

Multibakteriocinogenní kmeny *Escherichia coli*

Bc. Lucie Pospíšilová

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Pospíšilová**
Osobní číslo: **T15376**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Multibakteriocinogenní kmeny *Escherichia coli***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište bakterii *Escherichia coli* z hlediska jejich fyziologických vlastností, její význam a výskyt.
2. Charakterizujte koliciny a mikrocinny.
3. Popište vlastnosti multibakteriocinogenních kmenů *Escherichia coli*.
4. Popište bioinformatické metody analýzy bakteriálního genomu.

II. Praktická část

1. Detekce bakteriocinogenie u kmenů *Escherichia coli* izolovaných ze zvířiny.
2. Bakteriocinotypizace u produkčních kmenů metodou PCR.
3. Příprava surového kolicinu a vytipování vhodného kmene pro následné aplikace.
4. Sekvence a analýza genomů vybraných kmenů *Escherichia coli* izolovaných ze zvířiny.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] M. A. RILEY and O. GILLOR. Research and applications in bacteriocins. Wymondham: Horizon Bioscience, 2007. ISBN 9781904933236. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=pQyRyldm7O0C&pg=PA1&lpg=PA1&dq=riley+research+bacteriocin>
- [2] C. J. WALSH, C. M. GUINANE, C. HILL, R. P. ROSS, P.W. O'TOOLE a P. D. COTTER. In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. BMC Microbiology, 2015, vol. 15, issue 1. DOI: 10.1186/s12866-015-0515-4. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-015-0515-4>
- [3] D. M. GORDON and C. L. O'BRIEN. Bacteriocin diversity and frequency of multiple bacteriocin production in Escherichia coli. Microbiology, 2006, vol. 152. DOI: 10.1099/mic.0.28690-0. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28690-0>
- [4] E. CASCALES, S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, C. KLEANTHOS, R. LLOUBES, K. POSTLE, M. RILEY, S. SLATIN and D. CAVARD. Colicin Biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, vol. 71, issue 1. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06.
- [5] U. BLASZCZYK and J. MOCZARNY. Bacteriocins of Gram-negative bacteria – structure, mode of action and potential applications. Postepy Mikrobiologii. 2016, vol. 55 issue 2. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/303366815_Bacteriocins_of_Gram-negative_bacteria_-_structure_mode_of_action_and_potential_applications

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

28. dubna 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: *Pospíšilová Lucie*

Obor: *Technologie
potravin*

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně *24.4.2017*


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla za výdělkem jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělkem dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Escherichia coli se řadí mezi nejdůležitější střevní bakterie, které běžně obývají trávicí trakt teplokrevných živočichů, včetně člověka. Jedním z mechanismů, kterým si dobývá pozici v rámci mikrobiální populace je produkce antimikrobiálních látek – bakteriocinů. V praktické části práce byla u 15 kmenů *Escherichia coli* izolovaných ze zvířiny provedena detekce bakteriocinogenie. U 14 z 15 kmenů byla zjištěna schopnost produkce bakteriocinů, tyto produkční kmeny byly následně typizovány. Celkem 13 z testovaných 15 kmenů bylo multiprodukčních. Nejčastěji se vyskytujícími bakteriociny byly koliciny B, M, Ia/Ib a mikrocín B17. Byly vybrány čtyři kmeny, u kterých byl připraven roztok surové směsi bakteriocinů, a jejich antimikrobiální účinnost byla testována také kvantitativně. Kmen S7 s nejvyšším titrem byl vytipován pro následný aplikační výzkum. Ke studiu genotypových vlastností byla dále použita základní bioinformatická analýza bakteriálních genomů u kmenů 225, S35 a 28. U multiprodukčního kmene 225 se pomocí online nástroje MUMmer potvrdila přítomnost těch typů bakteriocinů, které byly zjištěny PCR typizací. Navíc byl v genomu nalezen gen pro mikrocín V u kmenů 225 i 28. Genomická analýza tudíž odhalila nové výsledky, které dokazují, že sekvenační data jsou nejpřesnějším nástrojem analýzy genotypu.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, bakteriociny, multiprodukce, PCR, bioinformatika

ABSTRACT

Escherichia coli are one of the most important intestinal bacteria commonly found in the gastrointestinal tract of warm-blooded animals, including humans. One of the mechanisms by which conquers the position within the microbial population is the production of antimicrobial substances - bacteriocins. In the practical part of the work, in 15 strains of *Escherichia coli* isolated from venison were performed detection of bacteriocinogeny. In 14 of 15 strains was found ability to production of bacteriocins and then these production strains were identified. A total 13 of the 15 tested strains were multi-productive. The most frequently produced bacteriocins were colicins B, M, Ia/Ib and microcin B17. Four strains were selected for preparation of crude mixture of bacteriocins and their antimicrobial activity was quantitatively determined. Strain S7 with the highest titre was chosen for successive application research. Basic bioinformatic analysis of bacterial genomes in strains 225, S35 and 28 was used to study the genotypic properties. The MUMmer online tool confirmed presence of those bacteriocin types, which were found by PCR in the multiproduction strain 225. In addition, a gene for microcin V was found in the genome in strains 225 and 28. Genomic analysis thus revealed new results and show that sequencing data are the most accurate tool for genotype analysis.

Keywords: *Escherichia coli*, bacteriocins, multiproduction, PCR, bioinformatics

Chtěla bych touto cestou poděkovat vedoucí mé diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D., za odborné vedení, rady a připomínky ke zpracovanému tématu. Také bych chtěla poděkovat laborantce Bc. Veronice Kučabové a Ing. Sylvii Jurečkové za pomoc v laboratoři. Dále děkuji Mgr. Michalovi Strouhalovi, Ph.D. a Mgr. Darině Čejkové, Ph.D. za odborné konzultace v oblasti bioinformatické analýzy bakteriálních genomů. V neposlední řadě patří dík mému příteli a rodině za oporu při psaní diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BAKTERIE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	13
1.1 CHARAKTERISTIKA.....	13
1.2 MORFOLOGIE	13
1.3 VÝZNAM A VÝSKYT.....	14
1.4 GENOM <i>E. COLI</i>	15
1.5 FYLOGENETICKÉ SKUPINY	16
2 BAKTERIOCINY	17
2.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ	17
2.2 KOLICINY	18
2.2.1 Klasifikace kolicinů	18
2.2.2 Struktura kolicinů.....	21
2.2.3 Syntéza kolicinů	22
2.3 MIKROCINY.....	23
2.4 VÝZNAM BAKTERIOCINŮ <i>E. COLI</i>	26
2.5 MULTIBAKTERIOCINOGENNÍ KMENY <i>E. COLI</i>	27
3 METODY ANALÝZY BAKTERIÁLNÍHO GENOMU	30
3.1 SEKVENOVÁNÍ.....	31
3.1.1 Klasické sekvenování.....	31
3.1.2 Sekvenování nové generace	32
3.2 KOMPLETACE SEKVENCÍ GENOMU (GENOME ASSEMBLY)	33
3.3 BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA POMOCÍ DATABÁZÍ	34
3.3.1 NCBI	35
3.3.2 EMBL-EBI.....	35
3.4 ALINGMENT	35
3.5 RAST.....	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
4 CÍL PRÁCE	39
5 MATERIÁL A METODY	40
5.1 MATERIÁL.....	40
5.1.1 Kultivační média a roztoky	40
5.1.2 Chemikálie	41
5.1.3 Laboratorní přístroje.....	42
5.1.4 Bakteriální kmeny	42
5.2 METODY.....	43
5.2.1 Stanovení produkce bakteriocinů	43
5.2.2 Bakteriocinotypizace.....	44
5.2.3 Analýza genomu <i>E. coli</i>	46
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	48

6.1	DETEKCE BAKTERIOCINOGENIE	48
6.2	BAKTERIOCINOTYPIZACE POMOCÍ PCR.....	50
6.3	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ	54
6.4	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BAKTERIÁLNÍHO GENOMU	55
ZÁVĚR		60
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		62
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		72
SEZNAM OBRÁZKŮ		75
SEZNAM TABULEK.....		76
SEZNAM PŘÍLOH.....		77

ÚVOD

Bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) z čeledi *Enterobacteriaceae* patří mezi nejdůležitější střevní bakterie, které běžně obývají trávicí trakt teplokrevných živočichů, včetně člověka. Z tohoto důvodu je využívána jako indikátorový organismus fekálního znečištění v prostředí, v pitné vodě a potravinách.

E. coli je nejlépe prostudovaným bakteriálním druhem a slouží jako modelový organismus pro genové a klinické studie. V obecné bakteriologii bývá používána jako modelový organismus pro studii buněčných struktur, růstu a metabolismu. Později se stala důležitým vehikulem pro klonování genů z prokaryotních a eukaryotních buněk a pro expresi genových produktů. *E. coli* se řadí mezi podmíněné patogeny a její přítomnost u člověka je fyziologická pouze ve střevech. Mimo střevo může být tato bakterie původcem řady onemocnění, např. průjemových infekcí, bakteriemií, a z důvodu jejich vysoké rezistence vůči antibiotikům jsou také považovány za časté původce nozokomiálních infekcí.

Člověku je *E. coli* jako součást běžné mikroflóry prospěšná, neboť je schopná produkce některých vitamínů, zejména vitamínů B₁₂, K₁, K₂ a také je schopna produkce látek antimikrobiální povahy - bakteriocinů, kterými brání rozšíření patogenních bakterií.

Bakteriociny jsou rozmanitou skupinou látek bílkovinné povahy, které produkují různé bakteriální druhy. Přináší svým producentům jisté výhody oproti konkurenčním druhům a jsou schopné usmrtit senzitivní buňky stejného, nebo příbuzného kmenu. Tyto látky jsou známy už několik desetiletí a nejvíce probádanými bakteriociny jsou bezpochyby koliciny, které jsou produkovány mnoha kmeny *E. coli* a příbuznými druhy čeledi *Enterobacteriaceae*. Další skupinou antimikrobiálních proteinů, kterou produkují bakterie *E. coli*, jsou mikrocin.

V současné době jsou bakteriociny předmětem zvýšené pozornosti v několika oblastech, např. potenciální náhrada za antibiotika, součást probiotických přípravků nebo jako přírodní konzervační látky. Bakteriociny reagují s citlivými kmeny bakterií, avšak mohou být toxické i pro eukaryotické buňky. Určitá podobnost s protinádorovými antibiotiky vedla k pokusům s jednotlivými buněčnými liniemi. Výsledkem bylo zjištění, že buňky nádorově transformované reagují na bakteriociny mnohem citlivěji a byl tak prokázán jejich účinek v boji proti rakovinotvorným buňkám.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE *ESCHERICHIA COLI*

1.1 Charakteristika

Escherichia coli je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie, patřící do rodu *Escherichia*, klasifikována do čeledi *Enterobacteriaceae*, řádu *Enterobacteriales*, třídy *Gammaproteobacteria*, kmene *Proteobacteria* a domény *Bacteria* (Sedláček, 2007). Poprvé ji v roce 1885 ze stolice novorozenců izoloval německo-rakouský pediatr Theodor von Escherich (Mainil, 2013). *E. coli* se řadí mezi nejznámější a nejvýznamnější enterobakterie, které jsou využívány jako modelový organismus, jehož zkoumání neslouží jen k poznání samotné bakterie, ale také k pochopení obecných jevů a odvozování vlastností a vztahů platících i pro jiné organismy (Votava a kol., 2010). *E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí i zvířat, a zároveň je důležitým indikátorovým organismem v oblasti potravinářské hygieny, jelikož její výskyt ve vodě a v potravinách značí fekální znečištění (Šilhánková, 1995).

1.2 Morfologie

Na základě Gramova barvení řadíme *E. coli* ke gramnegativním bakteriím, které jsou v mikroskopu pozorovatelné jako tyčinky se zaoblenými konci, a podle vztahu ke kyslíku se řadí do největší bakteriální skupiny fakultativně anaerobních bakterií. Společným znakem této skupiny je zkvašování glukózy. *E. coli* dále zkvašuje laktózu a některé pentózy za vzniku kyselin, jako jsou např. kyselina mléčná, kyselina pyrohroznová, kyselina octová a kyselina mravenčí (Šilhánková, 1995).

E. coli redukuje nitrát, je oxidáza negativní, kataláza pozitivní. U většiny kmenů se vyznačuje produkcí indolu, na druhou stranu neprodukuje sirovodík. Těchto vlastností se využívá pro její identifikaci. Má respirační i fermentační metabolismus, jedná se tedy o chemoorganotrofní bakterie (Sedláček, 2007; Šilhánková, 1995).

E. coli mohou dosahovat délky 2 – 3 μm , šířky 0,6 μm a na svém povrchu nesou dva typy fimbrií. První typ fimbrií obsahuje hydrofobní protein fimbrin, který umožňuje bakteriím přichytit se na epitel hostitele a následně dochází ke kolonizaci. Tento první typ fimbrií je vysoce antigenní, protože obsahuje F antigeny. Sex pili jsou jiným typem fimbrií a hrají velice důležitou úlohu při konjugaci (Votava a kol., 2010).

Bakterie *E. coli* netvoří cysty ani spóry, pohyblivost je umožněna pomocí bičíků, nebo mohou být nepohyblivé. Podobně jako fimbrie jsou bičíky vysoce antigenní, jelikož

obsahují H antigeny (bičíkovité), které tvoří polymerizovaná bílkovina flagelin, bílkovina bohatá na lysin (Borriello a kol., 2005; Votava a kol., 2010).

E. coli se řadí mezi mezofilní mikroorganismy, jelikož její optimální teplota a čas pro růst je 37 °C/24 hod. Je však schopná růst i v teplotních rozmezích od 8 – 48 °C. Bakterie *E. coli* bez problému roste na běžných mikrobiologických živných půdách a je schopna vázat molekulární kyslík. Buněčná membrána *E. coli* je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu. Vnější membrána buňky obsahuje lipopolysacharid složený z lipidové dvojvrstvy, která obsahuje velké množství membránových proteinů a v závislosti na obsahu lipopolysacharidů na vnější membráně buňky, rostou *E. coli* na pevných půdách v charakteristických hladkých, lesklých, nebo suchých, vrásčitých a hrubých koloniích (Borriello a kol., 2005; Sedláček, 2007). *E. coli* tvoří na Endově nebo McConkey agaru kolonie purpurové barvy a na půdě XLD žluté kolonie. Některé kmeny je možno rozpoznat podle β – hemolýzy na krevním agaru z důvodu produkce hemolysinů (Votava a kol., 2010). V tekutých půdách *E. coli* tvoří zákal, který je homogenní a po 12 - 18 hodinách spontánně aglutinuje a sedimentuje na dno zkumavky (Borriello a kol., 2005).

1.3 Význam a výskyt

Bakterie *E. coli* je běžnou součástí normální střevní flóry v koncové střevní části u lidí a teplokrevných živočichů. Je vylučována s exkrementy a může přežívat v prostředí mimo lidské tělo (Borriello a kol., 2005; Klaban, 2005).

E. coli vyskytující se běžně v dolní části trávicího ústrojí teplokrevných živočichů jsou nepatogenní a přispívají k fyziologickým poměrům udržováním vyvážených ekologických poměrů ve střevní flóře. Některé kmeny trvale osidlují trávicí soustavu, jiné kmeny trávicím ústrojím pouze procházejí. Dále makroorganismu přispívají tím, že odbourávají některé nestravitelné zbytky potravy, tvoří vitamín K a částečně i komplex vitamínu B.

Díky své schopnosti produkovat bakteriociny si zvyšují svou šanci na osídlení střeva. Bakteriociny působí antimikrobiálně vůči blízkce příbuzným druhům či rodům, k nimž mohou patřit také potencionálně patogenní či patogenní bakterie (Votava, 2003; Zahradnický a kol, 1987; Zbořil a Moss, 2005).

Ve vnějším prostředí je *E. coli* ve většině případů podmíněně patogenní a má schopnost vyvolávat různé typy infekcí, např. střevní infekce, jako jsou průjemová onemocnění u kojenců, dětí a starších osob, dále mohou způsobovat i močové infekce. K infekcím dochází fekálně orální cestou po požití kontaminované vody, kontaminovaného syrového

nebo nedostatečně tepelně upraveného masa, nepasterizovaného mléka a výrobků z nepasterizovaného mléka, dalšími zdroji infekce můžou být nedostatečně omytá zelenina a ovoce (Kaper a kol., 2004; Votava, 2003).

E. coli je významným indexovým a indikátorovým mikroorganismem využívaným v potravinářství. Její přítomnost v potravinách a ve vodě je považována za ukazatel fekálního znečištění a za důležitý parametr v hygieně potravin a vody. Bakterie indikují spolehlivost provedení pasterace, určují primární i sekundární kontaminaci potravin a správně provedenou sanitaci. V oblasti hygieny vody, slouží jako indexové organismy pro možný výskyt patogenních bakterií, např. patogenního rodu *Salmonella* (Borriello a kol., 2005; Šilhánková, 1995). *E. coli* může způsobovat nozokomiální infekce včetně meningitid a septikémií a v posledních letech se rovněž používá jako indikátor výskytu rezistence k antimikrobiálním látkám v různých typech prostředí (Sedláček, 2007; Sørum a Sunde, 2001).

Patogenita *E. coli* je určována schopností bakterie adherovat pomocí fimbrií na epitel hostitele. Některé kmeny mohou pronikat do epiteliálních buněk a poškozovat je, jiné kmeny produkují enterotoxiny, proteázy inaktivující IgA, hemolyziny a siderofory (Votava a kol., 2003; Votava, 2005). Kmeny *E. coli* patogenní pro teplotokrevné živočichy zahrnují kromě dalších čtyř hlavní skupiny: enteropatogenní (EPEC), enteroinvazivní (EIEC), enterotoxigenní (ETEC) a Shiga toxin produkující (STEC) *E. coli* (Johnson, 1991; Russo a Johnson, 2000; Šilhánková, 1995).

1.4 Genom *E. coli*

Bakteriálním genomem se rozumí veškerá genetická informace uložená většinou v kružnicové molekule dvouřetězcové deoxyribonukleové kyseliny (DNA), ve které je genetická informace zapsána v pořadí čtyř nukleotidů. Nukleotid se skládá z cukru deoxyribózy, fosfátové skupiny a nukleotidových bází – adeninu (A), cytozinu (C), thyminu (T) a guaninu (G). Jinak řečeno, genom organismu je kompletní sekvence DNA. Bakteriální genom se skládá z bakteriálního chromozomu a plazmidů, které však nemusí každá buňka obsahovat. Chromozom není uložen v jádře a postrádá histony pro navázání DNA. Jednotka délky DNA na úrovni její sekvence je báze pár (bp), (Rosypal, 1998; Volf a kol., 1997).

Stanovit sekvenci bakteriálního genomu se podařilo poprvé v roce 1995 a od té doby bylo dokončeno velké množství kompletních sekvenčních analýz genomů u různých kmenů

bakterií. Bakteriální genom může být rozdělen na dvě složky podle postradatelnosti genů pro buňky na esenciální a přídavné geny. Esenciální geny jsou nezbytné pro základní životní funkce buňky. Kódují proteiny, které jsou klíčové pro metabolismus – např. ATPázy, a dále jsou to geny pro syntézu a replikaci molekul DNA a RNA. Přídavné geny jsou pro buňku postradatelné, většinou jí však pomáhají přežít a přizpůsobit se v obtížných podmínkách. Přídavné geny reprezentují rozmanitost bakteriálního druhu, neboť kódují proteiny potřebné pro adaptaci bakterií v různých prostředích. Je pro ně také typický odlišný obsah GC párů než ve zbytku genomu, což je často dáno tím, že mají původ v jiných druzích bakterií (Lindsay a Holden, 2004; Volff a kol., 1997).

V roce 1997 byl Blattnerem a kol. přečten a následně publikován kompletní genom kmene K12. Velikost genomu jednotlivých kmenů *E. coli* se liší a pohybuje se v řádu 4,6 – 5,2 Mb s přibližně 4000 - 5500 geny kódujícími proteiny. Geny vyskytující se u většiny kmenů se nazývají perzistentní, tvoří necelé dvě třetiny genomu *E. coli* a význam většiny z nich je znám. Zbytek připadá na tzv. nestálé geny. Vzhledem k poměrně velké rozmanitosti escherichií je problematické zvolit kmen, který by byl vhodným vzorovým reprezentantem svého druhu. Zisk nebo ztráta genů hraje roli v rozdílu mezi komenzály a patogeny (Blattner a kol., 1997; Le Gall a kol., 2007; Touchon a kol., 2009).

1.5 Fylogenetické skupiny

U bakterie *E. coli* byly populační genomovou studií prokázány čtyři hlavní fylogenetické skupiny: A, B1, které jsou považovány za sesterské, B2, která podle některých publikací reprezentuje rodovou linii *E. coli*, a skupina D. V současnosti se objevují i další potenciální skupiny. Fylogenetické skupiny bývají spojeny s prostředím, diagnózou, určitými vlastnostmi, např. s počtem faktorů virulence nebo přítomností určitých β -laktamáz. Střevní *E. coli* se většinou řadí do fylogenetické skupiny A nebo B1, zatímco většina extraintestinálních kmenů *E. coli* náleží do skupiny B2 nebo D (Gordon a kol., 2008; Le Gall a kol., 2007). K rozlišení se velmi dobře dá použít systém multiplex PCR, zavedený Clermontem (Clermont a kol., 2000).

2 BAKTERIOCINY

2.1 Charakteristika bakteriocinů

Bakteriociny jsou rozmanitá skupina proteinů/peptidů bakteriálního původu, které vznikají syntézou na ribozomech. Produkce těchto látek přináší bakteriím selekční výhodu oproti konkurenčním bakteriálním druhům sdílejícím stejnou mikroekologickou niku. Jedná se o látky antimikrobiální povahy a jejich baktericidní je obvykle zacílen na blízkce příbuzné kmeny stejného druhu nebo rodu (Cornut a kol., 2008; Riley a Wertz, 2002). Bakteriociny již v roce 1925 poprvé popsal André Gratia, který pozoroval toxické působení kmene *E. coli* V na kmen *E. coli* ϕ (Gratia, 1925). V průběhu dalších let byly bakteriociny objeveny u mnohých bakteriálních druhů, dokonce u některých zástupců *Archaea*. Dnes jsou považovány za nejrozmanitější a přirozeně nejpočetnější skupinu antimikrobiálních látek (Kaur, 2015; Riley a Wertz 2002; Shand a Leyva, 2008).

Produkcí bakteriocinů lze pozorovat v celé bakteriální říši a předpokládá se, že více než 99 % mikroorganismů má schopnost produkovat alespoň jeden bakteriocin (Cascales a kol., 2007; Cotter a kol., 2005). Bakteriociny tvoří rozmanitou skupinu s odlišnými vlastnostmi. Bakteriociny gram pozitivních bakterií, gram negativních bakterií a archeí se liší zejména v chemické struktuře, ve velikosti, a to od malých lantipeptidů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení až po velké proteiny kolicinů produkovaných gram negativními bakteriemi. Dále v jejich uvolnění a transportu přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu a ve způsobu usmrcení buňky (Riley, 1998; Riley a Wertz, 2002; Yang a kol., 2014). Některé znaky mají přesto bakteriociny společné. Oproti většině antibiotik, které vznikají jako sekundární produkty metabolismu, jsou všechny bakteriociny syntetizované na ribozomech. Zpravidla se jedná o vysokomolekulární proteiny antibiotické povahy, většina z nich je kódována na plazmidech. Dalším neméně důležitým rysem je jejich relativně úzké spektrum působení, které je dané přítomností specifických receptorů na povrchu buněk citlivého kmene (Gordon a O'Brien, 2006; Riley a Wertz, 2002; Yang a kol., 2014). Bakteriociny ovšem prokazatelně působí nejen na buňky prokaryotické, ale i eukaryotické, a to zejména na buňky nádorově transformované (Šmarda, 1978).

V současnosti jsou u gram negativních bakterií definovány tři základní skupiny bakteriocinů: koliciny, mikrocinu a korpuskulární bakteriociny. *E. coli* produkuje dva typy bakteriocinů, a to koliciny a mikrocinu (Gordon a O'Brien, 2006; Lagos a kol., 2009).

2.2 Koliciny

Koliciny jsou vysokomolekulární proteiny o velikosti 25-80 kDa, které jsou kódovány plazmidem nebo na chromozomu a jsou nejintenzivněji studovanou podskupinou bakteriocinů (Lagos a kol., 2009; Riley a Wertz, 2002). Tyto cytotoxické exoproteiny jsou produkovány bakteriální buňkou v průběhu růstu kultury. Produkčními bakteriemi jsou bakterie kmene *Escherichia coli* a bakterie některých příbuzných druhů čeledi *Enterobacteriaceae* (třída γ -proteobacteria), (Riley a Wertz, 2002). Koliciny inhibují citlivé bakterie ze stejné čeledi, nejen rodu *Escherichia*, ale také rodů *Salmonella* a *Shigella*. Kolicinogenní kmeny tak získávají selektivní výhodu v boji o živiny. (Cascales a kol., 2007; Gillor a kol., 2005; Šmarda a Šmajš, 1998).

U izolátů kmene *E. coli* z prostředí bylo zjištěno, že jsou koliciny produkovány více než polovinou izolátů (Braun a kol., 2002), u izolátů *E. coli* z lidského intestinálně-urogenitálním traktu bylo zjištěno přibližně 54 % kolicinogenních izolátů (Micenková a kol., 2014; Šmajš a kol., 2010). Kromě bakterie *E. coli* byla produkce bakteriocinů s podobnou strukturou jako u kolicinů popsána u zástupců rodů *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia* a dalších (Michel-Briand a Baysse, 2002; Šmajš a kol., 2002; Šmarda a Šmajš, 1998).

Za běžných podmínek je produkce kolicinů kolicinogenními kmeny velmi malá, avšak při stresových situacích, jaké jsou např. nedostatek živin, kyslíku, nebo při poškození DNA, dojde ke zvýšené tvorbě kolicinů, jako SOS odpověď na tyto nepříznivé podmínky (Gillor a kol., 2005). Lze tedy i uměle navodit syntézu kolicinů např. působením mitomycinu C, nebo UV zářením (Braun a kol., 1994; Spangler a kol., 1985).

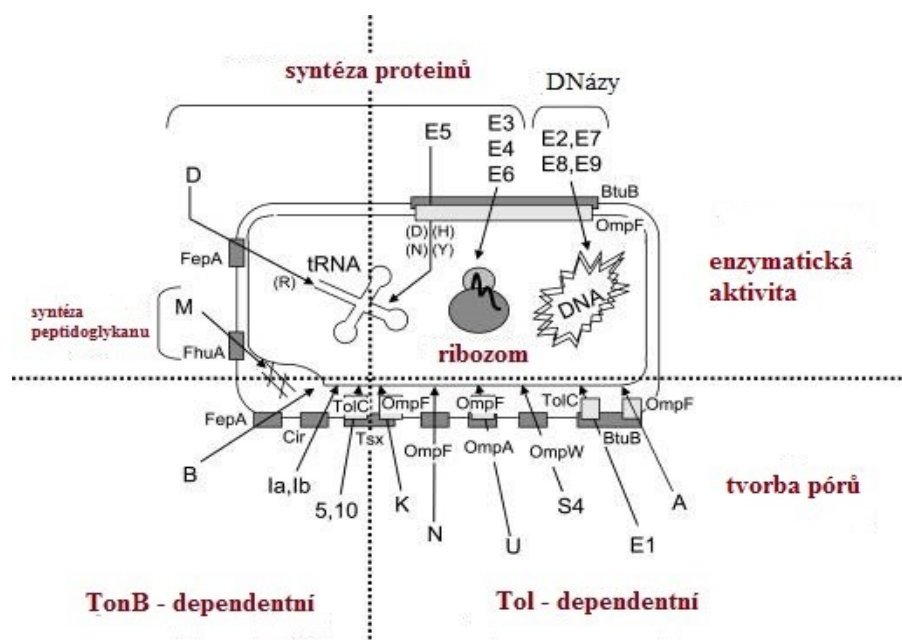
2.2.1 Klasifikace kolicinů

Klasifikace kolicinů souvisí s rozdílným způsobem interakce s citlivou buňkou. Koliciny jsou označovány velkými písmeny podle vazebného místa citlivé buňky, se kterým interagují. Jelikož některé koliciny využívají stejný receptor, na základě absence zkřížené imunity se dělí do subtypů označovaných čísly (Gillor a kol., 2005; Šmarda a Šmajš, 1998). Na základě různého letálního působení kolicinů na buňky vznikl jeden z klasifikačních systémů, kdy můžeme koliciny rozdělit do několika skupin. Některé koliciny jsou schopné vytvořit póry v cytoplazmatické membráně buňky a tím depolarizovat membránu z důvodu úniku iontů, např. koliciny A, B, Ia, Ib, K (Hilsenbeck a

kol., 2004). Jiné koliciny působí enzymaticky a degradují DNA v cytoplasmě, např. koliciny E2 a E7, nebo dochází k inhibici proteosyntézy specifickým štěpením 16S rRNA, tRNA, např. koliciny D a E3 (Gordon a O'Brien, 2006; Soelaiman a kol., 2001). Další skupina kolicinů deaktivuje prekurzory peptidoglykanu v periplazmatickém prostoru a inhibují tak tvorbu buněčné stěny, což vede k lyzi buňky, např. kolicin M (Gordon a O'Brien, 2006).

Cytotoxická aktivita kolicinů je podmíněna jejich vazbou na specifické vazebné místo vnější membrány a translokací přes buněčné obaly pomocí proteinových mechanismů Tol, nebo TonB. Translokační systém Tol tvoří několik důležitých bílkovin, jako jsou TolR, TolQ a TolA ve vnitřní membráně, a TolB v periplazmatickém prostoru, Pal je lipoprotein vnější membrány. Koliciny využívající transportní systém Tol patří do skupiny A, a ta zahrnuje koliciny A, E1 až E9, K, L, N, S4, U a Y. Translokační systém Ton je tvořen integrálními bílkovinami vnitřní membrány ExbB, ExbD a TonB. Systém TonB přenáší energii vnitřní membrány k specifickým receptorům vnější membrány a ta je dále využita na přenos nejrůznějších látek např. vitamínu B12. Koliciny využívající transportní systém TonB patří do skupiny B, a ta je tvořena koliciny D, Ia, Ib, 5 a 10 (Bouveret a kol., 2002; Cascales a kol., 2007).

Schematické rozdělení kolicinů je znázorněno na Obrázku 1. Přehled jednotlivých kolicinů skupiny A a B, jejich receptory a mechanismy účinku jsou uvedeny v Tabulce 1.



Obr. 1. Schéma klasifikace kolicinů (převzato a upraveno z: Cascales a kol., 2007).

* Koliciny klasifikujeme do skupin podle způsobu jejich interakce s citlivou buňkou a jejich letální aktivity. Koliciny využívají povrchové membránové receptory – primární receptory (BtuB, FepA, FhuA, Cir, Tsx, OmpF, OmpA, OmpW, BtuB), – sekundární receptory pro translokaci (OmpF, TolC), (Cascales a kol., 2007).

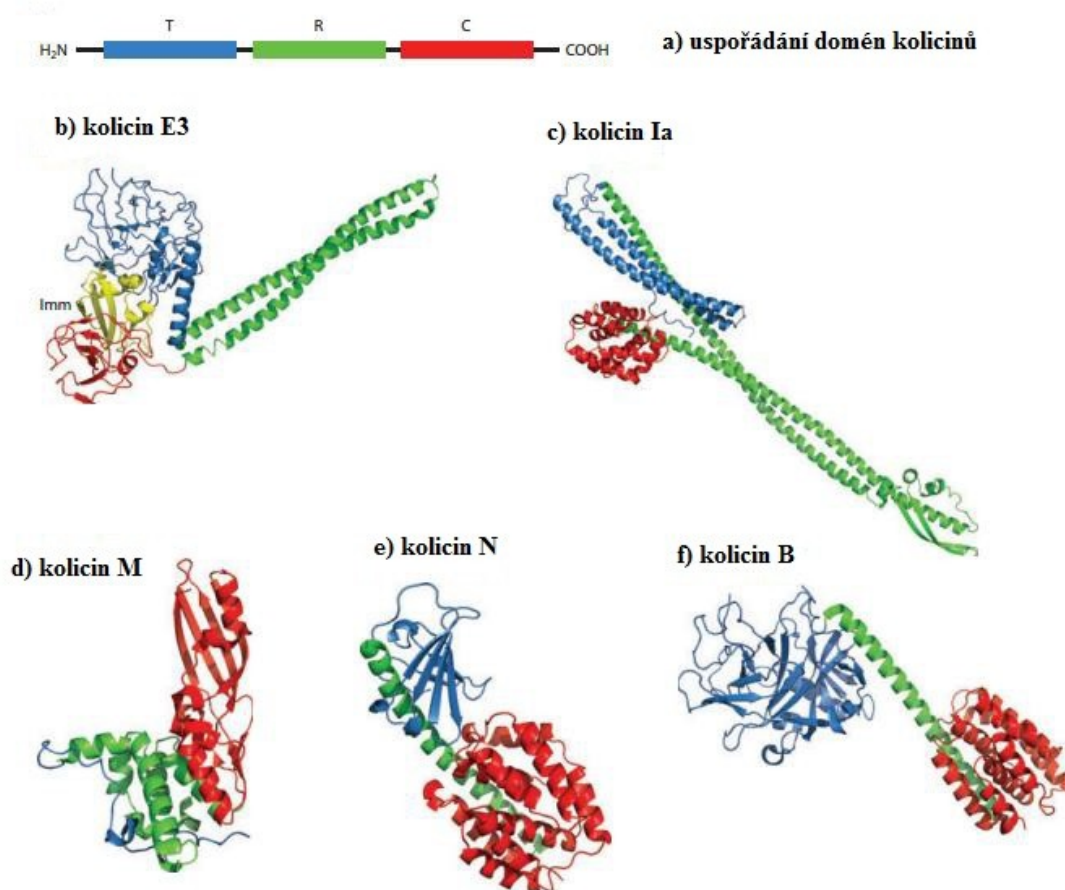
Tab. 1. Typy kolicinů, receptory, translokační systém, mechanismus účinku a rozdělení do skupin kolicinů rozdělená podle translokačního systému (upraveno a převzato z: Šmarda a Šmajš, 1998).

Kolicin	Receptor	Translokační systém	Mechanismus účinku	Skupina
A	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	tvorba pórů	A
B	FepA	TonB/ExbB, D	tvorba pórů	B
D	FepA	TonB/ExbB, D	blokáda translace	B
E1	BtuB/TolC	TolA, B, Q, R	tvorba pórů	A
E2	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	DNA endonukleáza	A
E3	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	rRNA endonukleáza	A
E4	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	rRNA endonukleáza	A
E5	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	blokáda translace	A
E6	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	rRNA endonukleáza	A
E7	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	DNA endonukleáza	A
E8	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	DNA endonukleáza	A
E9	BtuB/OmpF	TolA, B, Q, R	DNA endonukleáza	A
Ia	Cir	TonB/ExbB, D	tvorba pórů	B
Ib	Cir	TonB/ExbB, D	tvorba pórů	B
K	Tsx/OmpF, A	TolA, B, Q, R	tvorba pórů	A
L	?/OmpA	TolA, Q, ?	tvorba pórů	A
M	FhuA	TonB/ExbB, D	inhibice syntézy murinu	B
N	OmpF/OmpC, Ph	TolA, Q, R	tvorba pórů	A
S4	Srf?/OmpF	TolA, B, Q, R	tvorba pórů	A
U	OmpA/OmpF,	TolA, B, Q, R	tvorba pórů	A
Js	CjrC	CjrB	-	*
5	Tsx/TolC	TonB/ExbB, D	tvorba pórů	B
10	Tsx/TolC	TonB/ExbB, D	tvorba pórů	B

*kolicin Js je transportován pomocí proteinu CjrB (Šmajš a Wienstock, 2001).

2.2.2 Struktura kolicinů

Koliciny jsou tvořeny třemi hlavními doménami, z nichž každá má svou specifickou úlohu v procesu usmrcení buňky (Jakes a Cramer, 2012). Centrální část molekuly, označovaná jako receptorová R-doména, rozpoznává a váže se na specifický receptor na vnější membráně citlivé buňky. N-terminální doména, označovaná jako translokační nebo T-doména, je zodpovědná za přenos kolicinu přes vnější membránu do periplazmatického prostoru. Cytotoxická doména neboli C-terminální doména způsobuje samotný letální efekt kolicinu, jako je tvorba pórů, nukleázová aktivita nebo inhibice syntézy peptidoglykanu. Každá z domén představuje samostatnou funkční jednotku (Cascales a kol., 2007; Jakes a Finkelstein, 2010; Kaur, 2015). Struktury kolicinů jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 2).



Obr. 2. Struktury kolicinů.

*Písmeno „a“ znázorňuje uspořádání jednotlivých domén kolicinů: translokační (T-doména) modře, centrální receptorová doména (R-doména) zeleně, cytotoxická doména (C-doména) červeně. Písmena „b“ až „f“ znázorňují struktury jednotlivých kolicinů (převzato a upraveno z: Jakes a Cramer, 2012).

2.2.3 Syntéza kolicinů

Schopnost produkce kolicinů je kódována geny na tzv. kolicinogenních plazmidech neboli pCol plazmidech, což jsou extrachromozomální mobilní genetické elementy.

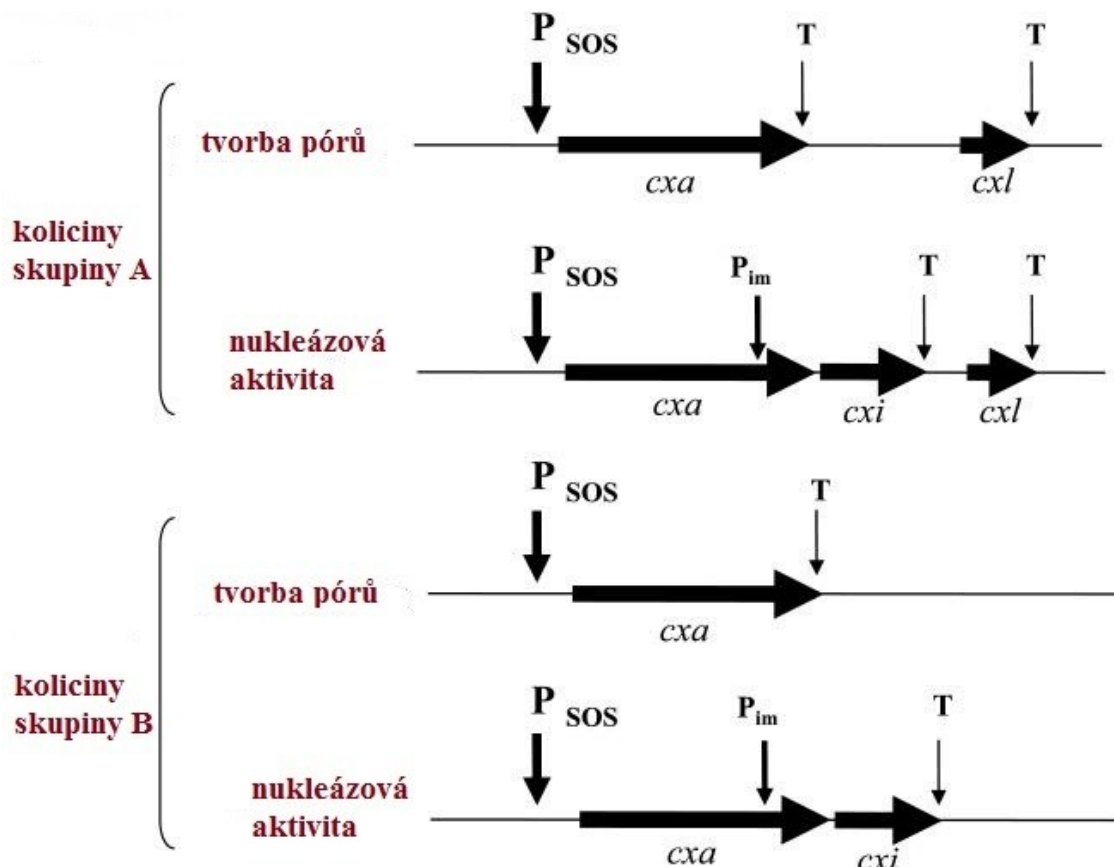
Rozlišujeme dva typy pCol plazmidů:

- pCol typ I: malé plazmidy nízkomolekulární struktury o velikosti 6 až 10 kb vyskytující se v buňce v počtu okolo 20 kopií. Může být přenášen v přítomnosti konjugativního plazmidu. Tento typ kóduje zejména koliciny skupiny A.
- pCol typ II: velké nízkokopiové plazmidy s velikostí okolo 40 kb, které obvykle kódují koliciny skupiny B a jsou zároveň konjugativními plazmidy, které zprostředkovávají horizontální přenos genetické informace mezi buňkami. Mohou nést i dva operony pro dva rozdílné koliciny, např. B a M, B a D nebo kolicin Ia a mikrocin V (Cascales a kol., 2007).

Všechny typy kolicinových genetických elementů – operonů mají navzdory odlišnému letálnímu efektu téměř stejnou genetickou strukturu. Operon Col plazmidu obsahuje obvykle tři důležité geny kódující vlastní kolicin, imunitní protein a lytický protein. Imunitní protein zabezpečuje buňku před účinkem vlastního kolicinu tak, že interaguje s C-doménou produkovaného kolicinu (Riley, 1998; Šmarda a Šmajš, 1998). Je kódovaný genem *cxl* (kde x je písmeno produkovaného kolicinu). U kolicinů s nukleázovou aktivitou je umístěn za strukturálním genem ve stejném směru a regulován promotorem LexA (zodpovídající za SOS odpověď). U kolicinů tvořících póry v membráně je gen pro imunitní protein orientován naopak oproti strukturálnímu genu kódující kolicin a je řízen svým vlastním promotorem, který zajišťuje stálou produkci tohoto proteinu (Cascales a kol., 2007; Cursino a kol., 2002; Kim a kol., 2014).

Hlavním posláním lytického proteinu je napomáhání uvolnění kolicinu do prostředí. Je kódován genem *cxl* a vyskytuje se zejména u skupiny A a u některých kolicinů skupiny B (5, 10 a D). Pro produkční buňku je tato událost letální (Cascales a kol., 2007). U plazmidů, které lytický gen neobsahují, jsou koliciny uvolňovány z produkční buňky do okolí v mnohem nižší míře (Gordon a O'Brien, 2006).

Na následujícím obrázku (Obr. 3) je schematicky znázorněna struktura kolicinového operonu.



Obr. 3. Struktura kolicinového operonu.

* Jednotlivé geny jsou vyobrazeny tlustými šipkami: *cxa* – gen kódující vlastní kolicin, *cxl* – gen kódující lytický protein, *cxi* – gen kódující imunitní protein, P_{SOS} promotory LexA (P_{SOS}), promotory imunitních proteinů (P_{im}), terminátory transkripce (T) jsou vyobrazeny tenkými šipkami (převzato a upraveno z: Cascales a kol., 2007).

2.3 Mikrociny

E. coli produkuje kromě kolicinů také další skupinu bakteriocinů – mikrociny, nízkomolekulární peptidy antimikrobiálního charakteru, které jsou stejně jako koliciny namířeny proti stejným či blízkým příbuzným druhům bakterií. Spektrum inhibiční aktivity je však o něco širší než u kolicinů, jsou schopny inhibovat např. bakterie rodů *Proteus*, *Pseudomonas*, *Yersinia* a další. Mikrociny jsou tvořeny jako prekurzorové peptidy a obsahují N-terminální signální sekvenci a základní peptidy. Mikrocínové prekurzory mohou a nemusí projít posttranslační modifikací na aktivní mikrociny (Rebuffat, 2012).

Mikrociny se od kolicinů odlišují některými fyzikálními vlastnostmi a nejsou prozkoumány tak rozsáhle jako koliciny. Mikrociny mají zpravidla menší molekuly než koliciny, velikost se pohybuje pod 10 kDa a sdílí některé podobnosti s bakteriociny

grampozitivních bakterií – jsou termostabilní, relativně hydrofobní a rezistentní k vyššímu pH (Gillor a kol., 2005; Gordon a O'Brien, 2006; Kaur, 2015). Významným rozdílem oproti kolicinům je, že bakterie, která produkuje mikrocin a nemá poškozenou funkci imunitních genů, není při produkci mikrocinu usmrcená. V případě kolicinů produkční buňka při uvolňování kolicinu umírá. Produkce kolicinů je indukována SOS systémem, zatímco tvorba mikrocinů je na SOS systému nezávislá (Duquesne, 2007; Gillor a kol. 2005).

V současné době bylo identifikováno více než 16 mikrocinů, z nichž 8 bylo popsáno a izolováno (Kaur, 2015; Zhao, 2017). Struktura a baktericidní účinky jednotlivých mikrocinů se liší. Podobně jako koliciny se mikrocinů naváží na receptory citlivé buňky a buňky usmrcují několika způsoby. Některé tvoří v membránách citlivých buněk póry, další jsou nukleázového typu a interagují s DNA nebo RNA, případně fungují jako inhibitory proteosyntézy nebo replikace DNA (Duquesne a kol., 2007).

Mikrociny jsou produkovány za specifických okolností, jejich sekrece je podmíněna zpravidla stresovými podmínkami jako jsou např. vyčerpání živin, nebo nedostatek železa. Uvolnění mikrocinů není záležitostí lyze, ale jsou z buňky aktivně exportovány. Export mikrocinů zahrnuje mikrocin-specifické proteiny (Gordon a O'Brien, 2006; Kaur, 2015).

Mikrociny mohou být kódovány na plazmidech nebo na chromozomu, obvykle s několika geny. Tyto geny kódují prekursor mikrocinu, proteiny potřebné pro sekreci – sekreční faktor, imunitní protein a v některých situacích také enzymy, které jsou potřebné pro posttranslační modifikace mikrocinů. Žádný z mikrocinů nemá lytický gen a mikrocinů jsou do prostředí uvolňovány přes transportér ABC typu I (Duquesne a kol., 2007; Zhao, 2017).

První klasifikační schéma vzniklo na základě rozdílných molekulových hmotností a přítomnosti posttranslačních úprav (Pons a kol., 2002). V dnešní době jsou mikrocinů rozděleny do tříd I. a II. s ohledem na:

- přítomnost, povahu a lokalizaci posttranslační modifikace;
- organizaci kódující genové skupiny;
- přítomnost či nepřítomnost zaváděcí peptidové sekvence.

Mikrociny I. třídy zahrnují peptidy s nižší molekulovou hmotností do 5 kDa, tyto peptidy jsou kódovány na plazmidech a podstupují rozsáhlé posttranslační modifikace, jedná se např. o mikrocinů B17, C7/C51, J25. Mikrociny třídy II. zahrnují peptidy s vyšší

molekulovou hmotností 5-10 kDa, a dále se dělí do dvou podtříd. Podtřída IIa zahrnuje mikrocin, které postrádají posttranslační modifikace a mohou vlastnit v molekule až dvě disulfidické vazby, např. mikrocin V, L, N, PDI, S. Podtřídě IIb náleží chromozomálně kódované lineární mikrocin s možností posttranslační úpravy terminálního C-konce svého řetězce, např. mikrocin E429, H47, I47, M (Duquesne a kol., 2007; Rebuffat, 2012). Klasifikace mikrocinů je znázorněna v následující tabulce (Tab. 2).

Tab. 2. Klasifikační schéma mikrocinů *E. coli* (převzato a upraveno z: Yang a kol., 2014).

Třída	Mikrocin	Molekulová hmotnost [Da]	Charakteristika
I.	B17	3094	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nízkomolekulární peptidy s velikostí pod 5 kDa ▪ Posttranslačně modifikované
	C7/C51	1177	
	D93	<1000	
	J25	2107	
II.			<ul style="list-style-type: none"> ▪ Peptidy s velikostí 5-10 kDa ▪ Možnost posttranslační modifikace
IIa	L	8884	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pro syntézu funkčních peptidů zapotřebí více než jeden gen
	V	8741	
	N/24	7274	
IIb	M	7284	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lineární peptidy s posttranslační úpravou C-konce
	H47	4865	

Společnými vlastnostmi mikrocinů I. třídy jsou: nízká molekulová hmotnost (pod 5 kDa), rozsáhlé posttranslační modifikace, plazmidově kódované peptidy, působení na základní molekulární nástroje v cytoplazmě senzitivních buněk. Tyto peptidy jsou kódovány skupinou genů, kde gen pro imunitní faktor není uložen blízko strukturních genů. Dva až tři geny, umožňující posttranslační modifikaci aminokyselinové kostry, jsou naopak uloženy blízko strukturního genu. Alespoň jeden gen hraje roli při exportu mikrocinu i v syntéze imunitního faktoru (Duquesne a kol., 2007; Severinov, 2007).

Mikrociny II. třídy se vyznačují vyšší molekulovou hmotností (5-10 kDa) a jejich aminokyselinová kostra nepodléhá rozsáhlým úpravám. Jsou zde však přítomny úpravy v podobě disulfidických můstků eventuelně navázání molekuly sideroforu, jenž je rozpoznáván receptorem senzitivní buňky (Duquesne a kol., 2007). Vlastní struktura se skládá z genu kódující prekurzor mikrocinu sousedního imunitního genu a alespoň ze dvou genů kódujících membránové proteiny: ABC přenašeč (ATP vazebnou kazetu) a protein zodpovědný za sekreci toxinu. ABC protein je vždy složen alespoň ze dvou domén: transmembránové domény (TMD) a domény vázající se k nukleotidu (NBD). Mikrociny II. třídy jsou dále rozděleny do dvou podtříd podle způsobu uložení svých genů a přítomnosti resp. nepřítomnosti posttranslačních úprav (Destoumieux-Garzón a kol., 2002; Duquesne a kol., 2007).

2.4 Význam bakteriocinů *E. coli*

V uplynulých letech si některé z bakteriocinů získaly zvláštní pozornost, vzhledem k jejich potencionálnímu využití v potravinářství, zejména v konzervaci potravin z důvodu zvyšování bezpečnosti potravin. Byla provedena studie na otestování účinnosti kolicinu E1 proti patogenní bakterii *Listeria monocytogenes* v bujónu a na povrchu potravin určených k přímé spotřebě a výsledkem byl významný inhibiční účinek (Patton a Lonergan, 2007).

V oblasti medicíny a farmakologie se vědci stále více zaměřují na bakteriociny, které jsou velkým příslibem další generace antimikrobiálních látek. Byla provedena studie na možné využití kolicinu 5 jako náhrady běžných antibiotik a zjistilo se, že díky úzkému spektru působnosti je kolicin 5 vysoce efektivní v léčbě infekcí lidí i zvířat způsobenými patogenními kmeny *E. coli* (Yang a kol., 2007).

Rychlý počátek a rozšíření multirezistence bakteriálních patogenů vede ke hledání dalších alternativ pro boj s nimi. Bakteriociny poskytují určitou možnost v boji s multirezistentními kmeny, jelikož mají úzké spektrum letálního účinku, mohou být považovány za přirozeně „vytvořená“ léčiva, které působí specificky na bakteriální patogeny. Je relativně jednoduché najít bakteriociny aktivní proti humánním patogenům vzhledem k jejich rozsáhlému výskytu v přírodním prostředí. Nevýhodou však je, že použití bakteriocinů proti multirezistentní kmenům může vést k zabití i nepatogenních komenzálních kmenů, což může vést k navýšení počtu nozokomiálních infekcí (Gillor a kol., 2005; Riley a Wertz, 2002).

Probiotické bakterie pomáhají hostitelskému organismu udržovat a obnovovat jeho přirozenou střevní mikroflóru. Schopnost těchto bakterií eliminovat nežádoucí druhy je často způsobena produkcí bakteriocinů. Mnoho studií se zabývá využitím těchto bakteriocinogenních kmenů v probiotických terapiích pro lidský organismus (gastrointestinální trakt, ústní dutina, dýchací trakt, vagina), dobytek a vodní kultury (Gillor a kol., 2008).

V další studii bylo *in vitro* prokázáno, že kolicin E2 produkovaný kmenem *E. coli* K12 inhibuje růst uropatogenních kmenů *E. coli* a tím předchází vzniku infekcí močového traktu při používání katétrů (Trautner a kol., 2005).

Některé experimentální studie uvádějí vysoký léčebný potenciál bakteriocinů u různých typů nádorových onemocnění, např. u mikrocinu E492, kde byl prokázán jeho toxický účinek na zhoubné buňky (Kaur, 2015; Lagos a kol., 2009). U některých kolicinů byla prokázána protinádorová aktivita v celé řadě lidských onemocnění, jako je rakovina prsu, rakovina tlustého střeva, rakovina kostí, a dalších (Chumchalová a Šmarda, 2003).

2.5 Multibakteriocinogenní kmeny *E. coli*

Většina bakteriocinogenních kmenů *E. coli* je schopna produkce více než jen jednoho bakteriocinu. Řada bakteriocinů se vyskytuje v kombinaci s jinými mnohem častěji, než by se dalo čekat. Může se jednat o produkci více kolicinů najednou, nebo produkci kolicinů a mikrocinů současně. Byla provedena studie, kdy se zkoumaly kmeny *E. coli* z fekálních vzorků na produkci bakteriocinů. Produkce mikrocinů v těchto izolátech byla stejně častá jako produkce kolicinů. Nejméně polovina bakteriocinogenních kmenů *E. coli* produkovala více než jeden bakteriocin (Gordon a O'brien, 2006; Riley a Chavan, 2007).

Multibakteriocinogenní kmeny, díky své vlastnosti produkovat více než jeden bakteriocin, mají ve společenství oproti ostatním bakteriím selekční výhodu. Pokud se ve společenství nachází populace senzitivních buněk a dvě populace bakteriocinogenních buněk, z nichž každá kóduje jiný typ bakteriocinu, tak každý z těchto producentů je schopný usmrtit senzitivní buňky a zároveň zabít druhého producenta. Pokud však jeden z producentů má schopnost vícenásobné produkce bakteriocinů, je mu umožněno usmrtit nejen senzitivní buňky, ale buňky kódující pouze jeden typ bakteriocinu (Riley a Chavan, 2007). Další výhoda mnohonásobné produkce bakteriocinů existuje v populaci přirozeného prostředí *E. coli*, kde je rezistence běžným fenoménem a mnoho buněk se tak stává

rezistentní ke kolicinům, se kterými se společně vyskytují (Gordon a kol., 1998). Mnoho kmenů, u kterých se vyskytuje mnohonásobná produkce bakteriocinů, využívá více receptorů na povrchu citlivé buňky najednou. Mutace v jednom z receptorů je běžnější než současný výskyt dvou mutací ve dvou odlišných receptorech. Mnohonásobná produkce a využití více odlišných receptorů, může vést ke zpomalení vývoje rezistence v populacích, kde dominantní bakteriocinogenní kmen produkuje více druhů bakteriocinů v porovnání s populacemi, kde produkční kmen produkuje pouze jeden typ bakteriocinu (Gordon a O'brien, 2006).

Pravděpodobnost, že kmen bude schopen produkovat více typů bakteriocinů je ovlivněna zařazením kmene ve fylogenetické skupině. Kmeny *E. coli* jsou rozděleny do čtyř fylogenetických skupin: A, B1, B2 a D, které se od sebe liší výskytem v ekologických nikách a ve schopnosti vyvolávat onemocnění (Clermont a kol., 2000). V případě humánních izolátů je velká pravděpodobnost, že kmeny skupiny B2 mají schopnost produkovat více bakteriocinů v porovnání s kmeny skupiny A nebo B1. U izolátů získaných ze zvířat však s největší pravděpodobností více typů bakteriocinů produkuje kmeny skupiny A (Riley a Chavan, 2007).

Analýzou 266 humánních kmenů *E. coli* izolovaných z australské populace bylo zjištěno, že 38 % kmenů produkovalo alespoň jeden typ bakteriocinu, 24 % kmenů produkovalo jeden nebo více kolicinů a 20 % kmenů produkovalo jeden nebo více mikrocinů. Výskyt mitomycinem indukovatelných bakteriofágů byl zjištěn u 7 % kmenů. Ze 102 bakteriocinogenních kmenů 42 % produkovalo pouze jeden druh bakteriocinu, 41 % produkovalo dva typy, 16 % produkovalo tři a jeden kmen produkoval čtyři bakteriociny (Gordon a O'brien, 2006).

Mezi statisticky významné současně se vyskytující bakteriociny v jednom produkčním kmeni se řadí koliciny B a M, mikrocin H47 a M a také kolicin Ia a mikrocin V. Kolicin E1 se vyskytuje společně s kolicinem M avšak pouze v případě, že kmen nekóduje také kolicin B. Podobná situace nastává i v případě kolicinu E1 a Ia. Tyto dva koliciny se objevují společně pouze za nepřítomnosti mikrocinu V. Rovněž byly zjištěny dvě významné kombinace tří bakteriocinů. Mikrocin J25 se vyskytoval společně s kolicinem Ia a mikrocinem V, ale nikdy samostatně. Slabší seskupení pak bylo pozorováno mezi mikrocinem C7, H47 a M. Oproti tomu je mnohem méně pravděpodobné, že se spolu vyskytnou mikrocin H47 a V (Gordon a O'brien, 2006; Riley a Chavan, 2007). U kmenů s těmito nenáhodnými kombinacemi bylo zjištěno, že vždy alespoň jeden z bakteriocinů je z

produkční buňky vylučován s větší pravděpodobností, než aby byl uvolněn rozpadem buňky. Samotná lyze buňky představuje značné nároky na populaci buněk produkujících kolicin v souvislosti s přenosem plazmidu a syntézou kolicinů (Riley a Chavan, 2007).

3 METODY ANALÝZY BAKTERIÁLNÍHO GENOMU

Struktura DNA a její funkce jakožto nositelky dědičné informace jsou známy již od padesátých let dvacátého století (Watson a Crick, 1953). Brzy po objevu struktury DNA následovaly první experimentální metody pro zjištění informační sekvence (plus-mínus metoda, Barnesova metoda), avšak tyto metody byly schopné zjistit pouze přibližné pořadí bází u krátkých fragmentů DNA (Sanger a Coulson, 1975; Barnes, 1978).

První sekvencování krátké sekvence DNA provedl v roce 1970 Ray Wu z Cornellské univerzity a tato sekvence se skládala z pouhých dvanácti nukleotidů. Průlom nastal v roce 1974, kdy angličtí vědci Frederick Sanger a A. R. Coulson vyvinuli svou sekvenační metodu a nezávisle na nich v témže roce vyvinuli američtí vědci Allan Maxam a Walter Gilbert další, poměrně rychlou metodu sekvencování molekuly DNA s podobným postupem a oba vědecké týmy se za svou vědeckou činnost podělily v roce 1980 o Nobelovu cenu. Pro svou praktičnost se však standardem stala jen Sangerova metoda (King a kol., 2006).

Nové sekvenační technologie byly zpočátku schopny přečíst během jednoho běhu pouze 100 bází, avšak jejich postupným zdokonalováním, jakým je např. automatizace detekce fluorescenčně značených molekul nebo zavedení kapilárních sekvenátorů, je v současnosti standardně dosahováno přečtení až 1000 bází během jednoho běhu. Tyto zdokonalené techniky daly možnost rutinně využívat sekvenování pro analýzu fragmentů DNA, např. PCR produktů, a staly se tak běžnou diagnostickou metodou v medicínské praxi (Pospíšilová, 2009).

Výsledkem sekvenování je obrovské množství dat, které se musí následně zpracovat a vyhodnotit, a to by nebylo možné bez současného rozvoje a zdokonalování informačních technologií a vzniku různých bioinformatických nástrojů k analýze těchto získaných dat. Data, která jsou získána procesem sekvenace se nachází v podobě fragmentů sekvence a tyto fragmenty je pro další zpracování nutné zkompletovat do souvislé sekvence původního genomu. V odborné literatuře je tento proces skládání označen anglickým termínem „assembling“.

K analýze, zpracování, vyhodnocování a případně i k organizování a následnému uchovávání dat slouží různé bioinformatické nástroje, které jsou nezbytnou součástí dnešního výzkumu (Nagarajan a Pop, 2009).

V následujícím textu budou stručně popsány metody sekvenování, následná kompletace genomu a využití bioinformatiky pro analýzu dat pomocí databází.

3.1 Sekvenování

Sekvenování DNA patří řadu let k běžným metodám molekulárně-genetických analýz biologického materiálu. Pomocí sekvenování DNA je možné stanovit pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA a analýzou nalezené sekvence získat informace relevantní např. k původu geneticky podmíněných onemocnění. V medicíně nachází sekvenování DNA široké uplatnění, a to zejména v oblasti diagnostiky dědičných chorob a nádorových onemocnění (Pospíšilová a kol., 2009).

3.1.1 Klasické sekvenování

Existují dvě klasické metody sekvenování, které jsou založeny na odlišných principech: enzymová metoda (Sangerovo sekvenování) a chemická metoda (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování). Obě metody byly nezávisle na sobě zveřejněny v roce 1977. Požadavkem pro obě klasické metody sekvenování je příprava DNA s přesně definovanými konci (místo pro vazbu primeru a s koncovou značkou), dále příprava souboru fragmentů jednořetězcové DNA, jejichž délka se liší o jeden nukleotid. Tyto fragmenty jsou pak elektroforeticky rozděleny podle své délky. (Maxam a Gilbert, 1977; Sanger a kol., 1977).

Podstatou Maxam-Gilbertovy chemické metody sekvenování je specifické štěpení řetězce molekuly DNA po modifikaci jednotlivých bází působením chemických činidel, např. kyselina mravenčí, hydrazin, dimetylsulfát a hydroxid sodný. Při hydrolýze dochází nejdříve k odštěpení jedné ze čtyř bází od sacharidu, a poté se DNA štěpí v abazickém místě v alkalickém roztoku. V každém roztoku tedy všechny fragmenty končí definovanou bází. Chemická činidla štěpí DNA na místě, které je tvořeno purinem, pyrimidinem nebo kombinací G/A, T/C a C. Poté následuje separace fragmentů podle velikosti s využitím gelové elektroforézy a z pořadí proužků a jejich kombinací je určena sekvence DNA. Pro větší rozlišení se používá autoradiografické značení konců fragmentů izotopem ^{32}P . Pro správné provedení chemické metody je klíčová koncentrace chemických činidel, aby došlo k reakci jen v asi 1 % bází. Chemická metoda se již běžně nepoužívá, a to hned z několika důvodů. Reaktivita chemických činidel je ovlivňována přítomností různých nečistot, metoda vyžaduje radioaktivní značení a laboratorní postup je náročnější než u enzymové metody (Maxam a Gilbert, 1977; King a kol., 2006).

Sangerova enzymová metoda sekvenování byla publikována jen 7 měsíců později než předchozí metoda, a je v praxi využívána nejběžněji. Stejně jako chemická metoda je založena na tvorbě fragmentů DNA se známým terminálním nukleotidem a jejich následnou separací pomocí elektroforézy. Tato metoda využívá specifickou inhibici enzymové syntézy řetězců DNA. Do syntetizovaného řetězce DNA je místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu (dNTP) zařazen jeho analog, dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP), který působí jako inhibitor syntézy DNA a vznikají tak fragmenty různé délky zakončené příslušným ddNTP. V současnosti se používá automatické sekvenování, varianta enzymové metody se zavedenými automatizovanými aparaturami. Délka stanovené sekvence je 500 – 1000 bází a pro detekci produktů se používají čtyři různé fluorescenční značky. Každá pro detekci produktů zakončených specifickou bází a sekvenování pak může probíhat v jediné reakci (Sanger a kol., 1977). V praxi se začala používat výhradně Sangerova metoda, protože nevyžadovala toxické chemikálie, a v různých modifikacích se používala přes třicet let (Mardis, 2013).

3.1.2 Sekvenování nové generace

Metody nové generace sekvenování (NGS) se začaly objevovat koncem 90. let 20. století jako alternativa k již existujícím technikám s cílem minimalizace nevýhod klasických metod, a co největšího zrychlení a zlevnění celkového procesu sekvenování pomocí automatizace postupů. Metody jsou založeny na společném principu, kterým je masivní paralelní syntéza pomocí DNA polymerázy s cyklickým začleňováním bází. Liší se oproti klasickým metodám přípravou knihoven fragmentů a způsobem detekce, kdy výstup je detekován přímo bez použití elektroforézy. Nevýhoda oproti Sangerově enzymatické metodě je tvorba kratších fragmentů, které následně snižují přesnost a je nutné použití pokročilejších algoritmů pro kompletaci původní sekvence. V současnosti se mezi metody NGS řadí šest komerčně dostupných sekvenátorů. V druhé generaci jsou zahrnuty: 454, Illumina, SOLiD, Ion Torrent. Do třetí generace patří sekvenátory PacBio a Helicos (van Dijk a kol., 2014; Mardis a kol., 2008; Wheeler a kol., 2008).

Illumina sekvenování, původně sekvenační technologie firmy Solexa, kterou v roce 2006 odkoupila firma Illumina, je v současnosti nejrozšířenější platformou v genomických studiích. Princip metody je založen na sekvenaci syntézou. Illumina Genome Analyzer dokáže číst velice krátké úseky DNA, většinou jsou úseky dlouhé 36 bp, a byla původně určena pro resekvenování genomu (Farrer a kol., 2009; Pagani a kol., 2012).

Příprava knihovny začíná hydrodynamickou fragmentací v nebulizéru, kdy je řetězec DNA působením stlačeného vzduchu rozdělen na menší fragmenty, které mají délku od 0 do 1200 bp. Následně dojde k enzymatickému otužení konců a ligaci adaptérů na oba konce. Fragmenty jsou nanášeny na skleněnou destičku v průtokové komůrce a vazbou obou adaptérů se vytvoří typické můstky. Před samotným sekvenováním proběhne několik cyklů PCR pro amplifikaci fragmentů DNA a díky tomu, že jsou fragmenty vázány vždy jedním koncem na destičku, vzniknou malé shluky fragmentů obsahující tutéž sekvenci v asi tisíci kopiích. Vlastní sekvenování se provádí za přítomnosti reverzibilních terminátorů a těmi jsou modifikované nukleotidy nesoucí fluorescenční značku. Značení je čtyřbarevné a pro každou bázi jiné. V každém cyklu je modifikovaná polymeráza schopna zařadit právě jen jeden terminátor. Fluorescenční signál je detekován CDC kamerou a po zařazení se odštěpí blokující fluorescenční značka. Díky tomu je v dalším cyklu možné zařadit nový nukleotid. Tato metoda umožňuje i párové uspořádání, kdy se využije primer na druhém adaptéru na opačném konci (Bentley a kol., 2008; Croucher a kol., 2009). Chybovost je do 1 % a kvalita fragmentů klesá s nárůstem počtu bází. Illumina dává přesné výsledky v homopolymerních úsecích, ale je méně spolehlivá v úsecích s vysokým obsahem C+G. Nejčastější chybou je záměna bází (Mardis, 2013).

3.2 Kompletace sekvencí genomu (genome assembly)

V současnosti existují dvě varianty sestavování sekvencí genomu. První variantou je referenční skládání, které využívá již existující referenční sekvenci (referenční genom), ke které jsou fragmenty přikládány, jsou kompletovány a zhotoví sekvenci podobnou nebo shodnou s referenční. Druhým způsobem je kompletace *de novo* (od počátku, nově), kdy se nepoužívá referenční sekvence, nebo není k dispozici. Fragmenty sekvence jsou tak bez jakéhokoliv vzoru sestavovány a vytvoří celou novou sekvenci. S kompletací genomové sekvence souvisí druhý základní krok v analýze sekvenačních dat, tzv. sekvenční přiřazení, z angličtiny „alignment“. Jedná se o uspořádání dvou sekvencí DNA tak, aby identické nukleotidové zbytky ležely pod sebou. Slouží k identifikaci stejných, překrývajících se úseků osekvenovaných fragmentů a na základě odhalených překryvů se zjistí, které fragmenty spolu sousedí a mohou tak být sestavovány do větších celků, tzv. kontigů. Výsledná sekvence genomů je zhotovena spojováním těchto kontigů a vytvořením tzv. „scaffolds“. Scaffolds jsou tvořeny překrývajícími se kontigy oddělenými mezerami o známé délce (Nagarajan a Pop, 2009).

Zásadním problémem všech technik NGS jsou chyby, které vznikají během sekvenování nebo dokonce při kontaminaci při přípravě vzorku, či při amplifikaci PCR. Zdroje těchto chyb mohou být různorodé, závisí na použitém postupu, metodě sekvenování a tyto chyby mohou následně ovlivnit skládání kontigů, jejich přiložení a analýzu. Je tedy nutné, aby získaná data před dalším zpracováním byla pročištěna od chybných sekvencí, a proto byly vyvinuty různé metody, jak odstranit chyby nebo je alespoň minimalizovat (Becker a kol., 2012; Kunin a kol., 2010). Jednou z metod je použití vysoce specializovaných softwarů, jako jsou assembly, které se neustále vyvíjí v závislosti na pokroku sekvenačních technologií. První assembly využívaly především OLC (overlap-layout-consensus) algoritmus, ale s nástupem metod NGS byly OLC assembly upraveny ke zvládnutí velkého množství kratších čtení (readů). Tento algoritmus přitom nejprve vyhledává sekvenční překryvy čtení, na základě jejich návaznosti je seřadí a vytvoří komenzální sekvenci (Salzberg a kol., 2012). S nástupem NGS metod se však mnohem více uplatnil jiný algoritmus založený na De Bruijnových grafech. Tento algoritmus nejprve umístí čtení do pomyslného grafu a na základě jejich sekvence se snaží najít nejkratší cestu grafem, tak aby bylo použito co nejvíce čtení, každé z nich však pouze jednou (Liu a kol., 2011).

Moderní metody, které využívají OLC i De Bruijnov graf, jsou teoreticky schopné vytvořit kvalitní a úplnou sekvenci. Problémem jsou však chyby a neúplnost fragmentů. Většina sekvencí tak pokrývá jen část genomu a obsahuje mezery o neznámé délce. Jejich doplnění je náročné a bývá proto vynecháváno a to je důvodem, proč je většina genomů v rozpracovaném stavu (Pagani a kol., 2012).

3.3 Bioinformatická analýza pomocí databází

Bioinformatika je vědní disciplína využívající informační technologie a pomocí matematických, statistických a výpočetních metod dochází následně k získávání, uchovávání, analýze a vizualizaci biologických dat, která jsou následně využívána k získání nových poznatků týkajících se nukleových kyselin a proteinů. Bioinformatika je úzce spojena i s dalšími biomedicínskými obory, jako jsou molekulární biologie, genetika, genomika a proteomika, matematika, systémová a systematická biologie. V oblasti sekvenování DNA jsou bioinformatické nástroje nenahraditelné a jsou podstatnou součástí jak samotného procesu stanovení sekvencí, tak i jejich následné analýzy.

V dnešní době existuje celá řada programů a aplikací určených ke zpracování sekvenčních dat, které jsou většinou poskytovány dvěma nejznámějšími bioinformatickými institucemi,

kteřé jsou: NCBI (National Center for Biotechnology Information) a EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute), (Nagarajan a Pop, 2009).

3.3.1 NCBI

Toto centrum bylo založeno v roce 1988 a jeho hlavním cílem je vyvíjet nové informační technologie, které by mohly pomoci k pochopení základních molekulárních a genetických procesů. NCBI vytváří automatizované systémy pro ukládání a analyzování znalostí z oborů jako jsou např. biochemie a genetika, molekulární biologie, a usnadňuje používání souvisejících softwarů a databází, koordinuje úsilí ve sbírání biotechnologických informací a provádí výzkum pokročilých počítačových metod na zpracování informací pro analýzu struktury a funkce důležitých biomolekul. NCBI spravuje velké množství databází, jako jsou např. původní databáze GenBank, databáze nukleotidových sekvencí, nebo také databáze PubMed, která obsahuje biomedicínskou literaturu (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.3.2 EMBL-EBI

Centrum EMBL-EBI bylo založeno v roce 1980 a z hlediska rozsahu a cíle je srovnatelné s NCBI. Spravuje volně dostupná data, bioinformatické nástroje a koordinuje poskytování biologických dat v rámci Evropy. Hlavní databází, kterou EMBL-EBI spravuje, je EMBL-Bank, což je úložiště DNA a RNA sekvencí a je srovnatelná s databází GenBank (www.ebi.ac.uk).

3.4 Alingment

Alignment (sekvenační přiřazení) je základní bioinformatická metoda, při které se srovnávají dvě a více sekvencí aminokyselin nebo nukleových kyselin a je užitečná při zjišťování informací o struktuře, funkci, evoluci sekvence, ale také k určení příbuznosti sekvencí a nalezení homologů neboli sekvencí se společným předkem. Výsledkem alignmentu jsou sekvence zapsané nad sebou, kde identické aminokyseliny nebo nukleotidy jsou umístěné ve stejném sloupci (Mount, 2004).

Alignment je základní bioinformatická metoda pro vyhledávání v databázích a prvním krokem fylogenetických analýz a metod pro predikci struktury proteinu. Alignmentem můžeme identifikovat konzervované proteinové úseky (domény, motivy), ale i místa, kde během evoluce vznikly různé mutace, inserce nebo delece. Alignment může být proteinový a nukleotidový, kdy proteinový poskytuje více informací, protože dokáže zohlednit

záměnu příbuzných aminokyselin. Dále může být alignment globální, kdy nás zajímá porovnání celé délky sekvencí, nebo lokální, kdy hledáme jen podobné části. Lokální je vhodnější při různých délkách sekvencí a je vhodnější při hledání v databázích (Mount, 2004; Pevsner, 2009).

BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) je program využívající alignment pro prohledávání databází a srovnávání nukleotidových nebo proteinových sekvencí se sekvencemi z různých NCBI databází. Tento program má velké množství využití, např. zjištění identity DNA a proteinové sekvence, také v hledání homologních sekvencí, v hledání proteinů a genů v konkrétních organismech a v hledání nových genů nebo popsanych variant konkrétního genu. V případě, že porovnáva nukleotidovou sekvenci s databází proteinových sekvencí, tak si nukleotidovou sekvenci přeloží. BLAST je dostupný na webu, kde je propojen s ostatními zdroji z NCBI, nebo funguje jako samostatná aplikace (Altschul a kol., 1997; Boratyn a kol., 2013).

BLAST používá heuristický algoritmus a několik parametrů, které mohou být upravovány. Jedním je prahový parametr T. Nejdříve program ze zadané sekvence vytvoří knihovnu slov, kdy slova jsou úseky sekvence, které mají určitou délku (u proteinů o délce 3). Tato slova se mohou překrývat. K těmto slovům jsou vytvořeny všechny varianty částí sekvencí, ke kterým by mohly být bez mezer zarovnány s určeným minimálním skórem T, pomocí nich se následně prohledá databáze. Z databáze jsou vybrány sekvence, které obsahují minimálně dvě nepřekrývající se slova do určité vzdálenosti.

Ve výstupu z BLASTu můžeme najít tabulku shrnující nalezené sekvence, podrobný alignment nalezených sekvencí s odkazy na plný záznam databáze a odkazy pro zobrazení taxonomie, dále zobrazení sekvencí pomocí stromu vzdáleností. BLAST také může naznačit funkční a evoluční vztah mezi sekvencemi, pomocí identifikace členů genových rodin a umožňuje zobecnit vyhledávání (Altschul a kol., 1997).

3.5 RAST

RAST (Rapid Anotace using Subsystem Technology) je online nástroj, který byl vyvinut v roce 2008 a slouží k rychlé, plně automatizované anotaci úplných nebo téměř úplných genomů archeí a bakterií. Tento systém se snaží rychle vytvářet vysoce kvalitní charakteristiku funkcí genů a počátečních metabolických rekonstrukcí. Zpočátku bylo použití tohoto systému plánováno pro Národní institut pro alergie a nemoci (National

Institute of Allergy and Infections Disease), ale brzy se zjistilo, že systém jako je tento, může být velmi užitečný v mnoha ohledech. Uživatelům tohoto systému se tak naskytla možnost nahrát bakteriální genom ve formě kontigů ve FASTA formátu a dostali tak přístup k popsaným genomům v prostředí, které podporuje porovnání se stovkami stávajících genomů. Kompletní anotace je obvykle vytvořena během 12-24 hodin, a je důležité si uvědomit, že rychlost není hlavním požadavkem toho systému (Aziz a kol., 2008).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla detekce bakteriocinů u 15 kmenů *Escherichia coli* izolovaných ze zvířiny s následnou bakteriocinotypizací jednotlivých typů kolicinů a mikrocinů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Na základě výsledků byly u vybraných kmenů *E. coli* připraveny roztoky surového kolicinu a byl vytipován nejvhodnější kmen pro další výzkumnou práci. Pomocí bioinformatických programů BLAST a RAST byla provedena základní genomická analýza bakteriálních genomů kmenů *E. coli* s označením 225, S35 a 28.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Materiál

5.1.1 Kultivační média a roztoky

Z kultivačních médií byl v této práci používán masopeptonový bujón (MPB), masopeptonový agar (MPA), soft agar a bujón z mozkosrdcové infuze (BHI), jejichž složení je znázorněno v následující tabulce (Tab. 3).

Tab. 3. Složení jednotlivých kultivačních médií.

Kultivační médium	Složení	Množství
Masopeptonový bujón	NaCl	3g
	Masový extrakt	3g
	Pepton	5g
	Destilovaná voda	1000 ml
Masopeptonový agar	NaCl	3g
	Masový extrakt	3g
	Pepton	5g
	Bakteriologický agar	15g
	Destilovaná voda	1000 ml
Soft agar	NaCl	5g
	Masový extrakt	3g
	Pepton	5g
	Bakteriologický agar	10,5g
	Destilovaná voda	1000 ml
BHI bujón	Bujón z mozkosrdcové infuze	17,5 g
	Proteozový pepton	10 g
	NaCl	5 g
	dextróza	2 g
	hydrogenfosforečnan disodný	2,5 g

V této práci byly použity následující roztoky: fyziologický roztok, Tris-acetátový pufr (TAE) pufr 1x, TAE pufr 50x, 1,5% agarózový gel, jejichž složení je znázorněno v následující tabulce (Tab. 4).

Tab. 4. Složení jednotlivých roztoků.

Roztok/gel	Složení	Množství
Fyziologický roztok	NaCl	8,5 g
	Destilovaná voda	1000 ml
TAE pufr 50x koncentrovaný	TRIS	242 g
	0,5 M EDTA	100 ml
	Kyselina octová	57,1 ml
	Destilovaná voda	800 ml
TAE pufr 1x koncentrovaný	TAE pufr 50x	20 ml
	Destilovaná voda	980 ml
Agarózový gel	TAE pufr 1x	250 ml
	Agaróza	3,75 g
	Ethidium bromid	13 μ l

5.1.2 Chemikálie

V této práci byly použity následující chemické látky:

- Agaróza.....Sea Kem LE Agarose Lonza, USA
- DNA marker – Gene ruler 100 bp Plus.....Thermo Fisher Scientific, USA
- Master Mix – red Taq 2x MM, 1,5 mM.....Ampliqon, Dánsko
- dNTP Mix-12,5 mM.....Roche Diagnostics GmbH, Německo
- EDTA (0,5M roztok EDTA)Lachema a.s., Česká republika
- Ethanol 98 %..... Lach-Ner s.r.o., Česká republika
- Ethidium bromid..... Sigma Aldrich, Německo
- Chloroform.....Penta, Česká Republika
- Mitomycin C..... Sigma-Aldrich, USA
- Primery (uvedeny v Příloze 1.)
- PCR voda
- PCR pufr
- Destilovaná voda

5.1.3 Laboratorní přístroje

AURA PCR pracovní box	BioAir Instruments, Itálie
Automatické mikropipety	Nichiryo, Japonsko
Automatické mikropipety	Eppendorf Research, Německo
Box laminární.....	Telstar Bio II - A KR, Velká Británie
Biohazard Box.....	Schoeller EUROFLOW, Holandsko
Bio Vortex V1.....	Biotech, Česká republika
Centrifuga – MiniSpin plus.....	Eppendorf Research, Německo
Centrifuga –Hermle Z300 K.....	Hermle Labor Technik, Německo
Digitální váha.....	Kern&Sohn GmbH, Německo
Digestoř.....	Merci s.r.o
Elektroforetické zařízení MP-300N.....	Tajwan
Mikrovlnná trouba.....	Elektrolux EMS2
Termoblok.....	BIO TDB Litva
Termocykler PTC 100MJ.....	Research Bio-Rad, USA
Termocykler C1000.....	Touch Bio-Rad, Singapur
Termostat BT 120	Česká republika
Vodní lázeň WB.....	Memmert, Německo
Ultrazvuk – ultrasonic cell disruptor X2.....	Microson Misonix, USA
UV transluminátor In Genius	SynGene Imaging, Velká Británie
Vortex V1.....	Biotech, Česká republika
Běžné laboratorní sklo a pomůcky	

5.1.4 Bakteriální kmeny

Pro detekci bakteriocinů se v této práci pracovalo s vybranou skupinou 15 izolátů *E. coli* ze zvěřiny, které byly získány z výtěrů volně žijící zvěře pocházející z honiteb na území Moravy v období let 2010 – 2014. Tyto kmeny jsou součástí sbírky na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně. Jednalo se o izoláty s označením: S1, S2, S3, S7, S8, S13, S20, S22, S31, S32, S33, S34, S35, 222, 225. Pro genomickou analýzu byl navíc použit izolát z kuřecího masa s označením 28, který je uložen ve stejné sbírce.

Pro stanovení biologické aktivity byly pro tuto práci využity indikátorové kmeny *Escherichia coli*, konkrétně: K12 Row, B1, ϕ , P 400, které byly získány z Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Pro analýzu genomu pomocí bioinformatických metod byly využity kmeny *E. coli* 225, S35 a 28.

5.2 Metody

5.2.1 Stanovení produkce bakteriocinů

Zamražené kmeny *E. coli* byly vyočkovány křížovým roztěrem na MPA a kultivovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Pro další práci byly misky nadále uchovávány ve 4 °C.

Nejprve byly izoláty otestovány na produkci bakteriocinů kvalitativně – vpichovým pokusem. Bakteriální kultura testovaných kmenů byla vpichem naočkována do misek s MPA agarem a kultivována v termostatu 48 hodin při 37 °C. Poté byly bakterie usmrceny parami chloroformu (30 minut). Po odvětrání byly misky převrstveny 3 ml Soft agaru s 0,1 ml čerstvě narostené kultury indikátorových kmenů (P 400, B1, K 12 Row, ϕ). Po ztuhnutí agaru byly misky kultivovány přes noc v termostatu při 37 °C a druhý den byla zjišťována přítomnost a velikost inhibičních zón okolo nárůstů kolonií produkčních kmenů. Velikost byla hodnocena jako -, +, ++, +++, +++++. Indikátorový kmen byl označen jako citlivý v případě, že byla vytvořena inhibiční zóna kolem produkčního kmene.

Dále proběhlo kvantitativní stanovení biologické aktivity u kmenů 225, S1, S7, S33. Prvním krokem tohoto experimentu byla příprava surového bakteriocinu. V BHI bujónu přes noc narostlé produkční kmeny *E. coli* byly zaočkovány do sterilního BHI bujónu v Erlen. baňce v poměru 1:50 (tj. 3 ml bakteriální suspenze + 150 ml bujónu). Kultivace pak probíhala aerobně na třepačce v termostatu 3-6 hodin při 37 °C. Dále byl přidán mitomycin C, aby výsledná koncentrace byla 1 $\mu\text{g/ml}$ (tj. 150 μl o $c = 1 \text{ mg/ml}$) a poté pokračovala kultivace další 3 – 4 hodiny. Po kultivaci byla suspenze zcentrifugována (15 minut/ 2000 g) a získaný sediment z buněk dvakrát promyt sterilní destilovanou vodou. Poté byly vyčištěné buňky za stálého chlazení diskontinuálně rozrušovány ultrazvukovým dezintegrátorem a centrifugovány (15 minut/ 2000 g) pro odstranění zbytků rozbitých buněk. Získané supernatanty byly nadále uchovávány ve sterilních zkumavkách s přídavkem 1 ml CHCl_3 v lednici při 4 °C.

Následovala titrace kapkovou metodou. Předem připravené Petriho misky s MPA (rozděleny na poloviny/třetiny a označeny tečkami) byly převrstveny 3 ml Soft agaru s 0,1 ml kultury indikátorového kmene. Na povrch agaru byly pipetovány 3 μ l kapky získaného bakteriocinu naředěného desítkovou řadou (10^0 - 10^{-5}) a následovala kultivace v termostatu do druhého dne při 37 °C. Druhý den se odečítala přítomnost inhibičních zón. Titr kolicinů byl posléze vyjádřen jako převrácená hodnota posledního ředění tvořící viditelnou zónu v arbitrárních jednotkách (AU), (Schamberger a kol., 2004).

5.2.2 Bakteriocinotypizace

Prvním krokem bakteriocinotypizace byla kultivace a izolace kmenů *E. coli*. Do předem popsaných sterilních zkumavek typu Eppendorf bylo napipetováno 100 μ l 1x ředěného PCR pufru. Pomocí kličky se z Petriho misek s narostlými testovanými kmeny odebraly jednotlivé bakteriální kolonie do eppendorfek s pufrům a suspenze se důkladně zhomogenizovala na vortexu. Suspenze byla následně vložena do termobloku, který se nastavil na 95 °C, 20 minut. Po vyjmutí z termobloku se zkumavky vložily do centrifugy na 1 minutu při 14500 otáčkách. Poté byl odpipetován do nových předem označených eppendorfek supernatant, který následně sloužil jako templátová DNA pro PCR reakce.

Po provedení izolace DNA následovala PCR. Jednotlivé komponenty reakční směsi (Tab. 5), byly připraveny jako master mix, z důvodu rychlejší práce a také eliminace chyb, které nastávají při pipetování velmi malých množství.

Tab. 5. Složení směsí pro simple a duplex PCR.

PCR	Složení	Objem [μ l]
Simple PCR	Red Taq 2x MasterMix	12,5
	Primery F/R	0,25/0,25
	PCR voda	11,5
	templátová DNA	0,5
Duplex PCR	Red Taq 2x MasterMix	12,5
	Primery F ₁ /R ₁	0,25/0,25
	Primery F ₂ /R ₂	0,25/0,25
	PCR voda	11,0
	templátová DNA	0,5

Celkový objem jedné reakční směsi byl 25 μ l. Seznam primerů použitých pro detekci kolicinů a mikrocinů je uveden v Příloze 1.

Jelikož se převážně jednalo o duplex PCR, kdy se detekují dva geny pro bakteriociny zároveň, byly primery podle velikosti svého specifického PCR produktu seřazeny do párů (Tab. 6).

Tab. 6. Rozdělení primerů do párů pro duplex PCR.

	Páry primerů (bp)
1.	ColE2 (409) + ColIa (473)
2.	ColD (420) + ColA (475)
3.	ColE3 (413) + ColIb (464)
4.	ColE4 (409) + ColS4 (456)
5.	ColE6 (399) + ColE8 (449)
6.	ColE9 (418) + ColK (469)
7.	ColM (429) + ColY (477)
8.	ColN (401) + Col10 (448)
9	ColE1 (649) + Col5 (449)
10.	ColE7 (431) + ColB (492)
11.	Col28b (449) + ColJs (254)
12.	ColE5 (430)*
13.	ColE1-1 (399)*
14.	MccB17 (135) + MccH47 (227)
15.	MccC7 (134) + MccE492 (291)
16.	MccJ25 (175) + MccM (456)
17.	MccV (680) + MccL (233)

* U kolicinu E5 a E1-1 byla provedena simple PCR.

Jednotlivé komponenty se nechaly po vyjmutí z mrazničky rozmrazit, a až na templátovou DNA, byly v množství vynásobeném podle počtu vzorků (+ 2 vzorky rezerva, + pozitivní kontrola, + negativní kontrola) napipetovány do zkumavky typu Eppendorf. Tato směs byla promíchána na vortexu, a následně rozpipetována do předem označených mikrozkušavek určených k PCR reakci po objemu 24,5 µl. K tomuto objemu byla následně přidána templátová DNA v objemu 0,5 µl, a směs se opětovným nasátím a vysátím pipetou promíchala. Amplifikace PCR byla prováděna v termocykleru za podmínek, které jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tab. 7. Podmínky PCR reakce.

Průběh amplifikace	Teplota a čas
Úvodní denaturace	95 °C/10 minut
Opakování cyklu	35x
Denaturace	95 °C/1 minuta
Annealing	55 °C/1 minuta
Extenze	72 °C/1 minuta
Závěrečná extenze	72 °C/3 minuty
Chlazení	4 °C/∞

Pro detekci získaných PCR produktů po amplifikaci byla použita gelová elektroforéza. Pro dosažení 1,5% gelu bylo naváženo 3,75 g agarózy do 250 ml 1x TAE pufru, který byl předem připraven zředěním 50x koncentrovaného TAE pufru. Vzniklá směs se nechala rozpustit v mikrovlnné troubě. Po mírném zchlazení byl přidán ethidium bromid v konečné koncentraci 0,5 μ l /ml gelu. Směs se promíchala a nalila do předem připravené vaničky s hřebínkem o dostatečném množství jamek a nechala se 20 minut stát. Po zatuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek a připravený gel se přenesl do elektroforetické vany, kde se přelil 1x koncentrovaným TAE pufrům. Do první a poslední jamky byl nanesen DNA marker 100 bp jako standard. Do jednotlivých jamek pak byly napipetovány jednotlivé vzorky v objemu 2 μ l. Elektroforetická separace poté probíhala při 90 V/60 minut.

Po ukončení elektroforézy bylo provedeno vyhodnocení pomocí transiluminátoru a výsledek byl vyfocen a uložen pomocí programu GeneSnap od Syngene.

5.2.3 Analýza genomu *E. coli*

Ve spolupráci s Lékařskou fakultou Masarykovy univerzity a Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně proběhla základní analýza bakteriálních genomů. K vytvoření charakteristiky bakteriálních genomů pomocí programů BLAST a RAST byly k dispozici kmeny *E. coli* s označením 225, S35 a 28. Aby mohla být provedena charakteristika těchto genomů, musely být genomy nejprve osekvenovány. Knihovna na sekvenaci byla připravena pomocí kitu Nextera® XT DNA Sample Preparation Guide a sekvenace proběhla na přístroji Illumina MiSeq. Ze získaných dat ze sekvenování byly

dále seskládány jednotlivé fragmenty sekvence genomu a to metodou *de novo* pomocí programu SeqMan NGen 4, kdy se vytvořily tzv. kontigy. S těmito kontigy bylo nadále možné pracovat v bioinformatických databázích. Příprava knihovny, sekvenace a tvorba kontigů byly provedeny v minulosti a nejsou součástí této práce.

V této práci se pracovalo s již vytvořenými kontigy jednotlivých kmenů ve formě FASTA souboru. Nejprve se soubory s kontigy nahrály do BLASTu, což je program využívající alignment pro prohledávání databází a srovnávání nukleotidových nebo proteinových sekvencí se sekvencemi z různých NCBI databází, a BLAST následně po porovnání genomů 225, S35 a 28 s databázemi, vygeneroval nejpodobnější již známý organismus. V programu RAST se opět nahrál soubor s kontigy a po anotaci, která trvala do 24 hodin, se dále vyhodnotila základní charakteristika bakteriálních genomů.

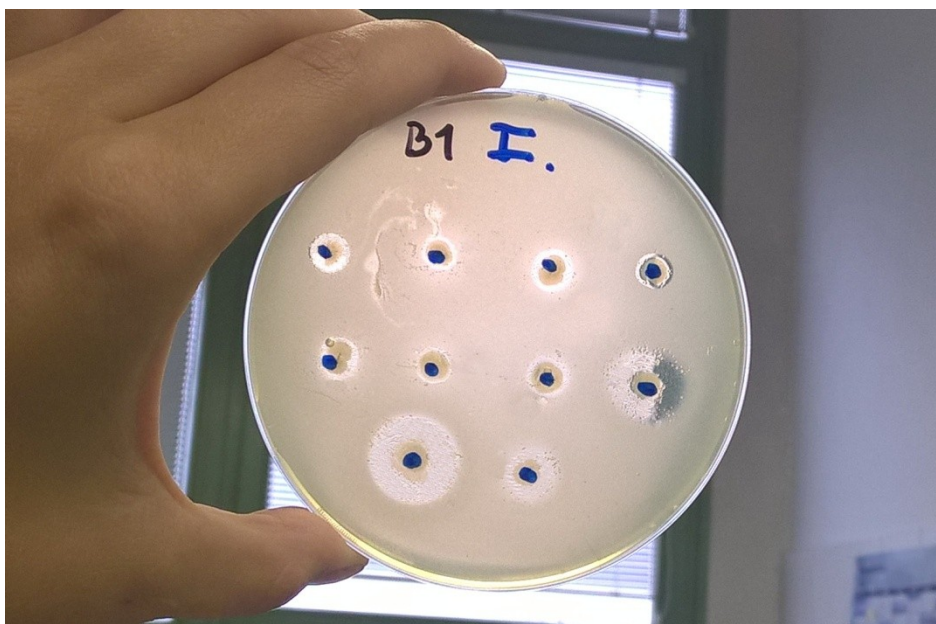
Pro vyhledání známých sekvencí bakteriocinů, byl dále použit další bioinformatický program MUMmer, s kterým se pracuje přes příkazový řádek v operačním systému Linux a tento program je vhodný především pro zpracovávání velkého objemu dat v krátkém čase.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Detekce bakteriocinogenie

Bakteriociny jsou látky bakteriálního původu s antimikrobiálním působením, které vznikají syntézou na ribozomech (Cornut a kol., 2008). Bakterie *E. coli* je schopna produkovat dva typy bakteriocinů - koliciny a mikrocinů, a většina bakteriocinogenních kmenů *E. coli* může produkovat více než jen jeden bakteriocin. Tato vlastnost jim dává ve společenství oproti ostatním bakteriím jistou selekční výhodu. Může se jednat o produkci více kolicinů najednou, nebo produkci kolicinů a mikrocinů současně (Gordon a O'brien, 2006; Riley a Chavan, 2007). Bakteriociny lze kvalitativně detekovat pomocí vpichového pokusu a typizovat metodou PCR.

Vpichovým pokusem bylo testováno 15 bakteriálních kmenů *E. coli* izolovaných ze zvěřiny na citlivost vůči čtyřem indikátorovým kmenům s označením: ϕ , K 12 Row, P400, B1, a byl sledován jejich inhibiční vliv na tyto kmeny. Bylo zjištěno, že 14 z 15 kmenů vykazuje inhibiční účinek. U 13 kmenů se projevila inhibice u všech čtyř indikátorových kmenů. Pouze kmen S1 neměl inhibiční vliv na indikátorový kmen ϕ . Tvorba inhibičních zón (Obr. 4) značí produkci bakteriocinů.



Obr. 4. Vpichový pokus -inhibiční účinek produkčních kmenů na indikátorový kmen B1.

* Zleva doprava nahoře: S1, S2, S3, S7, uprostřed: S22, S20, S13, S8, dole: S32, S31.

Výsledky z testování vpichovým pokusem jsou znázorněny v Tabulce 8.

Tab. 8. Odečty inhibičních zón podle velikosti.

Označení kmene	Indikátorový kmen			
	ϕ	K12 Row	P400	B1
S1	-	+ (č)	+ (č)	+ (č)
S2	++ (č)	+ (m)	+ (m)	+ (č)
S3	++ (č)	+ (m)	+ (m)	+ (č)
S7	+ (č)	+ (č)	+ (č)	+ (č)
S8	++ (č)	++ (č)	++ (č)	+++ (č)
S13	++ (č)	+ (m)	+ (m)	+ (č)
S20	++ (č)	+ (m)	+ (m)	+ (č)
S22	++ (č)	++ (m)	++ (m)	+ (č)
S31	++ (č)	++ (č)	++ (č)	++ (č)
S32	+++ (č)	+++ (č)	+++ (č)	+++ (č)
S33	+++ (č)	+++ (č)	+++ (č)	+++ (č)
S34	++ (č)	++ (m)	++ (m)	++ (m)
S35	-	-	-	-
222	++ (č)	+ (m)	++ (m)	++ (m)
225	++ (č)	++ (č)	+ (č)	+ (č)

* - nepřítomnost zóny, (č) čirá zóna, (m) matná zóna, + malá zóna, ++ střední zóna, +++ větší zóna.

Bakteriocinogenie u kmenů bakterie *E. coli* byla pomocí vpichového pokusu zjišťována v mnoha studiích. Ve studii O'Briena a kol. (1996) bylo testováno 568 izolátů *E. coli*, které způsobují infekce močových cest u pacientů žijících na Novém Zélandu, a bylo zjištěno, že 42,6 % testovaných kmenů je bakteriocinogenních (O'Brien a kol., 1996).

V průběhu let 1993 – 1999 bylo nashromážděno 1043 humánních izolátů, které byly v práci Šmardy a Obdržálka (2001) otestovány na produkci bakteriocinů. U izolátů původem ze zdravého střeva bylo zjištěno 41,37 % produkčních kmenů a u pacientů postižených salmonelovou infekcí byl výskyt bakteriocinogenie stejný jako u zdravých (Šmarda a Obdržálek, 2001).

Další studie, která využila vpichový pokus k detekci bakteriocinů, byla provedena Šmajsem a kol. (2010) a bylo v ní testováno 361 kmenů *E. coli* izolovaných od pacientů

s infekcí močových cest (UTI) a 411 kontrolních kmenů izolovaných ze stolice pacientů bez bakteriální infekce. U kmenů UTI bylo vyhodnoceno 54 % kmenů jako produkčních, u kontrolních kmenů produkovalo bakteriocin 55 % (Šmajš a kol., 2010).

Navyšující se procento detekce bakteriocinogenie může mít příčinu v použití stále se zdokonalujících detekčních technik a možnostech testování stále nových typů kolicinů a mikrocinů objevených a popsanych v průběhu let. Předpokládá se, že více než 99 % mikroorganismů má schopnost produkovat alespoň jeden bakteriocin, a s nově popsanyými bakteriociny tak bude nejspíš růst i procento detekované bakteriocinogenie (Cascales a kol., 2007).

6.2 Bakteriocinotypizace pomocí PCR

Po provedení vpichového pokusu bylo dále v této práci cílem detekovat jednotlivé koliciny a mikrocinu pomocí duplex PCR, kdy probíhalo testování přítomnosti dvou kolicinů/mikrocinů zároveň. Jednotlivé koliciny/mikrocinu byly identifikovány pomocí specifických primerů (viz. Příloha 1.), kdy se pomocí PCR namnožil gen pro daný kolicin/mikrocin a tento PCR produkt byl dále vizualizován pomocí gelové elektroforézy (Obr. 5). Pro ověření funkce specifických primerů byly použity pozitivní kontroly, což jsou izolované DNA z typového bakteriálního producenta daného bakteriocinu.



Obr. 5. Agarózový gel s PCR produkty Duplex PCR reakce (Col M + Col Y).

*Jamka č. 1: velikostní marker, č. jamka č. 2-15: jednotlivé izoláty, jamka č. 16 pozitivní kontrola v duplex reakci pro kolicin Y a M, jamka č. 16+17: pozitivní kontroly v simple reakci, jamka č. 17: negativní kontrola, jamka č. 18: velikostní marker.

Pomocí specifických primerů bylo v našich podmínkách možné otestovat přítomnost genů pro 23 z 24 typů kolicinů (A, B, D, K, L, M, N, E1, E1-1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, Ia, Ib, Y, Js, 10, S4, 5) a 8 typů mikrocinů (J25, B17, H47, V, C7, E492, M, L), (Tab. 9).

Tab. 9. Produkce kolicinů a mikrocinů u 15 testovaných kmenů *E. coli*.

Kolicin	Označení kmene															
	S1	S2	S3	S7	S8	S13	S20	S22	S31	S32	S33	S34	S35	222	225	
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
N	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
E1-1*	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ia	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
Ib	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	
Y	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Js	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mikrocin																
J25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B17	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
H47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
V	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	
C7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

* + přítomnost specifických PCR produktů, - nepřítomnost specifických PCR produktů. Pro detekci sekvenčně různorodých genů kódující kolicin E1 byl použit další pár primerů s označením *cea2-F/cea2-R*.

Z 15 otestovaných kmenů byla zjištěna přítomnost genů nejméně jednoho bakteriocinu u 14 kmenů. Pouze jeden kmen (S1) má gen pro jeden bakteriocin, a to kolicin Y. U dvou kmenů (S8, S22) byla zjištěna produkce 3 typů bakteriocinů, u šesti kmenů (S2, S3, S7, S32, S33, S34) byly stanoveny 4 typy bakteriocinů. Produkce 5 bakteriocinů byla zjištěna u jednoho z kmenů (S31) a až 6 bakteriocinů produkují čtyři kmeny (S13, S20, 222, 225).

Multiprodukce bakteriocinů, neboli produkce 2 a více typů bakteriocinů zároveň, byla v této práci stanovena u většiny kmenů a z hlediska konkurenčního boje je významnou vlastností kmenů. Pokud kmen produkuje pouze jeden typ bakteriocinu, tak může usmrtit jen senzitivní buňky, pokud však kmen rekombinací získá gen pro jiný typ bakteriocinu a stane se tak multiprodukčním, dostává se mu schopnost usmrtit nejen senzitivní buňky, ale i buňky monoprodukčních kmenů. Lze usoudit, že výskyt multibakteriocinogenních kmenů je zcela běžný jev, což potvrzuje nejedna provedená studie.

Ve studii Gordon a O'Briena (2006) bylo testováno 266 humánních izolátů *E. coli* a produkce bakteriocinů byla prokázána u 38 % z těchto izolátů, kdy 42 % z produkčních kmenů produkovalo nejméně 1 kolicin, 41 % produkovalo 2 koliciny, 16 % tři koliciny a jeden kmen produkoval 4 koliciny (Gordon a O'Brien, 2006).

Nejčastěji produkované bakteriociny v této práci byly koliciny B a M, které byly stanoveny současně u 12 ze 14 produkčních kmenů. Tyto koliciny bývají často kmeny produkované současně a jsou uloženy na jednom plazmidu nazývaný ColBM. Kolicin M je zodpovědný za inhibici syntézy peptidoglykanu a kolicin B způsobuje tvorbu pórů v cytoplazmatické membráně (Abraham a kol., 2011; Braun a kol., 2002). Ve studii Christesona a Gordona (2009) byly geny kolicinu B a M současně detekovány u 128 z 1304 zkoumaných kmenů *E. coli*, z nichž 619 izolátů bylo humánního původu a 685 izolátů bylo animálních (savci, ptáci, plazi). Bylo zjištěno, že 69 % BM produkčních izolátů produkuje oba koliciny, 3 % byly pozitivní pouze na kolicin M, a u žádného z těchto kmenů se nevyskytoval samostatně pouze kolicin B. U 28 % izolátů pak byly detekovány imunitní geny kolicinu B a M (Christenson a Gordon, 2009). Asociace těchto dvou kolicinů byla potvrzena i v této práci u kmenů izolovaných ze zvěřiny.

Dalším častým kolicinem byl kolicin Ib, který byl detekován u 9 ze 14 kmenů, a kolicin Ia, který byl detekován u poloviny izolátů. Tyto dva koliciny se často vyskytují současně díky tomu, že jejich geny vykazují vysokou sekvenční homologii (Mankovich a kol., 1986). V této práci byl zjištěn současný výskyt kolicinu Ia a Ib u 7 kmenů a u 2 kmenů byl

detekován výskyt jen kolicinu Ib. Rozlišení, zda se opravdu jedná o kolicin Ia nebo Ib lze provést sekvenací. Mechanismus letálního účinku na buňky u kolicinu Ia i Ib je tvorba pórů v cytoplazmatické membráně (Abraham a kol., 2011). V literatuře byl také popsán současný výskyt kolicinu Ia s mikrocinem V, neboť tyto dva bakteriociny jsou často kódovány na stejném plazmidu (Jeziorowski a Gordon, 2007). V této práci byla asociace kolicinu Ia s mikrocinem V prokázána jen u 3 kmenů.

U kolicinu E1 byly k detekci použity dvě sady primerů z důvodu sekvenčně různorodých genů kódujících kolicin E1. U dvou izolátů byl kolicin E1 detekován při použití první sady primerů. Při použití druhé sady primerů byl tento kolicin detekován jen u jednoho kmene. Kolicin E1 byl ve studii Šmajse a kol. (2010) označen za potenciální virulentní faktor uropatogenních kmenů *E. coli* a může se potencionálně jednat o patogenní kmen podílející se na vzniku infekcí močových cest (Šmajsa a kol., 2010). Ve studii Gordona a O'Briena (2006) byl také popsán současný výskyt kolicinu E1 s kolicinem Ia, pokud chybí mikrocin V (Gordon a O'Brien, 2006). Výsledky práce toto tvrzení potvrdily u obou izolátů produkující kolicin E1.

Kolicin Y a N byly detekovány každý zvlášť jen u jednoho z izolátů. Nebyl zjištěn výskyt genů pro koliciny D, K, L, E2 – E9, Js, 10, S4, 5.

V případě mikrocinů byla nejčastější přítomnost stanovena pro mikrocin B17, který byl detekován u 9 izolátů ze zvěřiny. Tento mikrocin byl ve studii Gordona a O'Briena (2006) detekován pouze u 1 % izolátů humánního původu (Gordon a O'Brien, 2006). Mechanismus letálního účinku mikrocinu B17 je zabránění DNA replikace bakteriálního chromosomu inhibicí činnosti DNA gyrázy (Abraham a kol., 2011).

Mikrocin V byl vůbec prvním objeveným bakteriocinem a byl nejprve řazen mezi koliciny. Po objevení mikrocinů byl pro svou nízkou molekulovou hmotnost zařazen mezi mikrocin. Principem účinku mikrocinu V je působení na membrány bakteriálních buněk a inhibice tvorby iontových kanálů (Abraham a kol., 2011; Gratia, 1925). Ve studii Blanco a kol. (1997) bylo testováno 458 kmenů *E. coli* izolovaných z drůbeže trpící sepsí a 101 z těchto kmenů (22 %) produkovalo mikrocin V. Naproti tomu u zdravé drůbeže produkovalo mikrocin V pouze 12 ze 167 kmenů (7 %), (Blanco a kol., 1997). V této práci byl mikrocin V detekován u 4 izolátů ze zvěřiny.

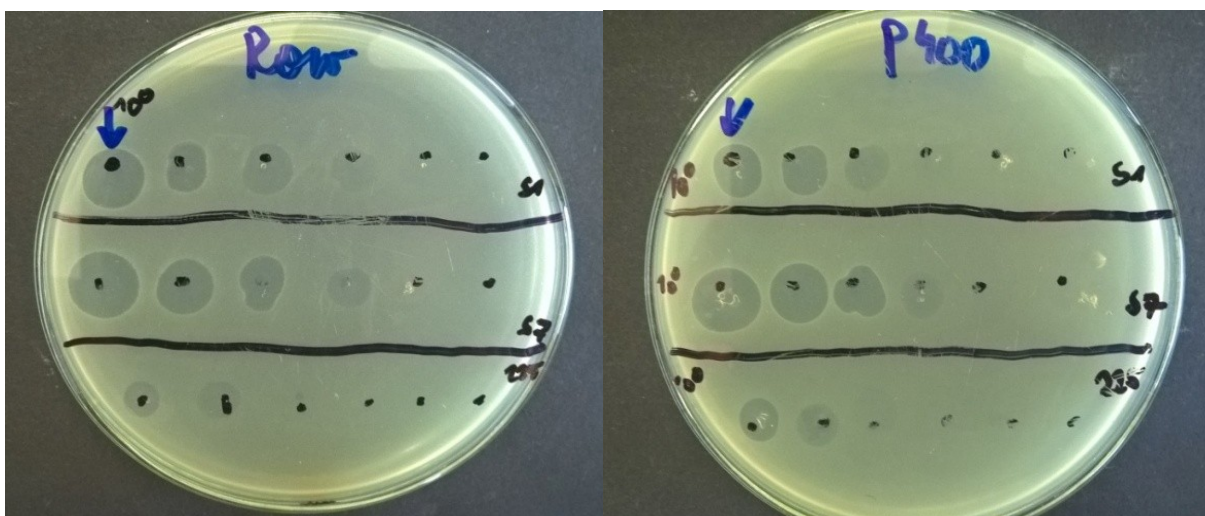
Dalším detekovaným mikrocinem u dvou kmenů byl mikrocin H47, což je u humánních izolátů nejčastěji detekovaný mikrocin a byla popsána i pozitivní asociace s kolicinem M

(Gordon a O'Brien, 2006), která se také prokázala v této práci (Tab. 9). Výskyt mikrocinu H47 je častý u extraintestinálních kmenů *E. coli*, kde například kmeny způsobující močové infekce produkující mikrocin H47 tvořily až 30,8 % izolátů (Šmajš a kol., 2010).

6.3 Kvantitativní stanovení produkce bakteriocinů

Biologická aktivita bakteriocinů byla kvantitativně stanovována u čtyř vytipovaných kmenů s označením S1, S7, S33 a 225. Tyto kmeny byly vybrány na základě detekce různých typů bakteriocinů.

Cílem bylo určit nejsilnější kmen pro použití v dalším výzkumu. Nejprve byly izolovány surové bakteriociny jednotlivých kmenů a dále byla jejich testována inhibiční účinnost titrací kapkovou metodou proti čtyřem indikátorovým kmenům s označením: ϕ , K 12 Row, P400, B1 (Obr. 6). Titr kolicinů byl poté udáván v dohodnutých jednotkách AU (převrácená hodnota nejvyššího ředění, které ještě vyvolává zřetelnou inhibici růstu indikátorového kmene).



Obr. 6. Kapková metoda – stanovení titru bakteriocinu proti indikátorovým kmenům P400 a Row.

*Ředění desítkovou řadou: zleva doprava: 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , nahore: kmen S1, uprostřed: kmen S7, dole: kmen 225.

Výsledky stanovení titru bakteriocinů jsou znázorněny v Tabulce 10.

Tab. 10. Výsledky stanovení titru bakteriocinů.

Označení kmene	Indikátorový kmen			
	ϕ	K12 Row	P400	B1
S1	2 (3)	2 (4)	2(3)	2 (3)
S7	3 (4)	2 (3)	2 (3)	3 (4)
S33	1 (3)	0 (3)	0 (2)	1 (3)
225	2 (4)	1 (3)	1 (3)	1 (3)

* Číselná hodnota vyjadřuje nejvyšší ředění čiré zóny, číselná hodnota v závorce vyjadřuje nejvyšší ředění, kde se vyskytuje matná zóna.

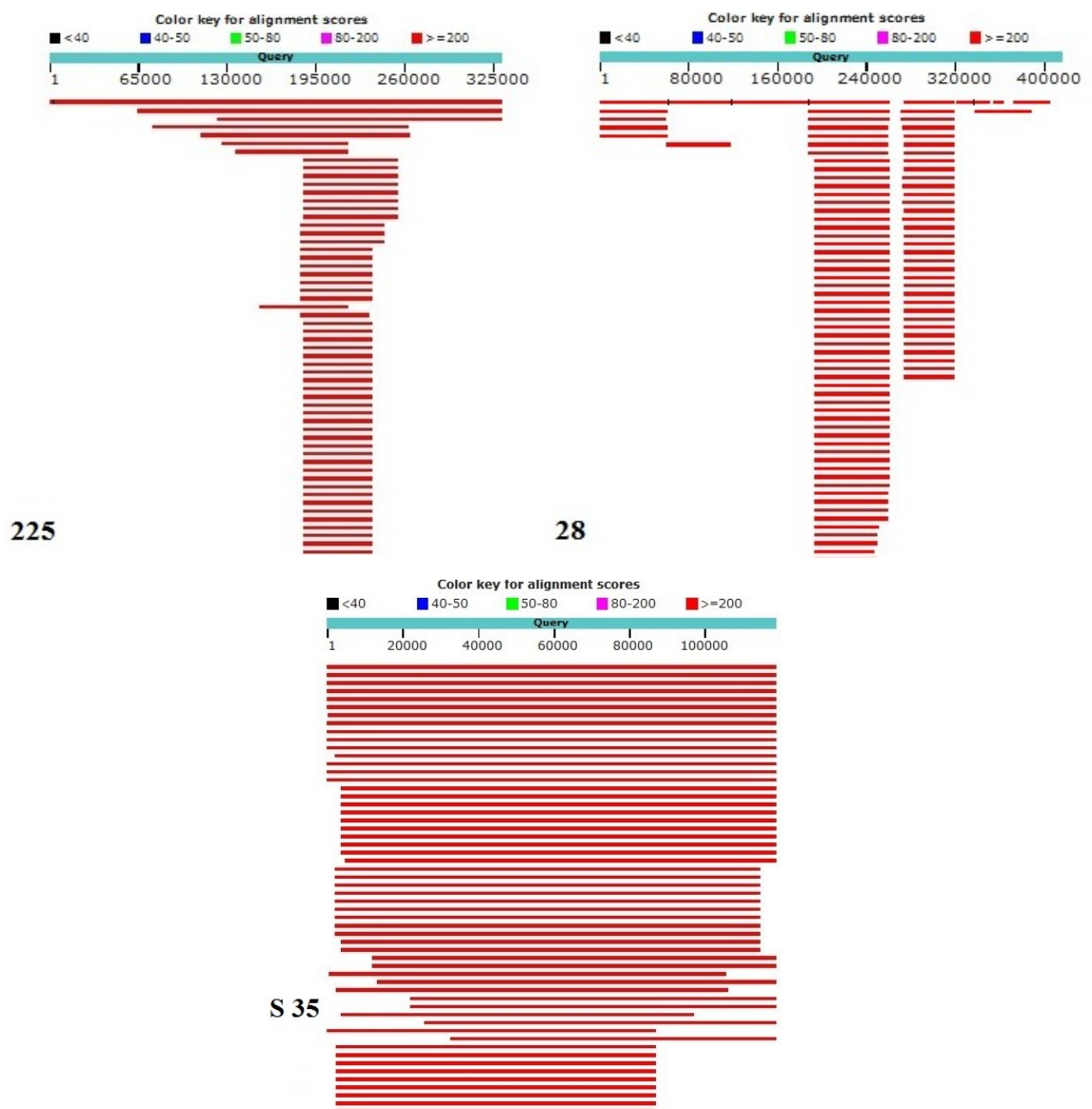
Z uvedených výsledků vyplývá, že nejvyšší titr měl surový bakteriocin izolovaný z kmene S7, a proto je vhodné v nenásledném výzkumu dále testovat potenciál tohoto kmene. Kmen S7 byl zvolen na základě jeho produkce kolicinu E1, dále kmen S7 produkuje kolicin Ia a Ib. Kmen S1 byl zvolen na základě produkce kolicinu Y a také prokázal poměrně výrazný inhibiční vliv u kvalitativního stanovení bakteriocinů vpichovým pokusem. Je tedy možné, že tento kmen produkuje doposud nepopsaný typ bakteriocinu. Kmen S33 byl vybrán z důvodu tvorby velkých inhibičních zón při vpichovém pokusu a také z důvodu produkce 4 typů bakteriocinů, a to: kolicin B, M, Ib a mikrocin B17. Izolovaný surový kolicin z tohoto kmene neměl oproti ostatním testovaným kmenům tak vysoký titr. Kmen 225 podobně jako kmen S7 produkuje kolicin E1, dále produkuje kolicin B, M, Ia, Ib a mikrocin B17.

6.4 Základní charakteristika bakteriálního genomu

Bakterii *E. coli* poprvé v roce 1885 izoloval rakousko-německý dětský lékař Theodor von Escherich. Od té doby se tato bakterie těší mimořádnému vědeckému zájmu a stala se jedním z modelových organismů. Osekvenovat genom této bakterie se poprvé podařilo v roce 1997 a díky ochotě přijímat genetickou informaci a získávat tak nové vlastnosti kolísá velikost genomu od 4,5 do 5,5 Mb (Bergthorsson a Ochman, 1998; Blattner a kol., 1997). Přídavnou genetickou informací, která umožňuje kmenům *E. coli* se prosadit v konkurenčním boji, jsou i geny kódující produkci bakteriocinů.

V této práci byla získána data z celogenomové sekvenace tří kmenů 225, S35 a 28 ve formě kontigů. Kmen *E. coli* 28 byl izolován z chlazené drůbeže a do této analýzy byl přibrán pro komparaci genomů s izoláty *E. coli* ze zvěřiny.

Po nahrání souborů s kontigy genomů do online programu BLAST, což je algoritmus, který využívá alignment pro prohledávání databází a srovnávání nukleotidových sekvencí se sekvencemi z různých NCBI databází, byl nalezen mikroorganismus s největší podobností. Tento algoritmus hledá v databázi homologní sekvence na základě lokální podobnosti a vypočítává statistickou významnost shod. BLAST je víceméně jediný nástroj, kterým lze podobné sekvence v databázích hledat (Koski a Golding, 2001). Na Obrázku 7 jsou graficky znázorněné nejidentičtější mikroorganismy po porovnání s databází. Základní údaje jsou zobrazeny v Tabulce 11.



Obr. 7. Výstup z BLASTu po porovnání s databází.

* Znázornění pokrytí (query) zájmových sekvencí (225, 28, S35) s nalezenými sekvencemi a jejich párové skóre alignmentu v oblastech, kde se sekvence překrývají. Červená barva zobrazuje výsledek se skóre alignmentu >200, který je nejspolehlivější.

Tab. 11. Výstup z BLASTu, statistika pro párové porovnání nejpodobnější sekvence se zájmovými sekvencemi (225, S35, 28).

Kmen	225	S35	28
Identifikace (Definiton)	<i>Escherichia coli:</i> kmen D10, kompletní genom	<i>Escherichia coli:</i> kmen AZ155, kompletní genom	<i>Escherichia coli:</i> kmen 881
Maximální skóre (Max score)	6,019 Mb	7,375 Mb	1,328 Mb
Celkové skóre (Total score)	6,515 Mb	7,759 Mb	7,134 Mb
E-hodnota (E-value)	0,0	0,0	0,0
Shoda (Ident)	99 %	99 %	99 %
Pokrytí (Query)	99 %	100 %	91 %
Přístup (Accession)	GenBank: CP010157.1	GenBank: CP019005.1	GenBank: CP019029.1

* Maximální skóre: skóre alignmentu jednoho z úseků nalezené sekvence, který se povedlo zalignmentovat se zájmovou sekvencí. V případě, že nalezená sekvence je zalignmentována se zájmovou sekvencí v celé délce, hodnota maximálního skóre bude totožná celkovému skóre. Celkové skóre: součet skóre všech nekontinuálních částí lokálních alignmentů mezi zájmovou a nalezenou sekvencí. E-hodnota: kolikrát je možné v prohledávané databázi očekávat sekvenci se stejným skóre alignmentu jako má nalezená sekvence vůči zájmové náhodou. E-hodnota by měla být co nejmenší, ideálně nula. Shoda: kolik procent stejných nukleotidových bází se nachází v nalezené sekvenci. Pokrytí: jaká část zájmové sekvence je porovnávaná s nalezenou sekvencí. Přístup: odkaz na nalezenou sekvenci.

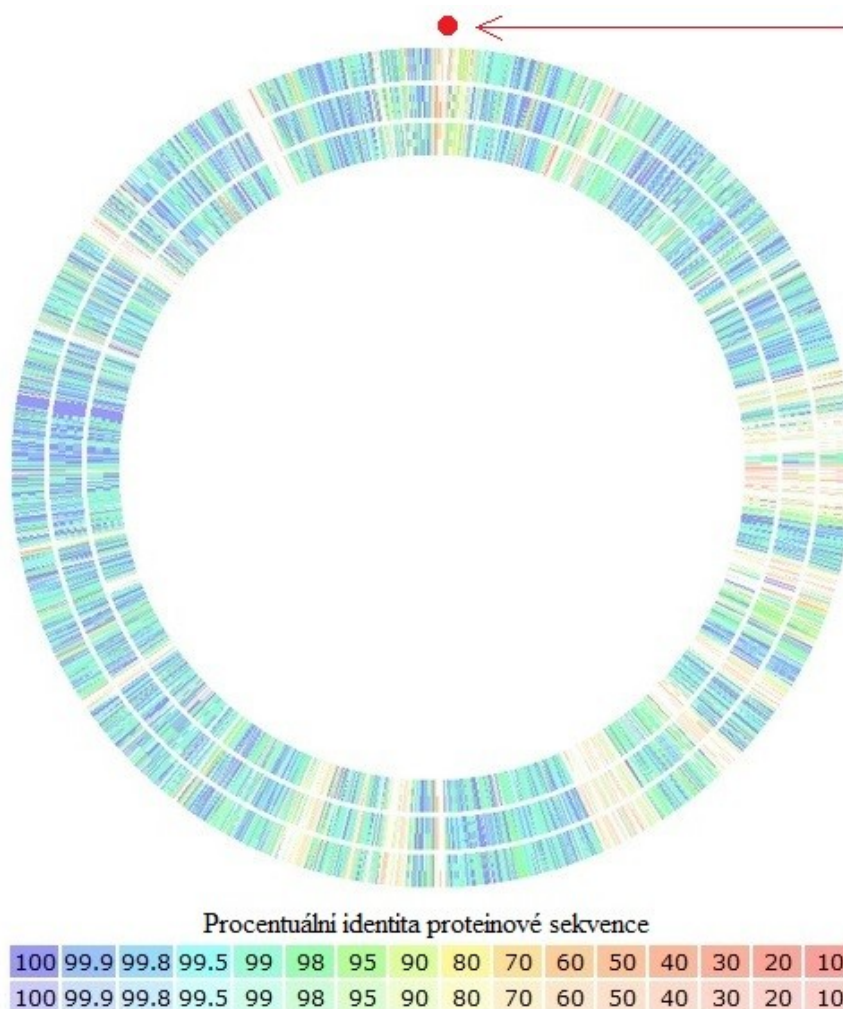
Genomy byly následně anotovány v programu RAST, a byla vyhodnocena základní charakteristika těchto genomů, která je shrnuta v Tabulce 12.

Tab. 12. Výstup z RASTu: Základní charakteristika genomů

Kmen	225	S 35	28
Doména (Domain)	Bakterie	Bakterie	Bakterie
Taxonomie (Taxonomy)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Velikost genomu (Size)	5343519 bp	7256342 bp	5315379 bp
Celkový počet kontigů (Number of Contigs)	456	3234	235
Počet kódujících sekvencí (Number of Coding Sequences)	5156	6662	5156
Obsah GC párů (GC Content)	50,8 %	50,3 %	50,4 %

*Počet kódujících sekvencí: sekvence DNA, která obsahuje informace pro vytvoření proteinu. Obsah GC párů: podíl guanino-cytosinového komplementárního páru (GC),

typicky v rámci určité DNA. Obsah GC bází je velmi variabilní nejen na úrovni druhů, ale i v rámci jediného genomu. Některé oblasti mají vyšší obsah GC, některé nižší. Geny často mají vyšší obsah GC bází. Obsahu GC se často využívá úrovní kmenů pro definici jednotlivých skupin (Bernardi, 2000).



Obr. 8. Výstup z RASTu: grafické znázornění porovnání genomů

* Vnitřní kruh: kmen 225, prostřední kruh: kmen S35, vnější kruh: kmen 28

Jednou z funkcí online programu RAST je grafické porovnání zájmových genomů (225, S35, 28) oproti referenčnímu (Obr. 8). Jako referenční kmen byl zvolen kmen *Escherichia coli* O157:H7. Podle barevné škály určující procentuální identitu proteinové sekvence srovnávaných genomů ve vztahu k referenci lze určit odlišná místa v genomech. Bílá místa v kruzích znázorňují doposud neanotované geny. Modře až zeleně označené části genomů jsou nejvíce identické s referenčním genomem. Místo označené červenou šipkou bylo vyhodnoceno jako nejvíce rozdílné oproti referenčnímu genomu. Z kruhové mapy genomů je patrné, že všechny tři genomy vykazují vysokou příbuznost k referenčnímu kmeni.

Pomocí příkazového řádku v operačním systému Linux byly vyhledány programem MUMmer známé sekvence kolicinů a mikrocinů u kmenů 225 a 28. U kmenu 225 byly nalezeny sekvence pro následující bakteriociny: kolicin E1, B, M, Ia, mikrocin B17 a cVac – což je oficiální označení strukturního genu nesoucí informaci pro produkci mikrocinu V (Azpiroz a Laviňa, 2007). Toto zjištění potvrdilo výsledky získané z bakteriocinotypizace pomocí PCR a to konkrétně u kolicinu E1, B, M, Ia a mikrocinu B17, což poukazuje na správnost provedení PCR u těchto reakcí. U PCR byl detekován také kolicin Ib a tento kolicin vykazuje vysokou sekvenční homologii s kolicinem Ia, tudíž se pomocí programu MUMmer potvrdilo, že se jedná jen o kolicin Ia (Mankovich a kol., 1986). Mikrocin V (cVac) nebyl pomocí PCR detekován. U kmenu 28 byla nalezena sekvence také pro mikrocin V (cVac). Jelikož tento kmen nebyl testován kvalitativně na produkci bakteriocinů, je to nový výsledek, zjištěný pomocí genomické analýzy.

ZÁVĚR

Bakteriociny jsou známy již několik desetiletí a je zkoumán jejich potenciál pro mnoho různých způsobů využití. Sleduje se jejich potenciální uplatnění jako náhrada chemických konzervantů v potravinářství, při ochraně potravin proti patogenům, jako náhrada antibiotik ve farmakologii, v medicíně jako probiotika a také látky s protinádorovou aktivitou. Bakterie *Escherichia coli* je charakteristická produkcí bakteriocinů – kolicinů a mikrocinů. *E. coli* může produkovat jeden typ bakteriocinu, může produkovat více kolicinů najednou, nebo koliciny i mikrocinů zároveň, což je řadí mezi multibakteriocinogenní kmeny, které mají schopnost usmrtit nejen senzitivní buňky, ale i buňky monoprodukčních kmenů.

V této práci bylo testováno 15 kmenů *E. coli* izolovaných ze zvěřiny na produkci bakteriocinů kvalitativně pomocí vpichového pokusu. U 14 z 15 těchto kmenů byla detekována produkce nejméně jednoho typu bakteriocinu. Následně proběhla bakteriocinotypizace pomocí PCR a byla zjištěna produkce 7 typů kolicinů (B, M, E1, Ia, Ib, Y) a 3 mikrocinů (B17, H47, V). Multiprodukce byla zjištěna u většiny kmenů. Nejčastěji se vyskytovaly koliciny B, M, Ib a Ia. Z mikrocinů se nejčastěji vyskytoval mikrocin B17. Poté byly vybrány 4 kmeny na základě dosažených výsledků a pomocí kapkové metody byl kvantitativně otestován titr těchto kmenů na čtyři indikátorové kmeny. Nejsilnější surový bakteriocin byl připraven z kmenu S7 a stává se tak vhodným kandidátem pro další výzkum.

V dnešní době je k dispozici nespočet bioinformatických nástrojů sloužících k analýzám bakteriálních genomů. Pomocí online nástrojů BLAST a RAST byla provedena identifikace a vytvořena základní charakteristika u genomů *Escherichia coli* 225, S35 a 28. Základní analýzou bakteriálních genomů nebyl u kmenů 225 a S35 izolovaných ze zvěřiny zjištěn zásadní rozdíl v genomech oproti kmenu 28 izolovaného z kuřecího masa.

U kmenů 28 a 225 byly pomocí bioinformatického nástroje MUMmer na platformě Linux vyhledány známé sekvence bakteriocinů. U kmene 28 byl objeven mikrocin V (cVac) a jelikož tento kmen nebyl doposud testován kvalitativně na produkci bakteriocinů, je to nový výsledek, zjištěný pomocí genomické analýzy. Dosažené výsledky u kmene 225 byly porovnány s výsledky PCR. Byla zjištěna shoda v zastoupení jednotlivých typů bakteriocinů u obou metod, až na mikrocin V (cVac), který se pomocí PCR nepovedl identifikovat, a kolicin Ib. Kolicin Ib vykazuje podobnou sekvenační homologii

s kolicinem Ia, a pomocí PCR nelze přesně určit, o který z nich se jedná. Pomocí genomické analýzy byla v případě kmenu 225 vyloučena přítomnost kolicinu Ib a potvrzena přítomnost kolicinu Ia. Na základě zjištěných výsledků lze předpokládat, že multiprodukce bakteriocinů u izolátů ze zvěřiny je velmi častým jevem. Genomická analýza odhalila nové výsledky, které dokazují, že sekvenační data jsou nejpřesnějším nástrojem analýzy genotypu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABRAHAM, S.; CHIN, J.; BROUWERS, H. J. M.; TURNER, B.; ZHANG, R.; CHAPMAN, T. A. Green Fluorescent Protein-Based Biosensor To Detect and Quantify Stress Responses Induced by DNA-Degrading Colicins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77 (18), s. 6691-6693. DOI:10.1128/AEM.00534-11
- ALTSCHUL, S.; WOLF, Y. I.; BHAGWAT, M.; ARAVIND, L.; GREENBAUM, D. S.; GREENBAUM, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997. 25 (17).
- AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGHT, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R. a kol. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 2008. 9 (1), 75 s. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75
- AZPIROZ, M. F.; LAVIÑA, M. Modular Structure of Microcin H47 and Colicin V. *Anti-microbial Agents and Chemotherapy*, 2007. 51 (7), s. 2412-2419. DOI:10.1128/AAC.01606-06.
- BARNES, W. M. DNA sequence from the histidine operon control region: seven histidine codons in a row. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978. 75 (9), s. 4281-4285.
- BECKER, E. A.; BURNS, C. M.; LEON, E. J.; RAJABOJAN, S.; FRIEDMAN, R.; FRIEDRICH, T. C.; O'CONNOR, S. L.; HUGHES, A. L. Experimental analysis of sources of error in evolutionary studies based on Roche/454 pyrosequencing of viral genomes. *Genome Biology and Evolution*, 2012. 4 (4), s. 457-465. DOI: 10.1093/gbe/evs029
- BENTLEY, D. R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SWERDLOV, H. P.; SMITH, G. P.; MILTON, J.; BROWN, C. G.; HALL, K. P.; EVERS, D. J.; BARNES, C. L. a kol. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 2008. 456 (7218), s. 53-59.
- BERGTHORSSON, U.; OCHMAN, H. Distribution of Chromosome Length Variation in Natural Isolates of *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 1998. 15 (1), s. 6-16.

BERNARDI, G. Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates. *Gene*, 2000. 241 (1), s. 3-17.

BLANCO, J. E., BLANCO, M., MORA, A., BLANCO, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35 (11), s. 2953–2957.

BLAST [online] – [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH C. A. a kol. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997. 277(5331), s. 1453-1462.

BORATYN, G. M.; CAMACHO, C.; COOPER, P. S.; COULOURIS, G.; FONG, A.; MA, N.; MADDEN, T. L.; MATTEN, W. T.; MCGINNIS, S. D.; MEREZHUK, Y.; RAYTSELIS, Y.; SAYERS, E. W.; TAO, T.; YE, J.; ZARETSKAYA, I. BLAST: a more efficient report with usability improvements [online]. *Nucleic Acids Research*, 2013. 41(W1), W29-W33 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1093/nar/gkt282. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt282>

BORRIELLO, S.; MURRAY, P. R.; FUNKE, G. *Topley and Wilson Microbiology and microbial infections*. 10th Ed. London: Hodder Arnold, 2005. 3500 s., ISBN 978-0-470-68638-6.

BOUVERET, E.; JOURNET, L.; WALBURGER, A.; CASCALES; BÉNÉDETTI, H.; LLOUBÈS, R. Analysis of the *Escherichia coli* Tol–Pal and TonB systems by peri-plasmic production of Tol, TonB, colicin, or phage capsid soluble domains [online]. *Biochimie*, 2002. 84 (5-6), s. 413-421. [cit. 2017-02-25] DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01423-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402014232>

BRAUN, V.; PILSL, H.; GROß, P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Archives of Microbiology*, 1994. 161 (3), s. 199–206.

BRAUN, V.; PATZER, S.; HANTKE, K. Ton- dependent colicins and microcins : modular design and evolution. *Biochimie*, 2002. 84 (5-6), s. 365–380.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHÉ, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBES, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007. 71 (1), s. 158-229. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06

CHRISTENSON, J. K.; GORDON, D. Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology*, 2009. 155 (5), s. 1645-1655. DOI: 10.1099/mic.0.026666-0.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. 66 (10), s. 4555-4558.

CORNUT, G.; FORTIN, C.; SOULIÉRES D. Antineoplastic Properties of Bacteriocins. Revisiting Potential Active Agents. *American Journal of Clinical Oncology*, 2008. 31 (4), s. 399-404. DOI: 10.1097/COC.0b013e31815e456d.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 2005. 3 (10), s. 777–788. DOI: 10.1038/nrmicro1273

CROUCHER, N. J.; FOOKES, M. C.; PERKINS, T. T.; TURNER, D. J.; MARGUERAT, S. B.; KEANE, T.; QUAIL, M. A.; MIAO, H.; ASSEFA, S.; a kol. A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology. *Nucleic Acids Research*, 2009. 37 (22). DOI: 10.1093/nar/gkp811.

CURSINO, L.; MARDA, J.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2002. 33 (3). DOI: 10.1590/S1517-83822002000300001.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*, 2002. 84 (5-6), s. 511-519. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01411-6.

DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, 2007. 24 (4), s. 708-734. DOI: 10.1039/b516237h.

EMBL-EBI [online] – [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: www.ebi.ac.uk

FARRER, R. A.; KEMEN, E.; JONES, J. D. G.; STUDHOLME, D. J. De novo assembly of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a genome using Illumina/Solexa short sequence Real. *FEMS Microbiology Letters*, 2009. 291 (1), s. 103-111. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01441.x.

GILLOR, O.; NIGRO, M. L.; RILEY, M. A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 2005. 11 (8), s. 1067-1075.

GILLOR, O., ETZION, A., RILEY M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008. 81 (4), s. 591-606. DOI: 10.1007/s00253-008-1726-5.

GORDON, D. M.; O'BRIEN, C. L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2006. 152 (11), s. 3239–3244. DOI: 10.1099/mic.0.28690-0.

GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 2008. 10 (10), s. 2484-2496.

GORDON, D. M.; RILEY, M. A.; PINOU, T. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiology*, 1998. 144 (8), s. 2233-2240. DOI: 10.1099/00221287-144-8-2233

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie et des ses Filiales*, 1925. 93 (1), s. 1040-1041.

HILSENBECK, J. L.; PARK, H.; CHEN, G.; BUTHYUN, Y.; POSTLE, K.; KANG, C. Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2,5 Å resolution. *Molecular Microbiology*, 2004. 51 (3), s. 711-720.

CHUMCHALOVÁ, J.; ŠMARDA, J. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiologica (Praha)*, 2003. 48 (1), s. 111-115.

JAKES, K. S.; FINKELSTEIN, A. The colicin Ia receptor, Cir, is also the translocator for colicin Ia. *Molecular Microbiology*, 2010. 75 (3), s. 567-578. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06966.x.

JAKES, K. S.; CRAMER, W. A. Border crossings: colicins and transporters. *Annual Reviews of Genetics*, 2012. 46 (1), s. 209-231. DOI: 10.1146/annurev-genet-110711-155427.

JEZIOROWSKI, A.; GORDON, D. M. Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2007. 189 (19), s. 7045- 7070. ISSN 1098-5530.

- JOHNSON J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 1991. 4 (1), s. 80-128.
- KAPER, J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004. 2 (2), s. 123–140. DOI: 10.1038/nrmicro818
- KAUR, S.; KAUR, S. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents [online]. *Frontiers in Pharmacology*, 2015 [cit. 2017-03-05]. 6 (272). DOI: 10.3389/fphar.2015.00272. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4639596/>
- KING, R. C.; STANSFIELD, W. D. ; MULLIGAN, P. K. *A dictionary of genetic*. 7th Ed. New York: Oxford University Press, 2006. 608 s. ISBN-13: 978-0195307610
- KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. 654 s. ISBN: 80-7262-341-9.
- KIM, Y. C.; TARR, A. W.; PENFOLD, C. N. Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins [online]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2014 [cit. 2017-03-12]. 1843 (8), s. 1717-1731. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.010. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488914001281>
- KOSKI, L. B; GOLDING, G. B. The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. *Journal of Molecular Evolution*, 2001. 52 (6), s. 540-542. DOI: 10.1007/s002390010184
- KUNIN, V.; ENGELBREKTSON, A.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 2010. 12 (1), s. 118–123. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x.
- LAGOS, R.; TELLO, M.; MERCADO, G.; GARCIA, V.; MONASTERIO, O. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009. 10 (1), s. 74-85.
- LE GALL, T.; CLERMONT, O.; GOURIOU, S. a kol. Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group *Escherichia coli* Strains. *Molecular Biology and Evolution*, 2007. 24 (11), s. 2373–2384. DOI: 10.1093/molbev/msm172
- LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends in Microbiology*, 2004. 12 (8), s. 378-385. DOI: 10.1016/j.tim.2004.06.004

LIU, Y.; SCHMIDT, B.; MASKELL, D. L. Parallelized short read assembly of large genomes using de Bruijn graphs. *BMC Bioinformatics*, 2011. 12 (354). DOI: 10.1186/1471-2105-12-354

LIU, Yongchao, Bertil SCHMIDT a Douglas L MASKELL. Parallelized short read assembly of large genomes using de Bruijn graphs. *BMC Bioinformatics* [online]. 2011, 12(1), 354- [cit. 2017-04-21]. DOI: 10.1186/1471-2105-12-354. ISSN 1471-2105. Dostupné z: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-12-354>

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors [online]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013 [cit. 2017-03-01]. 152 (1-2), s. 2–12. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242712003625>

MANKOVICH, J. A.; CHI-HSIN H.; KONISKY, J. DNA and amino acid sequence analysis of structural and immunity genes of colicins Ia and Ib. *Journal of Bacteriology*, 1986. 168 (1), s. 228–236. ISSN 1098-5530.

MARDIS, E. R. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2013. 6 (1), s. 287–303. DOI: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.

MARDIS, E.; TANG, H.; KIM, S. *Genome Sequencing Technology and Algorithms*. Boston: Artech House, 2008. 259 s.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. 74 (2), s. 560-564.

MICENKOVÁ, L.; ŠTAUDOVÁ, B.; BOSÁK, J.; MIKALOVÁ, L.; LITTNEROVÁ, S.; VRBA, M.; ŠEVČÍKOVÁ, A.; WOZNICOVÁ, V.; ŠMAJS, D. Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiology*, 2014. 14 (109). DOI: 10.1186/1471-2180-14-109.

MICHEL-BRIAND, Y.; BAYSSE, C. *The pyocins of Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 2002. 84 (5-6), s. 499-510. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01422-0.

MOUNT, D. W. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. 2nd Ed. New York: Harbor Laboratory Press, 2004. 564 s. ISBN: 08-796-9608-7.

MOUNT, David W. *Bioinformatics: sequence and genome analysis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 08-796-9608-7.

NAGARAJAN, N.; POP, M. Parametric complexity of sequence assembly: theory and applications to next generation sequencing. *Journal of Computational Biology*, 2009. 16 (7), s. 897–908. DOI: 10.1089/cmb.2009.0005.

NCBI [online] – [cit. 2017-03-29]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

O'BRIEN, G. J.; CHAMBERS, S. T.; PEDDIE B.; MAHANTY, K. H. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 1996. 20 (3), s. 185-190. ISSN 08824010

PAGANI, I.; LIOLIOS, K.; JANSSON, J.; CHEN, I. M. A.; SMIRNOVA, T.; NOSRAT, B.; MARKOWITZ, V. M.; KYRPIDES, N. C. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Research*, 2012. 40 (Database issue), D 571–579.

PATTON, B. S.; LONERGAN, S. M. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 2007. 70 (5), s. 1256-1262.

PEVSNER, J.; HOBOKEN, N.; WILEY, N. J. *Bioinformatics and functional genomics*. 2009. ISBN 04-712-1004-8.

PONS, A. M.; LANNELUC, I.; COTTENCEAU, G.; SABLE, S. New developments in non-posttranslationally modified microcins. *Biochimie*, 2002. 84(5-6), s. 531-537.

POSPÍŠILOVÁ, Š.; TICHÝ, B.; MAYER, J. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy? *Časopis lékařů českých*, 2009. 148 (7), s. 296-302.

REBUFFAT, S. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 2012. 40 (6), s. 1456-1462. DOI: 10.1042/BST20120183.

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, 1998. 32 (1), s. 255–278.

RILEY, M.; CHAVAN, M. *Bacteriocins: ecology and evolution*. New York: Springer, 2007. 150 s., ISBN 9783540366034.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56 (1), s. 117-137. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.

RILEY, M.; GILLOR, O. *Research and applications in bacteriocins*. Wymondham: Horizon Bioscience, 2007. ISBN: 978-1-904933-46-5.

ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie: První díl. Informační makromolekuly – Molekulární biologie prokaryot*. 3. vydání. Brno, 1998. 300 s. ISBN: 80-902562-0-1

RUSSO, T. A.; JOHNSON J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of infectious diseases*, 2000. 181 (5), s. 1753-1754. DOI: 10.1086/315418

SALZBERG, S. L.; PHILLIPPY, A. M.; ZIMIN, A.; PUJU, D.; MAGOC, T.; KOREN, S.; TREANGEN, T. J.; SCHATZ, M. C. a kol. A critical evaluation of genome assemblies and assembly algorithms. *Genome Research*, 2012. 22 (3), s. 557–567. DOI: 10.1101/gr.131383.111.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 1975. 94 (3), s. 441–448.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. 74 (12), s. 5463–5467.

SCHAMBERGER, G. P.; PHILLIPS, R. L.; JACOBS, J. L.; DIEZ-GONZALEZ, F. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 Populations in Cattle by Addition of Colicin E7-Producing *E. coli* to Feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. 70 (10), s. 6053-6060. DOI: 10.1128/AEM.70.10.6053-6060.2004.

SEDLÁČEK I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova Univerzita, 2007. 270 s.

SEVERINOV, K.; SEMENOVA, E.; KAZAKOV, T. Class I Microcins: Their Structures, Activities, and Mechanisms of Resistance. *Chapter Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. 2011, s. 289-308.

SHAND, R. F.; LEYVA, K. J. *Archaeal antimicrobials: an undiscovered country*. In: BLUM, P, editor. *Archaea: new models for prokaryotic biology*,. Caister Academic, 2008. s. 233–242.

SOELAIMAN, S.; JAKES, K.; WU, N.; LI, C. M.; SHOHAM, M. Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. *Molecular Cell*, 2001. 8 (5), s. 1053-1062.

SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 2001. 32 (3-4), s. 227-241. DOI: 10.1051/vetres:2001121.

SPANGLER, R.; ZHANG, S. P.; KRUEGER, J.; ZUBAY, G. Colicin synthetis and cell death. *Journal of Bacteriology*, 1985. 163 (1), s. 167-173.

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. 361 s. ISBN 80-856-0571-6

ŠMAJS, D.; WEINSTOCK, G. M. The iron- and temperature-reguated *cjrBC* genes of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains code for colicin Js uptake. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (13), s. 3958-3966. DOI: 10.1128/JB.183.13.3958-3966.2001

ŠMAJS, D.; KARPATY, S. E.; ŠMARDA, J.; WEINSTOCK G. M. Colicins produced by the *Escherichia fergusonii* strains closely resemble colicins encoded by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002. 208 (2), s. 259-262.

ŠMAJS, D.; MICENKOVÁ, L.; ŠMARDA, J.; VRBA, M.; ŠEVČÍKOVÁ, A.; VALÍŠOVÁ, Z.; WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*, 2010. 10 (288). DOI: 10.1186/1471-2180-10-288.

ŠMARDA, J. *The effect of colicins*. Brno: Universita J. E. Purkyně. 1978. str. 213.

ŠMARDA, J.; OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*, 2001. 41 (6), s. 367-374. DOI: 10.1002/1521-4028(200112)41:6<367::AID-JOBM367>3.0.CO;2-X

ŠMARDA, J.; ŠMAJS, D. Colicins—Exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 1998. 43 (6), s. 563-582. DOI: 10.1007/bf02816372.

TOUCHON, M.; HOEDE, C.; TENAILLON, O. a kol. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genetics*, 2009. 5(1). DOI: 10.1371/journal.pgen.1000344.

TRAUTNER, B. W.; HULL, R. A.; DAROUICHE, R. O. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005. 56 (2), s. 413-415. DOI: 10.1093/jac/dki228

VAN DIJK, E.L.; AUGER, H.; JASZCZYSZYN, Y.; THERMES, C. Ten years of next generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 2014. 30 (9), s. 418–426.

- VOLFF, J.; ALTENBUCHNER, J. High frequency transposition of the Tn5 derivative Tn5493 in *Streptomyces lividans*. *Gene*, 1997. 194 (1), s. 81-86. DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00163-7
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN: 80-902896-6-5
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. 351 s.
- VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2010. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 1953. 171 (4356), s. 737–738.
- WHEELER, D. A.; SRINIVASAN, M.; EGHOLM, M.; SHEN, Y.; CHEN, L.; MCGUIRE, A.; WEN, H.; YI- JU, C.; MAKHIJANI, V.; ROTH, G. T.; GOMES, X.; TARTARO, K. a kol. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*, 2008. 452 (7189), s. 872-876. DOI: 10.1038/nature06884.
- YANG, H.; WAN, L.; LI, X.; CAI, H.; CHEN, L.; LI, S.; LI, Y.; CHENG, J.; LU, X. High level expression of his-tagged colicin 5 in *E. coli* and characterization of its narrow-spectrum bactericidal activity and pore-forming action. *Protein Expression and Purification*, 2007. 54 (2), s. 309-317. DOI: 10.1016/j.pep.2007.03.006
- YANG, S. C.; LIN, C. H.; SUNG, T.; FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 2014. 5 (241). DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241.
- ZAHRADNICKÝ, J. a kol. *Mikrobiologie a epidemiologie*. Praha: Avicentrum, 1987. 623 s.
- ZBOŘIL, V.; MOSS, M. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005. 153 s. *Slovníky spisovatelů*. ISBN 80-247-0584-2.
- ZHAO, Z.; ORFE, L. H.; LIU, J.; LU, S. Y.; BESSER, T. E.; CALL, D. R. Microcin PDI regulation and proteolytic cleavage are unique among known microcins. *Scientific Reports*, 2017. 7 (42529). DOI: 10.1038/srep42529.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABC	ATP bindingcassette (transmembránový transportér)
ATP	Adenosintrifosfát
AU	Arbitrární jednotky
BHI bujón	Bujón z mozkosrdcové infuze
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
bp	párů bází
C-doména	Cytotoxická doména
Col	kolicin
ddNTP	Dideoxynukleosidtrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
ExbB	Proteinový komplex
ExbD	Proteinový komplex
F antigen	Fimbriální antigen
F- primer	Forward primer
G/C/A/T	Guanin/cytosin/adenin/thymin
H antigen	Bičíkový antigen
IgA	Imunoglobulin A
kb	Kilobáze

kDa	Kilodalton
Mb	Megabáze
Mcc	Mikrocin
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
NBD	Doména vázající se k nukleotidu
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N-doména	Translokační T- doména
NGS	Metody nové generace sekvenování
Pal	Lipoprotein vnější membrány
pCol	Kolicinogenní plazmid
PCR	Polymerázová řetězová reakce
R- primer	Reverse primer
RAST	Rapid Anotace using Subsystem Technology
R-doména	Receptorová doména
RNA	Ribonukleová kyselina
STEC	Shiga toxin produkující <i>Escherichia coli</i>
TAE	Tris- acetátový pufr
TMD	Transmembránová doména
Tol	Translokační systém
TolA	Membránový protein
TolB	Membránový protein
TolQ	Membránový protein
TolR	Membránový protein
Ton	Translokační systém
TonB	Protein plazmatické membrány

tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
UTI	Infekce močového ústrojí
UV	Ultrafialové záření
XLD	Xylóza, lyzin a deoxycholát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Schéma klasifikace kolicinů (Cascales a kol., 2007).....	19
Obr. 2. Struktury kolicinů (Jakes a Cramer, 2012).....	21
Obr. 3. Struktura kolicinového operonu(Cascales a kol., 2007).....	23
Obr. 4. Vpichový pokus - inhibiční účinek produkčních kmenů na indikátorový kmen B1 (autor).....	48
Obr. 5. Agarózový gel s PCR produkty Duplex PCR reakce (Col M + Col Y) (autor)	50
Obr. 6. Kapková metoda – stanovení titru bakteriocinu proti indikátorovým kmenům P400 a Row (autor).	54
Obr. 7. Výstup z BLASTu po porovnání s databázemi (autor)	56
Obr. 8. Výstup z RASTu: grafické znázornění porovnání genomů (autor).....	58

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Typy kolicinů, receptory, translokační systém, mechanismus účinku a rozdělení do skupin kolicinů rozdělená podle translokačního systému (upraveno a převzato z: Šmarda a Šmajs, 1998).	20
Tab. 2. Klasifikační schéma mikrocinů <i>E. coli</i> (převzato a upraveno z: Yang a kol., 2014).....	25
Tab. 3. Složení jednotlivých kultivačních médií.	40
Tab. 4. Složení jednotlivých roztoků.	41
Tab. 5. Složení směsí pro simple a duplex PCR.	44
Tab. 6. Rozdělení primerů do párů.	45
Tab. 7. Podmínky PCR reakce.	46
Tab. 8. Odečty inhibičních zón podle velikosti.	49
Tab. 9. Produkce kolicinů a mikrocinů u 15 testovaných kmenů <i>E. coli</i>	51
Tab. 10. Výsledky stanovení titru bakteriocinů.	55
Tab. 11. Výstup z BLASTu, statistika pro párové porovnání nejidentičtější sekvence se zájmovými sekvencemi (225, S35, 28).	57
Tab. 12. Výstup z RASTu: Základní charakteristika genomů	57

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Seznam primerů pro baktericinotypizaci

Příloha 1A: Kolicinové primery

Příloha 1B: Mikrocinové primery

PŘÍLOHA 1: SEZNAM PRIMERŮ PRO BAKTERIOCINOTYPIZACI

Příloha 1A: Kolicinové primery

Kolicin	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)
A	ColA-F	CGTGGGGAAAAGTCATCATC	475
	ColA-R	GCTTTGCTCTTTCCTGATGC	
B	ColB-F	AAGAAAATGACGAGAAGACG	492
	ColB-R	GAAAGACCAAAGGCTATAAGG	
D	ColD-F	CTGGACTGCTGCTGGTGATA	420
	ColD-R	GAAGGTGCGCTTACTACTGC	
K	ColK-F	CAGAGGTCGCTGAACATGAA	469
	ColK-R	TCCGCTAAATCCTGAGCAAT	
L	Col28b-F	TGCATATTGAAAGCGTCAGC	449
	Col28b-R	CAGGTTATCCCCTCTCACCA	
M	ColM-F	GCTACCACTTCGAAAACC	429
	ColM-R	GAGCGACTCTCCGATAATGC	
N	ColN-F	AGTTGGCGAGTATCTTGGA	401
	ColN-R	CAACACAGCCCCGAATAAAC	
U	ColU-F	TGATTGCTGCGAGAAAATG	485
	ColU-R	TCTGACAGCCTCTCCCTGTT	
E1	ColE1-F	TGTGGCATCGGGCGAGAATA	649
	ColE1-R	CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT	
E1 – 1*	Cea2-R	GGTGGAACTGGAGGTAGCAA	399
	Cea2-F	ACGTCGTTGTTGTTCTGCTT	
E2	ColE2-R	TGATGCTGCTGCAAAAGAG	409
	ColE2-R	TTCAAAGCGTTCCTACCAC	
E3	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	413
	ColE3-R	TCGGATTCGGACCTTTCAAC	
E4	ColE4-F	GAAGGCTGCATTTGATGCT	409
	ColE4-R	CGGATCCGGACCTTTAATT	
E5	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	430
	ColE5-R	TTGAATTCTCGAATCGTCCA	
E6	ColE6-F	ACCGAACGTCCAGGTGTT	399
	ColE6-R	TTTAGCCTGTCGCTCCTGAT	
E7	ColE7-F	GCATTCTGCCATCTGAAAT	431
	ColE7-R	CTTCTGCCCACTTTCTTTTCG	
E8	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	449
	ColE8-R	GACTGATTGGCTTGTCGTGA	
E9	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	418
	ColE9-R	GACTTTTCTCCCTCCGACCT	
Ia	ColIa-F	GCATGCAAATGACGCTCTTA	473
	ColIa-R	GAGGACGCCAGTTCTCTGTC	

Ib	ColIb-F	AACGAGTGGGTCGATGATTC	464
	ColIb-R	CCTTTTCTGCGCTCGTATTC	
Y	ColY-F	GCAGGCAGAAAAGAACAAGG	477
	ColY-R	CGGACGTTATTTGCCTTCAT	
Js	ColJs-F	TCAAAATGTTTGGGCTCCTC	254
	ColJs-R	TAATCTGCCCTGTCCCACTG	
10	Col10-F	GGTTACCGGATTTCTGGAT	448
	Col10-R	TTCTGAATGCTTGGCCCACT	
S4	ColS4-F	TATATGGCCCAACTGCTGGT	456
	ColS4-R	CGTAAGGACGGACACCTGTT	
5	Col5-F	CATTGGCAAAGCGAAATTC	443
	Col5-R	TGCAACTCTGGAAACAATCG	

* Pro detekci sekvenčně různorodých genů kódující kolicin E1 byl použit další pár primerů s označením cea2-F/cea2-R

Příloha 1B: Mikrocínové primery

Mikrocín	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)
J25	Mcc J25-F	TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAAT	175
	Mcc J25-R	TGATTAAGCATTTTCATTTTAATAAAGTGT	
B17	Mcc B17-F	TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGGCATT	135
	Mcc B17-R	TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCACTAC	
H47	Mcc H47-F	CACTTTCATCCCTTCGGATTG	227
	Mcc H47-R	AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC	
V	Mcc V-F	CACACACAAAACGGGAGCTGTT	680
	Mcc V-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	
C7	Mcc C7-F	CGTTCAACTGTTGCAATGCT	134
	Mcc C7-R	AGTTGAGGGGCGTGTAATTG	
L	Mcc L-F	GGTAAATGATATATGAGAGAAATAACGTTA	233
	Mcc L-R	TTTCGCTGAGTTGGAATTTCTGCTGCATC	
M	Mcc M-F	CGTTTATTATTTTATGAATA	456
	Mcc M-R	AAACGGAAGAATGGATGATCTCGCAA	
E492	Mcc E492-F	GTCTCTCCTGCACCAAAGC	291
	Mcc E492-R	TTTTCAGTCATGGCGTTCTG	