrupciu filipínového klastru génov.



Obr. 26 Výsledok UHPLC-DAD-ToF MS analýzy extraktu nepolárnych látok z mutantného kmeňa, ktorý potvrdil úspešnosť dizrupcie filipínového klastru génov. Merané v pozitívnom ESI móde. V extrakte sa nenachádza žiadny filipín ($[M+H]^+ = 655$, spodný extrahovaný iónový chromatogram) ani žiadny fungichromín ($[M+H]^+ = 671$, vrchný extrahovaný iónový chromatogram). Stredný chromatogram – meranie absorbancie pri 360 nm taktiež nepotvrdilo prítomnosť zlúčenín s 5 konjugovanými väzbami typickými pre filipín a fungichromín. (pre porovnanie viď Obr. 11A – UHPLC extraktu nepolárnych látok z WT TR42, merané a vyhodnocované Ing. Matoušem Čihákem).

7.4.1 Vplyv dizrupcie na produkciu antimikrobiálnych látok

Prostredníctvom biologických testov s vybranými zástupcami patogénnych, nepatogénnych baktérií a kvasiniek (Tab. 8) sme sledovali vplyv dizrupcie filipínového klastru génov na produkciu antimikrobiálnych látok. Biologické testy boli zamerané najmä na mikroorganizmy vyskytujúce sa v respiračnom trakte za bežných aj patologických podmienok.

Tab. 8 Vybraní zástupcovia mikroorganizmov použítí pri biologických testoch a kokultivačných experimentoch s uvedením používanej skrátenej formy ich názvu.

Mikroorganizmus	Skrátený tvar
<i>Candida albicans</i>	CAAL
<i>Bacillus subtilis</i>	BASU
<i>Staphylococcus aureus</i>	STAU
<i>Neisseria lactamica</i>	NELA
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPN
<i>Citrobacter freundii</i>	CIFR
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MOCA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KLPN

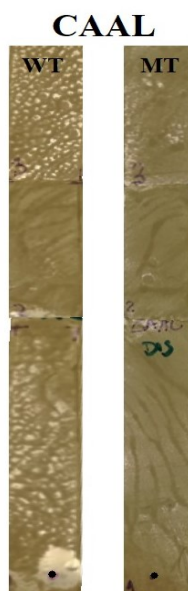
Z troch overených mutantných klonov (viď kap. 7.4), bol vybraný jeden, z ktorého boli extrahované sekundárne metabolity patriace medzi nepolárne látky (viď kap. 6.2.5.1). V prvom kroku sme overili stratu hemolytickej aktivity daného extraktu na štandardnom krvnom agare kvapnutím 10 μ l extraktu v chloroforme na povrch agarovej platne (inkubácia 24 hod., 37 °C). Ako kontrolné vzorky sme použili: (i) 10 μ l extraktu z divokého kmeňa a (ii) 10 μ l chloroformu (Obr. 27).



Obr. 27: Overenie straty hemolytickej aktivity extraktu nepolárnych látok v chloroforme z mutantného kmeňa TR42 (označené ako FILDIS). Ako kontrolu sme použili chloroform, v ktorom sú dané látky rozpustené a extrakt z divokého kmeňa označený ako WT).

Po overení straty hemolytickej aktivity sme extrakt z mutantného kmeňa použili na chromatografiu na tenkej vrstve (Thin Layer Chromatography – TLC) (viď kap. 6.2.5.3). Po prebehnutí TLC sme vyvinuté chromatografické doštičky použili na biologické testy. Pri týchto testoch sme sledovali vplyv extraktu nepolárnych látok na vybraných zástupcov mikroorganizmov (viď Tab. 8) a či má dizrupcie filipínového klastru génov na tento vplyv nejaký efekt. Ako kontrolu sme použili extrakt z divokého kmeňa, ktorý bol taktiež nanosený na TLC doštičku. Výsledok biologických testov a porovnanie efektu extraktu z mutantného a divokého kmeňa na rôzne druhy mikroorganizmov je uvedený na Obr. 28-30.

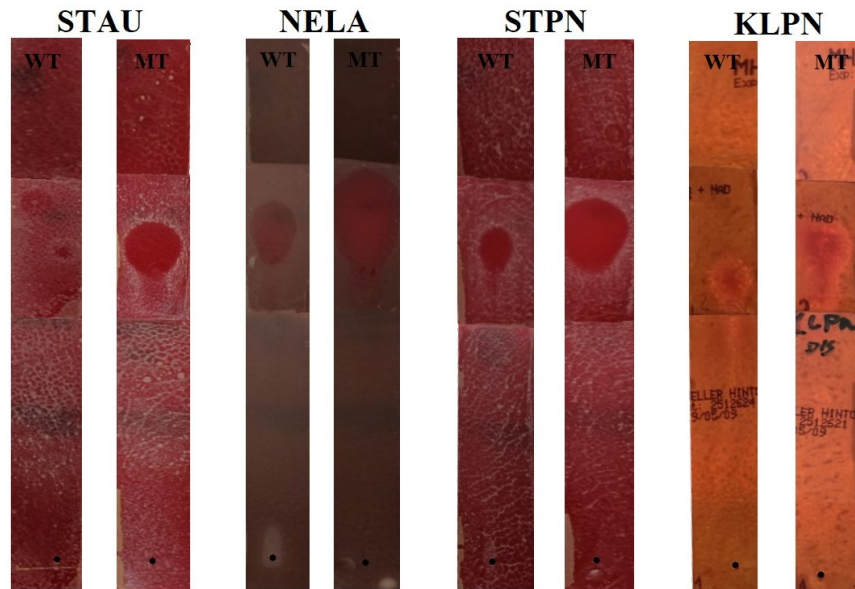
Na základe biologických testov sme zistili, že po dizrupcii filipínového klastru génov došlo u mutantného kmeňa TR42 k strate antifugálnej aktivity voči *Candida albicans* (Obr. 28). V prípade extraktu z divokého kmeňa došlo k vytvoreniu inhibičnej zóny v mieste nanosenia vzorky. V tomto mieste sa nachádza práve filipín, ktorý obsahuje veľké množstvo hydroxylových skupín, je pomerne polárny a preto sa za daných podmienok pohybuje na TLC doštičke veľmi pomaly. Filipín sa radí k antifugálnym látkam, preto nie je jeho aktivita voči *Candida albicans* prekvapujúca. Týmto testom sme ale dokázali, že filipín je jediná antifugálna látka produkovaná kmeňom TR42 za štandardných kultivačných podmienok.



Obr. 28: Biologický test s *Candida albicans* (CAAL) s vyznačením miesta nanosenia vzorky (čierna bodka). WT = Wild Type, MT = Mutant Type.

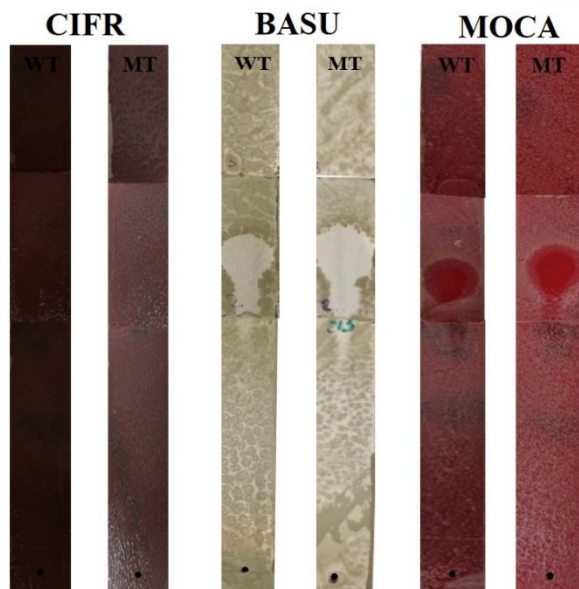
Vo viacerých prípadoch došlo u mutantného kmeňa k posilneniu antimikrobiálnej aktivity voči vybraným baktériám. Konkrétne sa jednalo o: (i) *Staphylococcus aureus*, (ii) *Neisseria lactamica* a (iii) *Streptococcus pneumoniae* (Obr. 29). V prípade *Klebsiella*

pneumoniae sme nepozorovali vznik inhibičnej zóny, avšak extrakt nepolárnych látok mal vplyv na zvýšenie hemolytickej aktivity tohto kmeňa (Obr. 29).



Obr. 29: Biologické testy s baktériami: *Staphylococcus aureus* (STAU), *Neisseria lactamica* (NELA), *Streptococcus pneumoniae* (STPN) a *Klebsiella pneumoniae* (KLPN) s vyznačením miesta nanesenia vzorky (čierna bodka). WT = Wild Type, MT = Mutant Type.

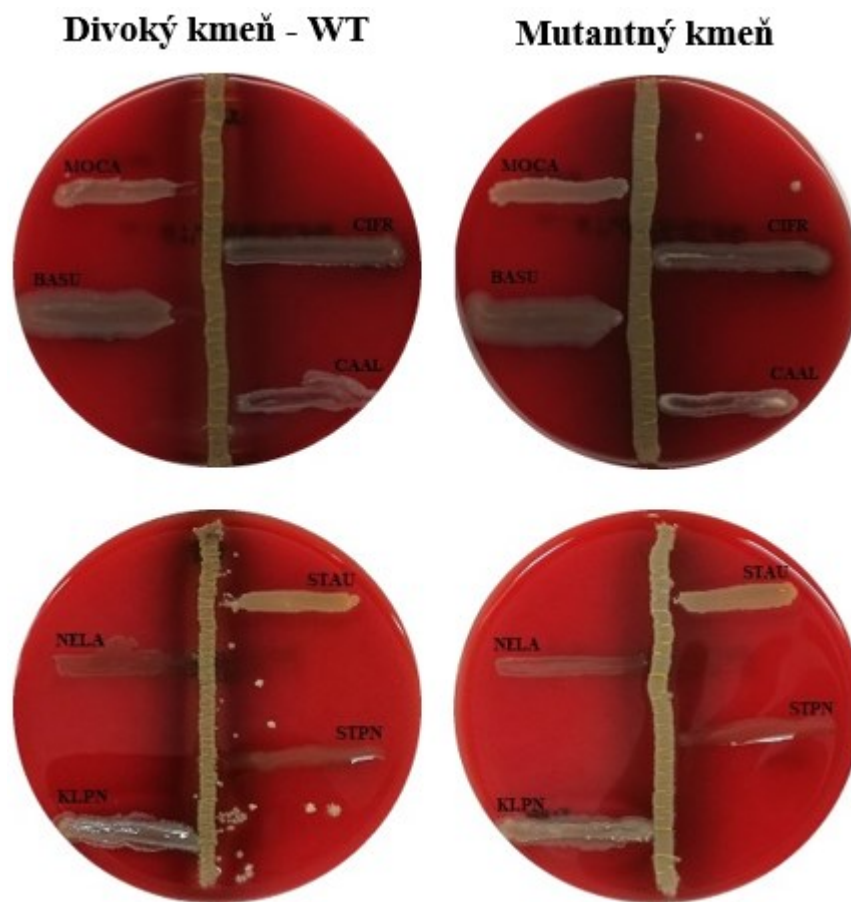
Jediným testovaným mikroorganizmom, na ktorý nemal vplyv ani jeden z extraktov bol *Citrobacter freundii* (Obr. 30). Jednalo sa o klinicky rezistentný izolát, ktorý produkoval karbapenemázy. U všetkých ostatných testovaných baktérií nebol pozorovaný výraznejší rozdiel medzi extraktom z divokého a mutantného kmeňa (Obr. 30).



Obr. 30 Biologický test s *Citrobacter freundii* (CIFR), *Moraxella catarrhalis* (MOCA) a *Bacillus subtilis* (BASU) s vyznačením miesta nanesenia vzorky (čierna bodka). WT = Wild Type, MT = Mutant Type.

7.5 Kokultivačné experimenty

Antimikrobiálnu aktivitu baktérií kmeňa TR42 (divokého aj mutantného) sme sledovali *in vivo* prostredníctvom kokultivačných experimentov (viď kap. 6.2.6). Na kokultiváciu sme použili rovnaké druhy baktérií a kvasiniek ako v prípade biologických testov (viď Tab. 8). Pri biologických testoch bola sledovaná antimikrobiálna aktivita spôsobená najmä nepolárnymi látkami (extrakt nepolárnych látok). V prípade kokultivácie sledujeme antimikrobiálnu aktivitu živých buniek spôsobenú produkciou nepolárnych aj polárnych látok. Porovnanie tejto aktivity medzi divokým a mutantným kmeňom je zobrazené na obr. 31.



Obr. 31 Kokultivačné experimenty divokého a mutantného kmeňa s vybranými zástupcami mikroorganizmov. Skrátené názvy použitých mikroorganizmov sú vyznačené na miske na mieste dráhy, kde boli nanášané.

Pri kokultivačných experimentoch sme u mutantného kmeňa pozorovali úplnú stratu antimikrobiálnej aktivity voči *Candida albicans*. V prípade divokého kmeňa ostala voči tejto kvasinke zachovaná slabá aktivita. Tento výsledok podporuje hypotézu, že filipín je jediná

extrahovateľná antifugálna látka (za daných podmienok extrakcie) produkovaná baktériami kmeňa TR42.

Vo viacerých prípadoch sme pri kokultivácii na rozdiel od biologických testov s organickými extraktmi pozorovali silnejšiu antimikrobiálnu aktivitu u divokého kmeňa než u mutantného. Silnejšia aktivita sa prejavila u baktérii: (i) *Bacillus subtilis*, (ii) *Moraxella catarrhalis* a (iii) *Staphylococcus aureus*. V prípade *Neisseria lactamica* sme antimikrobiálnu aktivitu zaznamenali len u divokého kmeňa. Mutantný kmeň aktivitu proti tejto baktérii nevykazoval. Pri kokultivácii s *Citrobacter freundii* a *Klebsiella pneumoniae* nebola pozorovaná žiadna antimikrobiálna aktivita u divokého, ani u mutantného kmeňa. Tento jav môže byť spôsobený odlišným sekundárnym metabolizmom kmeňa pri kultivácii na rôznych médiách (GYM vs. krvný agar), prípadne môže túto zmenu vyvolať práve prítomnosť patogéna. Taktiež je nutné poznamenať, že organické extrakty látok nemusia obsahovať kompletný sekundárny metabolom bakteriálnej kultúry.

U *Streptococcus pneumoniae* došlo k zmene fenotypu v mieste interakcie so streptomycétou (u divokého aj mutantného kmeňa). V mieste interakcie tento streptokok nevytvára typický slizovitý povrch, čo môže indikovať, že v prítomnosti streptomycét kmeňa TR42 netvorí *Streptococcus pneumoniae* polysacharidové púzdro.

7.6 Vplyv extraktov streptomycét kmeňa TR42 na prežívanie buniek z línie THP-1

Cytotoxicita extraktu z divokého aj mutantného kmeňa bola testovaná na ľudských imunitných bunkách z línie THP-1 (viď kap. 6.1.1). Množstvo prežívajúcich buniek z tejto línie bolo stanovené po 24. hod. kultivácie od pridania extraktu (viď kap. 6.2.6). Cieľom experimentu bolo zistiť celkovú cytotoxicitu extraktu na bunky z línie THP-1 a či má dizrupcia filipínového klastru génov na túto toxicitu vplyv.

Pri testovaní bol použitý extrakt nepolárnych látok rozpustený v DMSO (štandardná kultivácia v médiu GYM). Kultivácia prebiehala na 24 jamkovej TPP doštičke v celkovom objeme 1 ml/jamka (24 hod., 37 °C, 5,7% CO₂). Maximálne množstvo použitého extraktu bolo stanovené tak, aby celková koncentrácia DMSO v jednej jamke neprekročila 1% (vyššia koncentrácia by sa prejavila toxicitou DMSO k bunkám). Ako kontrolu sme použili bunky kultivované v kompletnom médiu RPMI a bunky, ku ktorým bol pridaný DMSO, v takom množstve, aby jeho celková koncentrácia bola v jamke 1%. Cytotoxicita extraktov

bola vyhodnocovaná ako percento prežívajúcich buniek z línie THP-1 po 24 hod. kultivácii (Tab. 9). Použité riedenia extraktov boli zvolené na základe predošlých pilotných štúdií.

Tab. 9: Vplyv extraktu z divokého a mutantného kmeňa TR42 na prežívanie buniek z línie THP-1. Extrakt bol riedený v DMSO. Počiatočná životnosť buniek z línie THP-1: 86%

	Riedenie extraktu	Prežívajúce bunky (v %)
Extrakt z divokého kmeňa	1:10 000	8
	1:50 000	72
	1:100 000	86
Extrakt z mutantného kmeňa	1:10 000	0
	1:50 000	8
	1:100 000	79
Kontrola (1% DMSO)		84
Kontrola bunky		86

Hypotéza o poklese cytotoxicity extraktu z mutantného kmeňa sa nepotvrdila. Analýza genómových dát kmeňa TR42 v programe AntiSmash predikovala okrem produkcie cytolytického polyénu filipínu aj ďalšiu toxickú látku, ktorá by mohla byť zodpovedná za vysokú toxicitu extraktu. Jedná sa o aktinomycín. Posilnenie klastru génov zodpovedných za syntézu aktinomycínu by teda mohlo byť zodpovedné za zvýšenie cytotoxicity extraktu pre bunky z línie THP-1 po dizrupcii filipínového génového zhluku.

Prostredníctvom UHPLC analýzy extraktu z mutantného kmeňa TR42 bolo potvrdené, že v extrakte sa nachádza 5,4 krát viac aktinomycínu X2 ako v extrakte z WT. Nárast koncentrácie aktinomycínu X2 teda spôsobí zvýšenie cytotoxicity extraktu z mutantného kmeňa pre bunky z línie THP-1 (ČIHÁK, M., osobné zdelenie).

7.6.1 Stanovenie toxicity extraktov zo streptomycét pre bunky z línie THP-1.

Na stanovenie cytotoxicity boli použité tri druhy extraktov, kde boli streptomycéty kmeňa TR42 kultivované za rôznych podmienok (viď kap. 6.2.5.1). Miera toxicity jednotlivých extraktov a ich riedení bola určená na základe množstva prežívajúcich buniek z línie THP-1 po 24 hod. kultivácii (37 °C, 5,7% CO₂) v prítomnosti a neprítomnosti LPS (viď kap. 6.2.6) (Tab. 10 a 11, pre kontrolné vzorky viď Tab. 12). Použité riedenia extraktov na tento test boli zvolené na základe predošlých pilotných štúdií. Experiment prebiehal v triplikátoch.

Tab. 10 Percentá prežívajúcich buniek z línie THP-1 po 24 hod. inkubácii s rôznymi riedeniami extraktov nepolárnych látok z kmeňa TR42. Riedenia extraktov použité na ďalšie experimenty sú zvýraznené. Počiatočná životnosť buniek z línie THP-1 bola v prípade 1. sady vzoriek na úrovni 88%, v prípade 2 a 3 sady bola životnosť stanovená na 84%.

Kultivácia v médiu GYM				Kultivácia v médiu RPMI				Kultivácia s bunkami THP-1			
Riedenie extraktu	Sada vzoriek			Riedenie extraktu	Sada vzoriek			Riedenie extraktu	Sada vzoriek		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
1:5 000	0	0	0	1:500	0	0	0	1:500	0	0	0
1:10 000	8	10	4	1:1 000	7	5	6	1:1 000	8	6	3
1:50 000	68	63	60	1:5 000	82	80	78	1:5 000	42	62	54
1:100 000	84	82	84	1:10 000	87	83	82	1:10 000	88	84	79
1:500 000	86	83	84	1:50 000	88	83	84	1:50 000	88	84	84

Tab. 11 Percentá prežívajúcich buniek z línie THP-1 po 24 hod. inkubácii s rôznymi riedeniami extraktov nepolárnych látok z kmeňa TR42, kde boli THP-1 bunky aktivované prídavkom LPS. Riedenia extraktov použité na ďalšie experimenty sú zvýraznené. Počiatočná životnosť buniek z línie THP-1 bola v prípade 1. sady vzoriek na úrovni 88%, v prípade 2 a 3 sady bola životnosť stanovená na 84%.

Kultivácia v médiu GYM				Kultivácia v médiu RPMI				Kultivácia s bunkami THP-1			
Riedenie extraktu	Sada vzoriek			Riedenie extraktu	Sada vzoriek			Riedenie extraktu	Sada vzoriek		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
1:5 000	0	0	0	1:500	0	0	0	1:500	0	0	0
1:10 000	12	12	10	1:1 000	8	7	18	1:1 000	8	9	5
1:50 000	65	68	63	1:5 000	80	81	80	1:5 000	46	50	52
1:100 000	86	80	84	1:10 000	88	84	84	1:10 000	88	82	82
1:500 000	87	84	84	1:50 000	88	84	84	1:50 000	88	84	84

Tab. 12 Kontrolné vzorky na sledovanie viability buniek z línie THP-1. Počiatočná životnosť buniek z línie THP-1 bola v prípade 1. sady vzoriek na úrovni 88%, v prípade 2 a 3 sady bola životnosť stanovená na 84%.

Typ kontroly	Sada vzoriek	
	1	2 +3
Bunky	88	84
Extrakt z média GYM	86	82
Extrakt z média GYM + LPS	86	79
DMSO (5ul) + LPS	84	82

Použité rozdielne riedenia extraktov (GYM vs. RPMI) a ich rozdielna cytotoxicita pre bunky z línie THP-1 poukazujú na odlišný sekundárny metabolizmus TR42 v závislosti na rôznych kultivačných podmienkach.

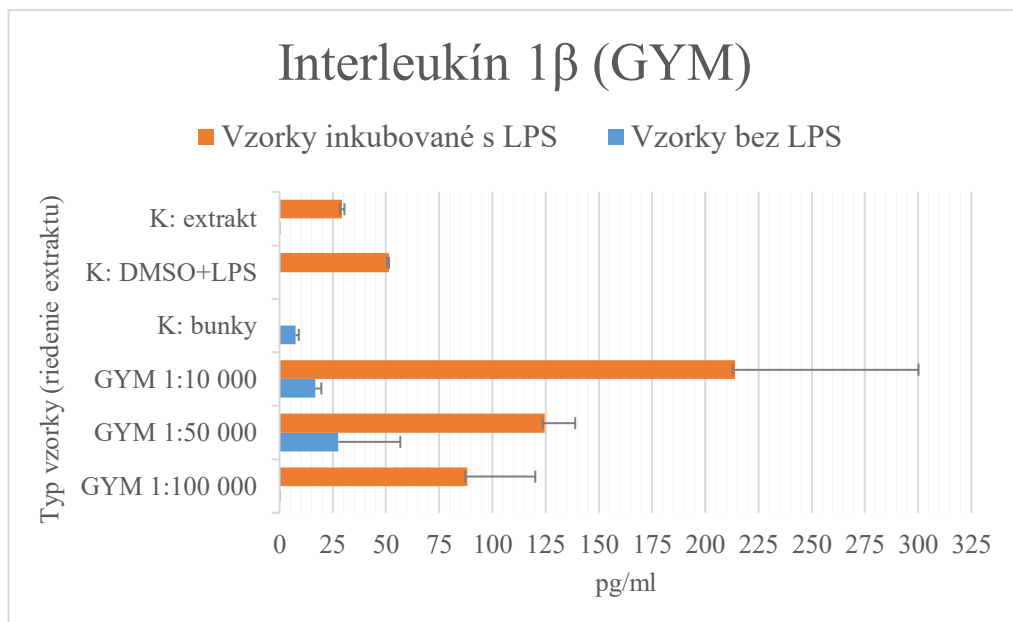
7.7 Vplyv extraktov nepolárnych látok z kmeňa TR42 na produkciu IL-1 β bunkami z línie THP-1

Interleukín 1 β je významný prozápalový cytokín za produkciu ktorého sú zodpovedné **makrofágy**, endotelové, epitelové bunky a fibroblasty. Cieľom experimentu bolo objasniť, či majú extrakty nepolárnych látok z kmeňa TR42 vplyv na produkciu IL-1 β bunkami z línie THP-1, a teda či extrakt týchto látok obsahuje pro alebo protizápalové látky.

Na určenie imunomodulačného efektu extraktu z kmeňa TR42 na bunky z línie THP-1 boli vykonané tri rozličné kultivácie: (i) štandardná kultivácia v médiu GYM, (ii) kultiváciu v médiu RPMI a následná kultivácia v médiu GYM, (iii) kokultivácia s bunkami z línie THP-1 v médiu RPMI a následná kultivácia v médiu GYM. Použité riedenia extraktov vyplývajú z predošlého testu cytotoxicity (viď kap. 7.6.1).

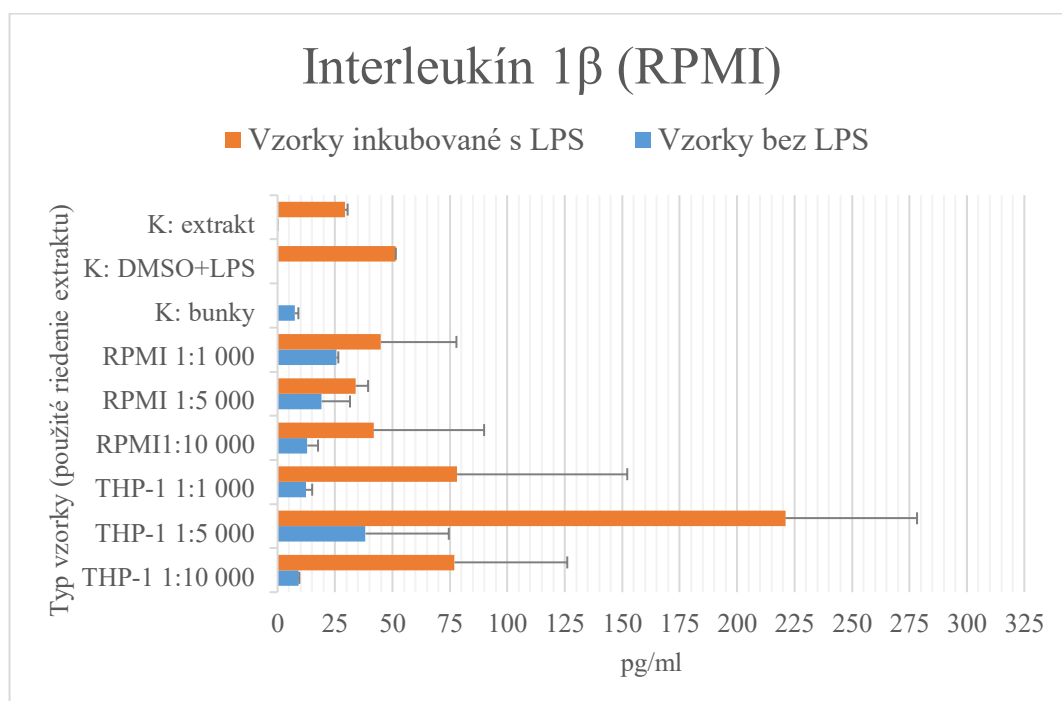
Tvorba IL-1 β bola meraná u aktivovaných (inkubácia s LPS) a neaktivovaných (inkubácia bez LPS) buniek THP-1 prostredníctvom komerčne dostupného ELISA kitu (Human IL-1beta Uncoated ELISA Kit, Invitrogen).

Extrakt nepolárnych látok získaný z kmeňa TR42 po štandardnej kultivácii v médiu GYM indukoval u makrofágov produkciu prozápalového cytokínu IL-1 β (Obr. 32). Produkcia IL-1 β bola zaznamenaná u aktivovaných aj neaktivovaných (okrem jednej výnimky) buniek THP-1, pričom u aktivovaných buniek sme pozorovali synergické pôsobenie LPS a prozápalových látok nachádzajúcich sa v extrakte. V niektorých prípadoch bola zaznamenaná niekoľkonásobne vyššia tvorba interleukínu oproti kontrolným vzorkám. Najvyššia produkcia u neaktivovaných buniek bola pozorovaná pri riedení extraktu 1:50 000. V prípade riedenie 1:100 000 nebola produkcia IL-1 β zaznamenaná, čo indikuje príliš vysoké riedenie extraktu, ktoré samostatne nemá na bunky z línie THP1 žiadny vplyv. Toto riedenie teda u makrofágov nevyvolalo produkciu interleukínu u neaktivovaných buniek, avšak v prípade aktivovaných buniek látky v extrakte, aj napriek vysokému riedeniu, podporili produkciu IL-1 β .



Obr. 32: Vplyv extraktov streptomycét kmeňa TR42 po štandardnej kultivácii v médiu GYM na produkciu IL-1 β bunkami z línie THP-1. Vľavo uvedené použité riedenie extraktu. Výsledné hodnoty predstavujú aritmetický priemer z merania triplikátov riedení extraktov s uvedením chybových úsečiek vytvorených na základe smerodajnej odchýlky (písmeno „K“ označuje kontrolné vzorky).

V prípade kultivácie v médiu RPMI sme sledovali, či má toto médium vplyv na metabolický profil streptomycét, a či ovplyvňuje tvorbu látok, zodpovedných za produkciu IL-1 β makrofágmi. Podobným spôsobom sme sledovali, či má na túto produkciu vplyv predošlá expozícia buniek kmeňa TR42 s bunkami z línie THP-1 (Obr. 33).



Popis obrázka je na ďalšej strane.

Obr. 33 Vplyv extraktov streptomycét kmeňa TR42 po kultivácii v médiu RPMI a kokultivácii s bunkami z línie THP-1 v médiu RPMI na produkciu IL-1 β bunkami z línie THP-1. Vľavo uvedené riedenie použitého extraktu. Výsledné hodnoty predstavujú aritmetický priemer z merania triplikátov extraktov s uvedením chybových úsečiek vytvorených na základe smerodajnej odchýlky (písmeno „K“ označuje kontrolné vzorky).

Produkcia IL-1 β bola zaznamenaná u všetkých typov použitých riedení extraktu u aktivovaných aj neaktivovaných buniek. Dané extrakty teda obsahujú látky podporujúce zápal. V prípade predošlej expozície baktérií TR42 a buniek THP-1 pozorujeme silnejšiu produkciu interleukínu makrofágmi. U aktivovaných buniek a použitého riedenia 1:5 000 je to až štvornásobný nárast oproti kontrole. Rovnako u extraktov z kokultivácie pozorujeme silnú synergiu pôsobenia LPS a prozápalových látok v nich obsiahnutých.

Vo všeobecnosti môžeme tvrdiť, že typ použitého média na kultiváciu (GYM vs. RPMI) a predošlá expozícia kmeňa TR42 s bunkami z línie THP-1 má výrazný vplyv na sekundárny metabolizmus daného kmeňa, čo sa okrem iného prejaví aj v obsahu látok podporujúcich zápal.

Na potvrdenie jednoznačného trendu koncentračnej závislosti (typ a riedenie extraktu - produkcia IL-1 β) odporúčame experiment zopakovať s použitím širšej škály riedení extraktov.

8 Diskusia

Baktérie rodu *Streptomyces* nie sú typickým príkladom patogénov ani komenzálov človeka. Na základe nedávnych metagenomických štúdií a prostredníctvom metódy MALDI-TOFF však bolo dokázané, že streptomycéty sú súčasťou mikrobiómu gastrointestinálneho traktu, môžu kolonizovať kožu človeka, maternicu, ústnu dutinu a celý respiračný trakt (OSIPOV a VERKHOVTSEVA, 2011; COLLADO a kol., 2016). V literatúre sú popísané viaceré prípady infekcií človeka, kde boli streptomycéty označené za kauzatívnych pôvodcov daného stavu. Jedná sa prevažne o infekcie respiračného traktu a krvného obehu (ATAIEKHORASGANI a kol., 2014). Tieto infekcie sa vyskytujú najmä u imunokompromitovaných pacientov pričom nespádajú medzi tzv. aktinomycetómy, za ktoré sú zodpovedné jasne patogénne druhy *S. somaliensis* a *S. sudanensis*. Na štúdium špecifickej adaptácie streptomycét na prostredie ľudského tela a určenie ich impaktu na ľudské zdravie vznikli unikátne zbierky nepatogénnych streptomycét. Zbierky obsahujú približne 80 kmeňov streptomycét, ktoré boli izolované hlavne z pľúc od pacientov trpiacich pneumóniou a bronchopneumóniou. V práci sa zameriavame na kmeň s označením TR42, ktorý v pilotných testoch vykazoval najkomplexnejšie biologické účinky.

Produkcia hemolytických látok (hemolyzínov) a následná indukcia hemolýzy je virulenným faktorom celého radu patogénnych baktérií. V genóme typicky pôdnej nepatogénnej streptomycéty *S. coelicolor* sa nachádzajú štyri gény pre produkciu hemolyzínov. Homológy týchto génov sa nachádzajú aj u TR42. U *S. coelicolor* je dokázané, že jeden z týchto génov je zodpovedný za jeho α -hemolytickú aktivitu. Nami študovaný kmeň TR42 vykazuje na krvnom agare silnú β -hemolytickú aktivitu. Avšak, o β -hemolýze streptomycét sa vie pomerne málo (LAMILLA a kol., 2018). Pôvodným zameraním práce bola teda identifikácia β -hemolytických faktorov kmeňa TR42 prostredníctvom náhodnej transpozónovej mutagenézy s použitím plazmidu pHL734 (XU a kol., 2017). Od tohto zámeru sme boli nútení upustiť, keďže sa nám nepodarilo získať dostatočný počet transkonjugantov, nakoľko sa ukázalo, že kmeň TR42 je nesmierne obtiažne transformovať (či už konjugáciou alebo transformáciou protoplastov). Na štúdium hemolytickej aktivity daného kmeňa bolo teda nutné nájsť iné alternatívne riešenie, ktoré sa naskytlo až po osekvenovaní genómu TR42.

Sekvenácia prebehla v ÚPB BC AV ČR v Českých Budejoviciach. Následná analýza získaných genómových dát ukázala prítomnosť dvoch genových zhlukov, ktoré by mohli

byť zodpovedné za produkciu látok s vplyvom na ľudské bunky. Konkrétne sa jednalo o filipín a aktinomycín. Ďalšia práca bola zameraná na analýzu extraktu z WT TR42 s cieľom dokázať v ňom prítomnosť predikovaného filipínu. Testom na štandardnom krvnom agare sme potvrdili hemolytickú aktivitu extraktu. Prítomnosť filipínu bola dokázaná analýzou extraktu prostredníctvom UHPLC. Táto analýza odhalila v extrakte prítomnosť aj ďalšej polyénovej látky - fungichromínu (tiež známy ako pentamycín). Dizrupciou filipínového klastru génov sme dokázali, že sa jedná o jediný β -hemolytický faktor tejto baktérie. Táto skutočnosť je pomerne neobvyklá, nakoľko hemolýziny patogénov sú výlučne proteínové. Zdá sa, že podobnú stratégiu hemolýzy využívajú aj iné izoláty „ľudských“ streptomycét. Za ich hemolytickú aktivitu je ale zodpovedný iný typ polyénu – kandidicín.

Filipín a fungichromín patria medzi polyénové antibiotiká, ktoré vykazujú dobré antifugálne vlastnosti. Problémom je ale ich nestabilita a cytotoxicita pre ľudské bunky. Z tohto dôvodu sa používajú len lokálne. Intravaginálny pentamycín poskytuje perspektívnu možnosť na liečbu vaginálnej kandidózy, trichomoniázy a zmiešaných infekcií (ZHOU a kol., 2019). Javí sa ako najlepšia možnosť na liečbu týchto infekcií, nakoľko vykazuje antimikrobiálnu aktivitu voči viacerým patogénom, avšak je neaktívny voči baktériám, ktoré sú bežnou súčasťou vaginálnej mikroflóry (napr. laktobacily) (WINNIPS a BALMER, 2010). Rozšírenému používaniu tejto látky ale bráni jej chemická nestabilita (ZHOU a kol., 2019).

Pri TLC sme zistili, že za antimikrobiálnu aktivitu extraktu z TR42 je zodpovedná iná látka. Inhibičná zóna bola vytvorená na inom mieste, ako zóna, za ktorú je zodpovedný filipín a fungichromín (zóna v mieste nanosenia vzorky). Dizrupcia filipínového klastru génov vedie navyše k posilneniu antimikrobiálnej aktivity (spôsobenou možným zvýšením produkcie aktinomycínu, ktorého potenciálny biosyntetický génový zhluk pre jeho produkciu je na chromozóme tiež prítomný). Biosyntéza látok, ktoré kóduje filipínový klaster génov sa po jeho dizrupcii zastavuje. Ušetrená energia v podobe ATP, koenzýmov NADH, NADPH a ďalších zložiek by mohla byť využitá práve k posilneniu biosyntézy antimikrobiálnych látok kódovaných inými génovými zhlukmi.

Antimikrobiálna aktivita bola sledovaná aj *in vivo* pri kokultivačných experimentoch. Pri týchto experimentoch sa ukázal variabilný vplyv kmeňa TR42 na vybrané druhy mikroorganizmov. V prípade kokultivácie so *Streptococcus pneumoniae* došlo v mieste interakcie k absencii jeho púzdra. Púzdro *S. pneumoniae* je považované za jeho dôležitý virulenčný faktor. Expresia génov pre tvorbu púzdra je u tohto streptokoka regulovaná

systemom quorum sensing, pričom niektoré druhy streptomycét dokážu quorum sensing narušať mechanizmom známym ako quorum quenching (PARK a kol., 2005, JUNGES a kol., 2017). Zdá sa, že medzi tieto streptomycéty by mohol patriť aj kmeň TR42, ktorý ovplyvňuje quorum sensing *Streptococcus pneumoniae*. Tento vplyv na produkciu púzdra by mohol byť dôležitý v prípade koinfekcie týchto dvoch baktérií, nakoľko pôsobenie streptomycét daného kmeňa by mohlo viesť k zníženiu virulencie *Streptococcus pneumoniae*.

Za zmienku určite stojí aj schopnosť baktérií kmeňa TR42 indukovať hemolýzu u vybraných patogénov, konkrétne u *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (ŽLÁBKOVÁ, 2018). Táto skutočnosť by taktiež mohla hrať rolu v prípade koinfekcie. Na rozdiel od koinfekcie so *Streptococcus pneumoniae* by v tomto prípade došlo k posilneniu virulencie daných baktérií. Vplyv baktérií kmeňa TR42 na rôzne druhy patogénov je teda značne variabilný, a určite si zaslúži pozornosť v rámci ďalšieho štúdia.

Test cytotoxicity extraktu z kmeňa TR42 na ľudské bunky z línie THP-1 ukázal jeho neobvykle vysokú toxicitu. Pri porovnaní extraktov z kmeňa TR42 a kmeňov TR1, TR24, TR38 (POSPÍCHAL, 2018) sa jedná o prudký nárast toxicity o dva rády. Za príčinu vysokej toxicity extraktu bola považovaná prítomnosť filipínu. Filipín sa viaže na cholesterol v membránach THP-1 buniek, vytvára v nich neselektívne perforácie a tým ich lyzuje. Po dizrupcii filipínového klastru bol očakávaný výrazný pokles cytotoxicity. Bolo preto prekvapujúce, že toxicita extraktu z mutantného kmeňa TR42 sa ešte približne o jeden rád zvýšila. V genóme TR42 sa nachádza ďalší génový zhluk s potenciálom biosyntézy inej silne toxickej látky - aktinomycínu. PICK a kol. (2004) zistili, že koncentrácia aktinomycínu 1 µg/ml vedie k poklesu viability buniek THP-1 o ~75%. Aktinomycín sa v medicíne používa ako kancerostatikum, interkaluje sa do DNA a inhibuje tak jej transkripciu. Analýza extraktu z mutantného kmeňa odhalila 5,4 násobný nárast koncentrácie aktinomycínu X2 v porovnaní s WT, čoby mohlo byť dôvodom zvýšenia jeho toxicity. Za vysokú cytotoxicitu extraktu z WT je teda zodpovedné synergické pôsobenie filipínu a aktinomycínu X2.

Okrem prítomnosti filipínu a aktinomycínu môže na vysokú cytotoxicitu extraktu z kmeňa TR42 vplývať aj absencia *mce* lokusu. *Mce* lokus môžeme napríklad nájsť u typicky pôdneho zástupcu streptomycét – *Streptomyces coelicolor*. Týmto druhom streptomycét sa bežne živia napríklad akantaméby. Mutácia v *mce* lokuse u *Streptomyces coelicolor* spôsobí, že po fagocytóze akantamébou ju streptomycéty začnú zvnútra lyzovať. Podobný lokus majú aj mykobaktérie, ktoré ho využívajú na udržanie intracelulárneho parazitizmu – schopnosť mykobaktérií prežívať v bunke vo vnútri lyzozómu. Absencia *mce* lokusu v genóme TR42

by teda mohla byť ďalším dôvodom neobyčajne vysokej cytotoxicity extraktu pre bunky z línie THP-1, nakoľko makrofágy majú s amébami niekoľko spoločných charakteristík a vykazujú podobný mechanizmus fagocytózy (CASADEVALL a kol., 2019).

Pri vhodnom riedení extraktu sme pozorovali jeho imunomodulačný vplyv na bunky z línie THP-1. Jednoznačne môžeme tvrdiť, že po pridaní extraktu sa zvyšuje prozápalová odpoveď makrofágov. Extrakt teda obsahuje látky podporujúce zápal. Extrakty pochádzajúce z kultivácie v médiu GYM sú výrazne toxickejšie, ako v prípade kultivácie RPMI. Produkcia sekundárnych metabolitov je u streptomycét viazaná na pôsobenie stresových faktorov (BENTLEY a kol., 2002; TANAKA a kol., 2013). V tomto prípade je médium RPMI výrazne bohatšie ako GYM, čo sa prejaví zmenou sekundárneho metabolizmu a v obsahu extrahovateľných cytotoxických látok. Na intenzitu zápalovej odpovede taktiež vplýva predošlá expozícia streptomycét kmeňa TR42 a buniek THP-1. Extrakt z tejto kokultivácie je toxickejší ako v prípade kultivácie streptomycét v médiu RPMI, načo makrofágy reagujú vyššou produkciou interleukínu, čo vedie k silnejšej zápalovej odpovedi. Táto stratégia je diametrálne odlišná u skôr študovaného kmeňa s označením TR24. Jedná sa taktiež o jedného z členov trutnovskej zbierky, ktorý bol izolovaný z prostredia ľudských pľúc (dekontaminované sputum). Extrakt z tohto kmeňa obsahuje prozápalové látky. Avšak, v prípade kokultivácie s bunkami THP-1 extrakt pôsobil protizápalovo, a produkciu interleukínu znižoval aj u aktivovaných buniek. Na základe týchto výsledkov sa predpokladá, že po predošlej expozícii TR24 s THP-1 bunkami, kmeň streptomycét utlmuje produkciu látok, ktoré zvyšujú aktivitu makrofágov, aby sa tak bránil voči ich pôsobeniu (POSPÍCHAL, 2018).

Produkcia sekundárnych metabolitov pôsobiacich ako virulénne faktory nie je pre patogénne baktérie typická. Vo väčšine prípadov sa jedná len o sekundárne metabolity pôsobiace ako regulátory virulénnych faktorov (WYATT a kol., 2010). Avšak v prípade fakultatívneho ľudského patogéna *Pseudomonas aeruginosa* sa stretávame s produkciou ramnolipidu, ktorý ako virulénny faktor pôsobí (DEMAIN, 1998). U húb sa stretávame s bohatým sekundárnym metabolizmom, ktorý stojí za produkciu širokého spektra látok. Medzi tieto látky patria aj melaníny. Melaníny sú zodpovedné za virulenciu a patogenitu vybraných druhov húb (HEINEKAMP a kol., 2013). Vzhľadom na obdobne bohatý sekundárny metabolizmus, veľkosť a plasticitu genómu u streptomycét je možné hypoteticky predpokladať, že niektoré sekundárne metabolity by mohli byť zodpovedné za ich prípadnú virulenciu.

Na základe vyššie uvedených skutočností sme potvrdili, že kmeň TR42 produkuje vybrané sekundárne metabolity, ktoré mu umožňujú adaptovať sa na prostredie ľudských pľúc. Jedná sa o látky, ktoré:

- lyzujú ľudské bunky (filipín)
- poškodzujú ľudské bunky interkaláciou do ich DNA (aktinomycín X2)
- produkujú látky, ktoré môžu ovplyvňovať pľúcny mikrobióm, či už fyziologický alebo patologický

Produkcii týchto látok je teda možné považovať za špecifický adaptačný mechanizmus streptomycét, ktorý im umožňuje kolonizáciu ľudských tkanív. Vďaka tejto adaptácii by mohol byť kmeň TR42 považovaný za fakultatívny patogén a jedinou dostačujúcu príčinu vzniku pneumónie u dotyčného pacienta.

Kmeň TR42 zároveň vykazuje značný biotechnologický potenciál. Kóduje viacero polyénových látok s antifugálnou aktivitou. Polyénové makrolidy sú dôležité liečivá, ktoré ale majú dva závažné problémy: (i) vysoká cytotoxicita pre ľudské bunky a (ii) relatívna chemická nestabilita (rýchla oxidácia hydroxylových skupín). Vzhľadom na to, že polyény sú látky s hemolytickou aktivitou, a viac ako 90 % kmeňov z trutnvskej a ostravskej zbierky nepatogénnych streptomycét vykazujú hemolytickú aktivitu, mohli by sa tieto kmene stať dobrým zdrojom pre izoláciu nových antifugálnych polyénov.

9 Súhrn

- Dizrupcia filipínového klastru vedie u kmeňa TR42 k strate hemolytickej a antifugálnej aktivity. Filipín je teda jedinou hemolytickou a antifugálnou látkou produkovanou kmeňom TR42 za štandardných kultivačných podmienok.
- Za antimikrobiálnu aktivitu kmeňa TR42 je okrem filipínu zodpovedný aj aktinomycín X2.
- Extrakt nepolárnych látok z kmeňa TR42 vykazuje neobyčajne vysokú cytotoxicitu pre bunky z línie THP-1. Za vysokú toxicitu je zodpovedné synergické pôsobenie filipínu a aktinomycínu X2.
- Dizrupcia filipínového klastru génov vedie k posilneniu genového zhľuku pre produkciu aktinomycínu X2 (5,4 násobný nárast u mutantného kmeňa). Táto skutočnosť sa prejaví v zvýšení antimikrobiálnej aktivity a cytotoxicity extraktu z MT.
- Extrakt nepolárnych látok má variabilný vplyv na vybraných zástupcov mikroorganizmov (inhibícia vs. posilnenie hemolytickej aktivity). Kmeň TR42 dokáže pravdepodobne narúšať quorum sensing niektorých baktérií. Je teda možné, že patrí k streptomycétam disponujúcim quorum quenching systémom.
- Extrakt nepolárnych látok obsahuje prozápalové látky. Na obsah týchto látok má vplyv typ použitého média (GYM vs. RPMI) a predošlá expozícia baktérií kmeňa TR42 s bunkami z línie THP-1.
- Na základe vyššie uvedených skutočností je možné kmeň TR42 považovať za fakultatívny patogén a jedinú dostačujúcu príčinu vzniku pneumónie u dotyčného pacienta. Kmeň TR42 produkuje látky ovplyvňujúce pľúcny mikrobióm a ľudské monocytické bunky z línie THP-1.

10 Zoznam použitej literatúry

- ABLORDEPPEY, S.Y., FAN, P., ABLORDEPPEY, J.H. MARDENBOROUGH, L. 1999. Systemic antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: Current status and emerging drugs in development. In *Current Medicinal Chemistry*. ISSN 0929-8673, vol. 6, no. 12, p. 1151-1195.
- ATAIEKHORASGANI, M., JAFARIPOZVE, N., ZAERIN, O. 2014. *Streptomyces* infection in Cushing syndrome: A case report and literature review. In *Advanced biomedical research*. ISSN 2277-9175, vol. 3, no. 26, p. 1-4.
- BACHMANN, B. O., VAN LANEN, S. G., BALTZ, R. H. 2014. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ISSN 1367-5435, vol. 41, no. 2, p. 175–184.
- BARBOSA, J., GIBBS, P. A., TEIXEIRA, P. 2010. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. In *Food Control*. ISSN 0956-7135, vol. 21, no. 5, p. 651-656.
- BENTLEY, S. D., CHATER, K. F., CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M., CHALLIS, G. L., THOMSON, N. R., JAMES, K. D., HARRIS, D. E., QUAIL, M. A., KIESER, H., HARPER, D., BATEMAN, A., BROWN, S., CHANDRA, G., CHEN, C. W., COLLINS, M., CRONIN, A., FRASER, A., GOBLE, A., HIDALGO, J., HORNSBY1, T., HOWARTH, S., HUANG, C.-H., KIESER, T., LARKE, L., MURPHY, L., OLIVER, K., O'NEIL, S., RABBINOWITSCH, E., RAJANDREAM, M.-A., RUTHERFORD, K., RUTTER, S., SEEGER, K., SAUNDERS, D., SHARP, S., SQUARES, R., SQUARES, S., TAYLOR, K., WARREN, T., WIETZORREK, A., WOODWARD, J., BARRELL B. G., PARKHILL, J., HOPWOOD, D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). In *Nature*. ISSN 0028-0836, vol. 417, p. 141-147.
- BERG, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. ISSN 0175-7598, vol. 84, no. 1, p. 11–18.
- BERGY, M. E., EBLE, T. E. 1968. Filipin Complex. In *Biochemistry*. ISSN 0006-2960, vol. 7 no. 2, p. 653–659.
- BERTRAM, R., SCHLICHT, M., MAHR, K., NOTHAFT, H., SAIER, M. H., TITGEMEYER, F. 2004. In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). In *Journal of Bacteriology*. ISSN 0021-9193 , vol. 186, no. 5, p. 1362–1373.
- BIGNELL, D., ANDERSON, J. 1991. Isolation of facultatively aerobic actinomycetes from the gut, parent soil and mound materials of the termites *Procupitermes aburiensis* and *Cubitermes severus*. In *FEMS Microbiology Letters*. ISSN 0378-1097, vl. 85, no. 2, p. 151–159.
- BODE, H. B., BETHE, B., HOF, R., ZEECK, A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. In *ChemBioChem*. ISSN 1439-4227, vol. 3, no. 7, p. 619–627.
- BOONE, R., CASTENHOLTZ, R., GARRITY, G. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. vyd. vol. 1. Springer-Verlag, New York, 2001, 722 s., ISBN 978-0-387-21609-6
- BOSSCHE, V. H. 1995. Chemotherapy of human fungal infections. In *Modern selective fungicides. Properties, applications, mechanism of action* /edited by Lyr, H. 2 vyd. Gustav Fisher Verlag, Jena, 1995, p. 431-484, ISBN 978-3-334-60455-7.
- BRAJTBURG, J., MEDOFF, G., KOBAYASHI, G. S., ELBERG, S., FINEGOLD, C. 1980. Permeabilizing and hemolytic action of large and small polyene antibiotics on human

erythrocytes. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. ISSN 0066-4804, vol. 18, no. 4, p. 586-592.

BROTZ-OESTERHELT, H., SASS, P. 2010. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. In *Future Microbiology*. ISSN 1746-0913, vol. 5, no. 10, p. 1553–1579.

CASADEVALL, A., SHUN FU, M., GUIMARAES, A. J., ALBUQUERQUE, P. 2019. The ‘Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence’ Hypothesis. In *Journal of Fungi*. ISSN 2309-608X, vol. 5, no. 1, p. 1-10.

CEDER, O., RYHAGE, R. 1964. The Structure of Filipin. In *Acta Chemica Scandinavica*. ISSN 0904-213X, vol. 18, no. 2, p. 558–561.

CLAESSEN, D., ROZEN, D. E., KUIPERS, O. P., SØGAARD-ANDERSEN, L., VAN WEZEL, G. P. 2014. Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. In *Nature Reviews Microbiology*. ISSN 1740-1534, vol. 12, no. 2, p. 115-124

COLLADO, M. C., RAUTAVA, S., AAKKO, J., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. In *Scientific Reports*. ISSN 2045-2322, vol. 6, no. 23129, p. 1-13.

COOMBS, J. T., FRANCO, C. M. M. 2003a. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. In *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 0099-2240, vol. 69, no. 9, p. 5603–5608.

COOMBS, J. T., FRANCO, C. M. M. 2003b. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. In *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 0099-2240, vol. 69, no. 7, p. 4260–4262.

CRANEY, A., OZIMOK, C., PIMENTEL-ELARDO, S. M., CAPRETTA, A., NODWELL, J. R. 2012. Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. In *Chemistry & Biology*. ISSN 1074-5521, vol. 19, no. 8, p. 1020–1027.

DE KRUIJFF, B., GERRITSEN, W.J., OERLEMANS, A., DEMEL, R. A. VAN DEENEN, L. M. M. 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. In *Biochimica et Biophysica Acta*. ISSN 0006-3002, vol. 339, no. 1, p. 30-43.

DE LIMA PROCÓPIOA, R. E., DA SILVAA, I. R., MARTINSA, M. K., DE AZEVEDOA, J. L., DE ARAÚJO, J. M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. In *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. ISSN 1413-8670, vol. 16, no. 5, p. 466-471

DEMAIN, A. L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. In *International Microbiology*. ISSN 1139-6709, vol. 1, p. 259-264.

DEUTICKE, B., KIM, M., ZOLNER, CH. 1973. The influence of amphotericin B on the permeability of mammalian erythrocytes to nonelectrolytes, anions and cations. In *Biochimica et Biophysica Acta*. ISSN 0006-3002, vol. 318, no. 3, p. 345-359.

DEVELOUX, M., DIENG, M. T., NDIAYE, B. 1999. Mycetoma of the neck and scalp in Dakar. In *Journal de Mycologie Médicale*. ISSN 1156-5233, vol. 9, no. 1, p. 179–209.

DINARELLO, C. A. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. In *Blood*. ISSN 0006-4971. vol. 77, no. 8, p. 1627–1652.

DINARELLO, C. A. 2018. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. In *Immunological reviews*. ISSN 1573-3955, vol. 281, no. 1, p. 8–27.

DUNCAN, K. R., CRÜSEMANN, M., LECHNER, A., SARKAR, A., LI, J., ZIEMERT, N., WANG, M., BANDEIRA, N., MOORE, B. S., DORRESTEIN, P. C., JENSEN, P. R. 2015. Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic

gene clusters and their products from *Salinispora* species. In *Chemistry & Biology*. ISSN: 1074-5521 vol. 22, no. 4, p. 460–471.

DUNNE, E. F., BURMAN, W. J., WILSON, M. L., 1998. *Streptomyces* pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection: case report and review of the literature on invasive *Streptomyces* infections. In *Clinical Infectious Diseases*. ISSN 1058-4838, vol. 27, no. 1, p. 93-96.

EDER, C. 2009. Mechanisms of interleukin-1beta release. In *Immunobiology*. ISSN 0171-2985, vol. 214, no. 7, p. 543–53.

ESNAULT, C., DULERMO, T., SMIRNOV, A., ASKORA, A., DAVID, M., DENISET-BESSEAU, A., HOLLAND I. B., VIROLLE, M. J. 2017. Strong antibiotic production is correlated with highly active oxidative metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. In *Scientific reports*. ISSN 2045-2322, vol. 7, no. 1, p. 1-10.

FALKOW, S. 2004. Host-Parasite Relationships. In *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases /edited by Kenneth J. Ryan, C. George Ray*. 4. vyd. McGraw-Hill, New York, 2004, 979 s. ISBN 978-0-8385-8529-0.

FERRERO-MILIANI, L., NIELSEN, O., ANDERSEN, P., GIRARDIN, S. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. In *Clinical and Experimental Immunology*. ISSN 0009-9104, vol. 147, no. 2, p. 227–235.

FLÄRDH, K., BUTTNER, M. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. In *Nature Reviews Microbiology*. ISSN 1740-1534, vol. 7, no. 1, p. 36-49

FRANCO, C. M. M., MICHELSEN, P., PERCY, N., CONN, V., LISTIANA, E., MOLL, S., LORIA, R., COOMBS, J. 2007. Actinobacterial endophytes for improved crop performance. In *Australasian Plant Pathology*. ISSN 0815-3191, vol. 36, no. 6, p. 524–531.

FUJIWARA, N., KOBAYASHI, K. 2005. Macrophages in Inflammation. In *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy*. ISSN 1568-010X, vol. 4, no. 3, p. 281-286.

GERBER, N. N., LECHEVALIER, H. A. 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. In *Applied Microbiology*, vol. 13, no. 6 p. 935-938.

GIMPL, G., GEHRIG-BURGER, K. 2011. Probes for studying cholesterol binding and cell biology. In *Steroids*, vol. 76, no. 3, p. 216–231.

GOMEZ-ESCRIBANO, J. P., BIBB, M. J. 2014. Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ISSN 1367-5435, vol. 41, no. 2, p. 425–431

GOODFELLOW, M. 2012. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In *Bergey's manual of systematic bacteriology /edited by Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig, William B. Whitman*. 2. vyd. vol. 5. Springer-Verlag, New York, 2012, 2083 s., ISBN 978-0-387-29298-4

GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T. 1983. Ecology of actinomycetes. In *Annual Review of Microbiology*. ISSN 0066-4227, vol. 37, p. 189–216

GOPALAKRISHNAN, S., SRINIVAS, V., SREE VIDYA, M., RATHORE, A. 2013. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. In *Springerplus*. ISSN 2193-1801, vol. 2, no. 574, p. 1-8.

GORDON, S., MARTINEZ-POMARES, L. 2017. Physiological roles of macrophages. In *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. ISSN 0031-6768, vol. 469, no. 3, p. 365–374.

GORDON, S., TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. In *Nature Reviews Immunology*. ISSN 1474-1741, vol. 5, no. 12, p. 953–964.

GUST, B., CHALLIS, G. L., FOWLER, K., KIESER, T., CHATER, K. F. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis

of the sesquiterpene soil odor geosmin. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 1091-6490, vol. 100, no. 4, p. 1541–1546

HARIR, M., BENDIF, H., BELLAHCENE, M., FORTAS, Z., POGNI, R. 2018. *Streptomyces* Secondary Metabolites. In *Basic Biology and Applications of Actinobacteria* /edited by Shymaa Enany, IntechOpen, London, 2018, p. 99 – 122, ISBN 978-1-78984-615-7

HASANI, A., KARIMINIK, A., ISSAZADEH, K. 2014. Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. In *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. ISSN 2322-4827, vol. 2, no. 1, p. 63-75.

HEINEKAMP, T., THYWISSEN, A., MACHELEIDT, J., KELLER, S., VALIANTE, V., BRAKHAGE, A. A. 2013. *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. In *Frontiers in Microbiology*. ISSN 1663-4365, vol. 3, no. 440, p. 1-7.

HOLZ, R. FINKELSTEIN, A. 1970. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. In *Journal of General Physiology*. ISSN 0022-1295, vol. 56, no. 1, p. 125-145.

HOPWOOD, D. A. 2006. Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. In *Annual Review of Genetics*. ISSN 0066-4197, vol. 40, p. 1-23.

HOPWOOD, D. A. 2007. How do antibiotic-producing bacteria ensure their selfresistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? In *Molecular Microbiology*. ISSN 0950-382X, vol. 63, no. 4, p. 937-940

HUANG, J., LIH, C. J., PAN, K. H., COHEN, S. N. 2001. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. In *Genes & Development*. ISSN 0890-9369, vol. 15, no. 23, p. 3183-3192.

CHALLIS, G. L. 2008. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. In *Microbiology*. ISSN 1350-0872, vol. 154, no. 6. p. 1555–1569.

CHAPLIN, D. D. 2010. Overview of the immune response. In *Journal of allergy and clinical immunology*. ISSN 0091-6749, vol. 125, no. 2, p. 1-43

CHATER, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. In *Annual Review of Microbiology*. ISSN 0066-4227, vol. 47, p. 685-713.

CHATER, K. F., BIRÓ, S., LEE, K. J., PALMER, T., SCHREMPF, H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. In *FEMS Microbiology Reviews*. ISSN 0168-6445 vol. 34, no. 2, p. 171–198.

CHEN, C. W. 2002. Once the circle has been broken. In *Trends in Genetics*. ISSN 0168-9525, vol. 18, no. 10, p. 522–529.

CHERTOV, O., YANG, D., HOWARD, O., OPPENHEIM, J. J. 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. In *Immunological Reviews*. ISSN 0105-2896, vol. 177, p. 68–78.

CHOULET, F., AIGLE, B., GALLOIS, A., MANGENOT, S., GERBAUD, C., TRUONG, C., FRANCOU, F. X., FOURRIER, C., GUÉRINEAU, M., DECARIS, B., BARBE, V., PERNODET, J. L., LEBLOND, P. 2006. Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. In *Molecular Biology and Evolution*. ISSN 0737-4038, vol. 23, no. 12, p. 2361-2369.

IKEDA, H., ISHIKAWA, J., HANAMOTO, A., SHINOSE, M., KIKUCHI, H., SHIBA, T., SAKAKI, Y., HATTORI, M., OMURA, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. In *Nature Biotechnology*. ISSN 1087-0156, vol. 21, no. 5, p. 526-531.

JAISWAL, A. K., ELAD, Y., PAUDEL, I., GRABER, E. R., CYTRYN, E., FRENKEL, O. 2017. Linking the belowground microbial composition, diversity and activity to soilborne

disease suppression and growth promotion of tomato amended with biochar. In *Scientific Reports*. ISSN 2045-2322, vol. 7, no. 44382, p. 1-17.

JOSHI, M. V., RONG, X., MOLL, S., KERS, J., FRANCO, C., LORIA, R. 2007. *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. In *Molecular Plant-Microbe Interactions*. ISSN 0894-0282, vol. 20, no. 6, p. 599–608.

JUNGES, R., SALVADORI, G., SHEKHAR, S., ÅMDAL, H. A., PERISELNERIS, J. N., CHEN, T., BROWN, J. S., PETERSEN, F. C. 2017. A Quorum-Sensing System That Regulates *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Formation and Surface Polysaccharide Production. In *mSphere*. ISSN 2379-5042, vol. 2, no. 5, p. 1-18.

KALTENPOTH, M., GÖTTLER, W., HERZNER, G., STROHM, E. 2005. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. In *Current Biology*. ISSN 0960-9822, vol. 15, no. 5, p. 475–479.

KAPADIA, M., ROLSTON, K. V. I., HAN, X. Y. 2007. Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. In *American Journal of Clinical Pathology*. ISSN 0002-9173, vol. 127, no. 4, p. 619-624.

KÄMPFER P. 2006. The family streptomycetaceae, part I: taxonomy. In *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* /edited by Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. 3 vyd., Springer-Verlag, New York, 2006, s. 538–604

KELEMEN, G. H., BUTTNER, M. J. 1998. Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. In *Current Opinion in Microbiology*. ISSN 1369-5274, vol. 2, no. 1, p. 656-662

KHAN, S. T., TAMURA, T., TAKAGI, M. & SHIN-YA, K. 2010. *Streptomyces tateyamensis* sp. nov., *Streptomyces marinus* sp. nov. and *Streptomyces haliclona* sp. nov., isolated from the marine sponge *Haliclona* sp. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. ISSN 1466-5026, vol. 60, no. 12, p. 2775–2779.

KHATTAB, I. A., BABIKER, H. E., SAEED, A. H. 2016. *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. In *International Current Pharmaceutical Journal*. ISSN 2224-9486, vol. 5, no. 3, p. 27-32.

KIESER, T., BIBB, M., BUTTNER, M., CHATER, K., HOPWOOD, D. 2000. General Introduction to Actinomycete Biology. In *Practical streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, 2000, 613 s., ISBN 0-7084-0623-8.

KIRBY, R., CHEN, C. W. 2011. Genome architecture. In *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology* /edited by Paul Dyson. 1. vyd. Caister Academic Press, Poole (UK), p. 5–26, ISBN 978-1-904455-77-6.

KNOPIK-SKROCKA, A., BIELAWSKI, J. 2002. The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. In *Cellular and Molecular Biology Letters*. ISSN 1425-8153, vol. 7, no. 1, p. 31-48.

KOTLER-BRAJTBURG, J., MEDOFF, G., KOBAYASHI, G. S., BOGSS, S., SCHLESSINGER, D., PANDEY, R., RINEHART, K. L. 1979. Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. ISSN 0066-4804, vol. 15, no. 5, p. 716-722.

KUTZNER, H. J. 1981. The family Streptomycetaceae. In *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria* /edited by Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. 2 vyd. Springer-Verlag, Berlin, 1981, p. 2028-2090, ISBN 978-0-387-08871-6.

LAMILLA, C., BRAGA, D., CASTRO, R., GUIMARÃES, C., DE CASTILHO, L. V. A., FREIRE, D. M. G., BARRIENTOS, L. 2018. *Streptomyces luridus* So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. In *PLoS ONE*. ISSN 1932-6203, vol. 13, no. 4, p. 1-20.

- LEE, H-J., WHANG, K-S. 2018. *Streptomyces fuscigenes* sp. nov., isolated from bamboo (*Sasa borealis*) litter. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. ISSN 1466-5026, vol. 68, p. 1541-1545
- LEE, M., DEMAINE, A. 1997. Effects of nitrogen source on production of antibiotics. In *Journal of Microbiology*. ISSN 1225-8873, p. 412-422.
- LOPES, S., CASTANHO, M. A. R. B. 2002. Revealing the Orientation of Nystatin and Amphotericin B in Lipidic Multilayers by UV-Vis Linear Dichroism. In *The Journal of Physical Chemistry B*. ISSN 1520-6106, vol. 106, p. 7278-7282.
- LORIA, R., COOMBS, J., YOSHIDA, M., KERS, J., BUKHALID, R. 2003. A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. In *Physiological and Molecular Plant Pathology*. ISSN 0885-5765, vol. 62, no. 2, p. 65 –72.
- MADIGAN, M. T., CLARK, D. P., STAHL, D., MARTINKO, J. M. 2010. Brock biology of microorganisms. 13. vyd. Benjamin Cummings, San Francisco, 2010, 1152 s., ISBN 978-0321649638
- MANTECA, A., SANCHEZ, J. 2010. Streptomyces developmental cycle and secondary metabolite production. In Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology /edited by A. Mendez-Vilas. 1 vyd. Formatex Research center, Badajoz, 2010, 788 s., ISBN 978-84-614-6194-3
- MARTINON, F., BURNS, K., TSCHOPP, J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. In *Molecular Cell*. ISSN 1097-2765, vol. 10, no. 2, p. 417–26.
- MASAND. M., SIVAKALA, K. K., MENGHANI, E., THINESH, T., ANANDHAM, R., SHARMA, G., SIVAKUMAR, N., JEBAKUMAR, S. R. D., JOSE, P. A. 2018. Biosynthetic Potential of Bioactive *Streptomyces* Isolated From Arid Region of the Thar Desert, Rajasthan (India). In *Frontiers in Microbiology*. ISSN 1664-302X, vol. 9, p. 1-11.
- MCNEIL, M. M., BROWN, J. M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. In *Clinical Microbiology Reviews*. ISSN 0893-8512, vol. 7, no. 3, 357–417.
- MEDZHITOV, R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. In *Cell*. ISSN 0092-8674, vol. 140, no. 6, p. 771–776.
- MIGUELEZ, E. M., HARDISSON, C., MANZANAL, M. B. 1999. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. In *Journal of Cell Biology*, vol. 145, no. 3, p. 515-525.
- MUKHTAR, H., IJAZ, S., UL-HAQ, I. 2012. Production of antitumor antibiotic by *Streptomyces capoamus*. In *Pakistan Journal of Botany*. ISSN 0556-3321, vol. 44, no. 1, p. 445-452.
- MUTH, G., NUßBAUMER, B., WOHLLEBEN, W., PÜHLER, A. 1989. A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. In *Molecular Genetics and Genomics*. ISSN 1617-4615, vol. 219, no. 3, p. 341–348.
- NICHOLLS, P. K., ALLEN, G., IRWIN, P. J. 2014. *Streptomyces cyaneus* dermatitis in a dog. In *Veterinary Journal*. ISSN 1090-0233, vol. 92, no. 1-2, p. 38-40.
- NICHOLLS, P. K., ALLEN, G., IRWIN, P. J. 2014. *Streptomyces cyaneus* dermatitis in a dog. In *Veterinary Journal*. ISSN 1090-0233, vol. 92, no. 1-2, p. 38-40.
- OHNISHI, Y., ISHIKAWA, J., HARA, H., SUZUKI, H., IKENOYA, M., IKEDA, H., YAMASHITA, A., HATTORI, M., HORINOUCI, S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. In *Journal of Bacteriology*. ISSN 0021-9193, vol. 190, no. 11, p. 4050-4060.

- OMURA, S., IKEDA, H., ISHIKAWA, J., HANAMOTO, A., TAKAHASHI, C., SHINOSE, M., TAKAHASHI, Y., HORIKAWA, H., NAKAZAWA, H., OSONOE, T., KIKUCHI, H., SHIBA, T., SAKAKI, Y., HATTORI, M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 1091-6490, vol 98, no. 21, p. 12215-12220.
- ONAKA, H., MORI, Y., IGARASHI, Y., FURUMAI, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. In *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 0099-2240, vol. 77, no. 2, p. 400–406.
- OSIPOV, G. A., VERKHOVTSEVA, N. V. 2011. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers. In *Beneficial Microbes*. ISSN 1876-2883, vol. 2, no. 1, p. 63-78.
- PARK, S. Y., KANG, H. O., JANG, H. S., LEE, J. K., KOO, B. T., YUM, D.Y. 2005. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. In *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 0099-2240, vol. 71, no. 5, p. 2632-2641.
- PASTI, M. B., POMETTO, A. L., NUTI, M. P., CRAWFORD, D. L. 1990. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. In *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 0099-2240, vol. 56, no. 7, p. 2213– 2221.
- PASTI, M., BELLI, M. L. 1985. Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. In *FEMS Microbiology Letters*. ISSN 0378-1097, vol. 26, no. 1, p. 107– 112.
- PAYERO, T. D., VICENTE, C. M., RUMBERO, Á., BARREALES, E. G., SANTOS-ABERTURAS, J., DE PEDRO, A., APARICIO, J. F. 2015. Functional analysis of filipin tailoring genes from *Streptomyces filipinensis* reveals alternative routes in filipin III biosynthesis and yields bioactive derivatives. In *Microbial cell factories*. ISSN 1475-2859, vol. 14, no. 114, p. 1-14.
- PICCIOLI, P., RUBARTELLI, A. 2013. The secretion of IL-1 β and options for release. In *Seminars in Immunology*. ISSN 1044-5323, vol. 25, no. 6, p. 425–429.
- PICK, N., CAMERON, S., ARAD, D., AV-GAY, Y. 2004. Screening of Compounds Toxicity against Human Monocytic cell line-THP-1 by Flow Cytometry. In *Biological Procedures Online*. ISSN 1480-9222, vol. 6, no. 1, p. 220-225.
- POSPÍCHAL, P. 2018. Interakce streptomycet izolovaných z lidských tkání s buňkami savčího imunitního systému (Diplomová práce).
- QUINTANA, E. T., WIERZBICKA, K., MACKIEWICZ, P., OSMAN, A., FAHAL, H. A., HAMID, E. M., ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J., MALDONADO, A. L., GOODFELLOW, M. 2008. *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. In *Antonie van Leeuwenhoek*. ISSN 0003-6072, vol. 93, no. 3, 305-313.
- RAJESH, T., JEON, J. M., KIM, Y. H., KIM, H. J., YI, S. H., PARK, S. H., CHOI, K. Y., KIM, Y. G., KIM, J., JUNG, S., PARK, H. Y., YANG, Y. H. 2013. Functional analysis of the gene *SCO1782* encoding *Streptomyces* hemolysin (S-hemolysin) in *Streptomyces coelicolor* M145. In *Toxicon*. ISSN 0041-0101, vol. 71, p. 159-165.
- RAO, X., ZHONG, J., SUN, Q. 2014. The heterogenic properties of monocytes/macrophages and neutrophils in inflammatory response in diabetes. In *Life Sciences*. ISSN 0024-3205, vol. 116. no. 2, p. 59–66.
- REN, K., TORRES, R. 2009. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. In *Brain research reviews*. ISSN 0165-0173, vol. 60, no. 1, p. 57–64.

- ROBB, C. T., REGAN, K. H., DORWARD, D. A., ROSSI, A. G. 2016. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. In *Seminars in Immunopathology*. ISSN 1863-2297, vol. 38, no. 4, p. 425–448
- ROMERO, D., TRAXLER, M. F., LOPEZ, D., KOLTER, R. 2011. Antibiotics as signal molecules. In *Chemical Reviews*. ISSN 0009-2665, vol. 111, no. 9, p. 5492–5505.
- RYAN, J. K., RAY, C. G. 2004. Principles of Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. In *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases /edited by Kenneth J. Ryan, C. George Ray*. 4. vyd. McGraw-Hill, New York, 2004, 979 s. ISBN 978-0-8385-8529-0.
- SADEGHI, A., KARIMI, E., DAHAJI, P. A., JAVID, M. G., DALVAND, Y., ASKARI, H. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. ISSN 0959-3993, vol. 28, no. 4, p. 1503–1509.
- SALLA, T. D., RAMOS DA SILVA, T., ASTARITA, L. V., SANTARÉM, E. R. 2014. *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. In *Plant Physiology and Biochemistry*. ISSN 0981-9428, vol. 85, p. 14–20.
- SAMBROOK, J. RUSSELL, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2, vyd. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. ISBN 0879695765.
- SEIPKE, R. F., KALTENPOTH, M., HUTCHINGS, M. I. 2011. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? In *FEMS Microbiology Reviews*. ISSN 0168-6445, vol. 36, no. 2012, p. 862-876.
- SCHÄFER, A., KONRAD, R., KUHNIGK, T., KÄMPFER P, HERTEL, H., KÖNIG, H. 1996. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. In *Journal of Applied Microbiology*. ISSN 0021-8847, vol. 80, no. 5, p. 471–478.
- SCHIRAWSKI, J., PERLIN, M. H. 2018. Plant-Microbe Interaction 2017-The Good, the Bad and the Diverse. In *International journal of molecular sciences*. ISSN 1422-0067, vol. 19, no. 1374, p. 1-6
- SCHROECKH, V., SCHERLACH, K., NUTZMANN, H. W., SHELEST, E., SCHMIDT-HECK, W., SCHUEMANN, J., MARTIN, K., HERTWECK, C., BRAKHAGE, A. A. 2009. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 1091-6490, vol. 106, no. 34, p. 14558–14563
- SMANSKI, M. J., PETERSON, R. M., RAJSKI, S. R., SHEN, B. 2009. Engineered *Streptomyces platensis* strains that overproduce antibiotics platensimycin and platencin. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, no. 4, p. 1299–1304.
- STRAMER, B. M., MORI, R., MARTIN, P. 2007. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. In *Journal of Investigative Dermatology*. ISSN 0022-202X, vol. 127, no. 5, p. 1009–1017.
- STUDHOLME, J. D. 2016. Genome Update. Let the consumer beware: *Streptomyces* genome sequence quality. In *Microbial Biotechnology*. ISSN 1751-7907, vol. 9, no. 1, p. 3-7
- SUTHINDHIRAN, K., KANNABIRAN, K. 2009. Hemolytic activity of *Streptomyces* VITSDK1 spp. isolated from marine sediments in Southern India. In *Journal de Mycologie Médicale*. ISSN 1156-5233, vol. 19, no. 2, p. 77-86.
- SUTTERWALA, F. S., OGURA, Y., SZCZEPANIK, M., LARA-TEJERO, M., LICHTENBERGER, G. S., GRANT, E. P., BERTIN, J., COYLE, A. J., GALÁN, J. E., ASKENASE, P. W., FLAVELL, R. A. 2006. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. In *Immunity*. ISSN 1074-7613, vol. 24. no. 3 p. 317–27.

- TAKEUCHI, O., AKIRA, S. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In *Cell*. ISSN 0092-8674, vol. 140, no. 6, p. 805–820.
- TANAKA, Y., KASAHARA, K., HIROSE, Y., MURAKAMI, K., KUGIMYIA, R., OCHI, K. 2013 Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes. In *Journal of Bacteriology*. ISSN 0021-9193, vol. 195, no. 13, p. 2959-2970
- THOMPSON, B. J., WIDDICK, D. A., HICKS, M. G., CHANDRA, G., SUTCLIFFE, I. C., PALMER, T., HUTCHINGS, M. I. 2010. Investigating lipoprotein biogenesis and function in the model Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor*. In *Molecular Microbiology*. ISSN 0950-382X, vol. 77, no. 4, p. 943–956.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y. 1980. Establishment and characterization of a Human acutemonocytic leukaemia cell line (THP-1). In *International Journal of Cancer*. ISSN 0020-7136, vol. 26, no. 2, p. 171–176.
- UREM, M., VAN ROSSUM, T., BUCCA, G., MOOLENAAR, F. G., LAING, E., et al. 2016. OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the Dormancy Regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* Control Overlapping Regulons. In *mSystems*. ISSN 2379-5077, vol. 1, no. 3, p. 1-21
- VAN LINTHOUT, S., MITEVA, K., TSCHÖPE, C. 2014. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 102, no. 2, p. 258–269.
- VETSIGIAN, K., JAJOO, R., KISHONY, R. 2011. Structure and evolution of *Streptomyces* interaction networks in soil and in silico. In *PLOS Biology*. ISSN 1544-9173, vol. 9, no. 10, p. 1-12
- WALTON, S., MARTIN, P., TOLSON, C., PLUMRIDGE, S., BARRS, V. R. 2015. Orbital actinomycotic mycetoma caused by *Streptomyces cinnamoneus*. In *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*. ISSN 2055-1169, vol. 1, no. 1, p. 1-5.
- WALTON, S., MARTIN, P., TOLSON, C., PLUMRIDGE, S., BARRS, V. R. 2015. Orbital actinomycotic mycetoma caused by *Streptomyces cinnamoneus*. In *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*. ISSN 2055-1169, vol. 1, no. 1, p. 1-5.
- WATVE, M. G., TICKOO, R., JOG, M. M., BHOLE, B. D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? In *Archives of Microbiology*. ISSN 0302-8933, vol. 176, p. 386-390.
- WEBER, T., WELZEL, K., PELZER, S., VENTE, A., WOHLLEBEN, W. 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. In *Journal of Biotechnology*. ISSN 0168-1656, vol. 106, p. 221–232.
- WINNIPS, C., BALMER, J. A. 2010. Intravaginal pentamycin for the treatment of bacterial vaginosis. In *International Journal of Infectious Diseases*. ISSN 1201-9712, vol. 14, no. 1, p. 195.
- WYATT, M. A., WANG, W., ROUX, CH. M., BEASLEY, F. C., HEINRICHS, D. E., DUNMAN, P. M., MAGARVEY, N. A. 2010. *Staphylococcus aureus* Nonribosomal Peptide Secondary Metabolites Regulate Virulence. In *Science*. ISSN 1095-9203, vol. 329, no. 5989, p. 294-296.
- XU, Z., WANG, Y., CHATER, K. F., OU, H.-Y., XU, H. H., DENG, Z., TAO, M. 2017. Large-scale transposition mutagenesis of *Streptomyces coelicolor* identifies hundreds of genes influencing antibiotic biosynthesis. In *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 0099-2240, vol. 83, no. 6, p. 1-16.
- YAMANAKA, K., OILAWA, H., OGAWA, H. O., HOSONO, K., SHINMACHI, F., TAKANO, H., SAKUDA, S., BEPPU, T., UEDA, K. 2005. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. In *Microbiology*. ISSN 1350-0872, vol. 151, no. 9, p. 2899–2905.

- YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H., CHUN, J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. ISSN 1466-5026, vol. 67, no. 5, p. 1613-1617.
- ZHAO, X. Q., LI, W. J., JIAO, W. C., LI, Y., YUAN, W. J., ZHANG, Y. Q., KLENK, H.-P., SUH, J. W., BAI, F. W. 2009. *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. ISSN 1466-5026, vol. 59, no. 11, p. 2870– 2874.
- ZHOU, S., SONG, L., MASSCHELEIN, J., SUMANG, F. A. M., PAPA, I. A., ZULAYBAR, T. O., CUSTODIO, A. B., ZABALA, D., ALCANTARA, E. P., DE LOS SANTOS, E. L. C., CHALLIS, G. L. 2019. Pentamycin Biosynthesis in Philippine *Streptomyces* sp. S816: Cytochrome P450-Catalyzed Installation of the C-14 Hydroxyl Group. In *ACS Chemical Biology*. ISSN 1554-8929, vol. 14, no. 6, p. 1305-1309
- ŽLÁBKOVÁ, Z. 2018. Charakterizace antibiotických aktivit nepatogenních streptomycet izolovaných z lidských tkání (Bakalárska práca).