

Inhibiční látky produkované bakteriemi rodu **Pseudomonas**

Bc. Jitka Vrbasová

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. Jitka Vrbasová**
Osobní číslo: **T14780**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Inhibiční látky produkované bakteriemi rodu *Pseudomonas***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zástupci rodu *Pseudomonas*
2. Inhibiční látky produkované bakteriemi rodu *Pseudomonas*
3. Analýza bakteriálního genomu

II. Praktická část

1. Určení inhibičního spektra bakterie *Pseudomonas fulva* **373**
2. Sekvenace a analýza genomu *Pseudomonas fulva* **373**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] MICHEL-BRIAND, Y., BAYSSE, C. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84 (5-6),499-510.

[2] RILEY, M.A., WERTZ, J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.*, 56, 117-37.

[3] CASCALES, E., BUCHANAN, S.K., DUCHÉ, D., KLEANTHOUS, C., LLOUBÈS, R., POSTLE, K., RILEY, M., SLATIN, S., CAVARD, D. 2007. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 71(1), 158-229. DOI:10.1128/MMBR.00036-06.

[4] FRANCE, M.T., REMOLD, S.K. 2016. Interference Competition Among Household Strains of *Pseudomonas*. *Microb Ecol.*, 72(4), 821-830. DOI: 10.1007/s00248-015-0652-1.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

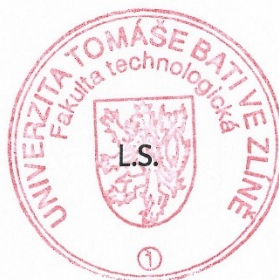
Termín odevzdání diplomové práce:

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: Vrbasová Jitka

Obor: CHTP - TP

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 3.5.2017

Vrbasová!

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 nevydělečně 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 vzdělávacího 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 užit 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 z výdělku 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 výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V této práci jsou studovány látky s inhibičním účinkem, které produkují bakterie rodu *Pseudomonas*. Pozornost je věnována zejména bakteriocinům, které se u bakterií rodu *Pseudomonas* nazývají pyociny. Pyociny spadají do skupiny bílkovinných látek, jež mají antimikrobiální účinky. Současný pokrok v sekvenačních technikách přispívá k rozvoji a rychlému rozšiřování genomových databází. Tyto sekvence lze porovnávat s nově sekvenovanými částmi DNA a je možné zjistit, zda příslušný kmen disponuje geny pro produkci pyocinů. Přestože studovaný kmen *Pseudomonas fulva* 373 produkuje látky s inhibičním účinkem, po srovnání s databází anotovaných genomů bylo zjištěno, že se u této bakterie nevyskytuje žádný dosud popsáný pyocin. Mohlo by to znamenat produkci nového, zatím nepopsaného bakteriocinu.

Klíčová slova: *Pseudomonas*, pyocin, genom, inhibice, DNA sekvenování

ABSTRACT

In this work, substances with an inhibitory activity produced by *Pseudomonas* genus were studied. The focus was on bacteriocins of *Pseudomonas* which are called pyocins. Pyocins belong into a group of protein based compounds that have an antimicrobial activity. Genome sequencing techniques developed a new approaches and utilization of identifying a large number of pyocins. Extensively growing databases provide a lot of genomic records. These sequences can be compared to newly sequenced DNA parts, and it is possible to determine whether the studied strain has genes for pyocin production. Although the studied strain of *Pseudomonas fulva* 373 produces compounds with an inhibition activity. In comparison with annotated genomes in database, it was found out that no pyocin has been found in this strain. It could mean the production of a new, still undiscovered bacteriocin.

Key words: *Pseudomonas*, pyocin, genome, inhibition activity, DNA sequencing

Ráda bych poděkovala hlavně Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a trpělivost při zpracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu při mém studiu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 ROD <i>PSEUDOMONAS</i>.....	11
1.1 CHARAKTERISTIKA RODU <i>PSEUDOMONAS</i>	11
1.1.1 Taxonomické vymezení rodu.....	11
1.1.2 Systematické zařazení.....	12
1.1.3 Mikroskopická a makroskopická morfologie.....	15
1.2 VYBRANÍ ZÁSTUPCI RODU <i>PSEUDOMONAS</i>	18
1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
1.2.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
1.2.3 <i>Pseudomonas fulva</i>	20
1.3 INHIBIČNÍ LÁTKY.....	21
2 PYOCINY.....	22
2.1 KORPUSKULÁRNÍ PYOCINY.....	23
2.1.1 R-typ pyociny.....	23
2.1.2 F-typ pyociny.....	25
2.2 NÍZKOMOLEKULÁRNÍ PYOCINY.....	26
2.2.1 S-typ pyociny.....	26
2.2.2 M-typ pyociny.....	27
2.2.3 Pyociny s lektinovou doménou.....	28
2.2.4 Mikrociny.....	29
3 ANALÝZA BAKTERIÁLNÍHO GENOMU.....	31
3.1 KLASICKÉ METODY SEKVENOVÁNÍ.....	31
3.1.1 Maxam-Gilbertova metoda.....	32
3.1.2 Sangerova metoda.....	34
3.2 SEKVENAČNÍ METODY NOVÉ GENERACE (NGS).....	38
3.2.1 Pyrosekvenace (metoda 454/Rosche).....	38
3.2.2 Illumina (Solexa).....	42
3.2.3 Life Technologies SOLiD™.....	45
3.3 METODY TŘETÍ GENERACE SEKVENOVÁNÍ (TGS).....	46
3.4 KOMPLETACE GENOMŮ.....	48
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	50
4 CÍL PRÁCE.....	51
5 MATERIÁL A METODY.....	52
5.1 MATERIÁL.....	52
5.1.1 Mikroorganismy.....	52
5.1.2 Použité přístroje a pomůcky.....	54
5.1.3 Kultivační média.....	55
5.1.4 Vpichový test – kvalitativní stanovení bakteriocinů.....	56
5.2 METODY.....	57
5.2.1 Sekvenace a analýza sekvencí.....	57
6 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	59

6.1	ANALÝZA GENOMU – IDENTIFIKACE.....	59
6.2	INHIBIČNÍ SPEKTRUM.....	62
6.3	ANALÝZA GENOMU – VYHLEDÁVÁNÍ CHARAKTERISTICKÝCH SEKVENCÍ.....	63
ZÁVĚR	72
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	86
SEZNAM OBRÁZKŮ	89
SEZNAM TABULEK	91

ÚVOD

Tato diplomová práce je věnována zjištění inhibičního spektra látek, které produkuje bakterie *Pseudomonas fulva* 373. Pseudomonády jsou schopny látkami, které produkují inhibovat nebo zcela potlačit růst jiných mikroorganismů. V současné době, kdy se stále více rozmáhá rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům, není lehké najít alternativy antibiotické léčby. Námi zkoumané látky – pyociny by mohly v budoucnu znamenat pokrok, ať už v léčbě onemocnění nebo v potravinářství, při prodloužení udržitelnosti potravin.

Pyociny jsou látky bílkovinné povahy, jsou geneticky kódovány, pro charakterizaci produkovaných látek je tedy zásadní genetická analýza, která se provádí pomocí sekvenačních metod. Sekvenační metody slouží ke stanovení pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA – neboli ke zjištění primární struktury DNA. V dnešní době patří sekvenování ke standartním molekulárně-biologickým metodám používaným v běžné laboratorní praxi. Znalost sekvence DNA je důležitá pro charakterizaci základních biologických funkcí organismu. Vzhledem k velké variabilitě mikroorganismů je také zásadní pro správné zařazení mikroorganismu.

Od roku 2005, kdy byla představena první technika sekvenování nové generace došlo k vývoji sekvenačních technik. V dnešní době už jsou do praxe zavedeny metody třetí generace. S rozvojem sekvenování také souvisí nezbytné rozšíření bioinformačních nástrojů, bez kterých by nebylo možné velká množství získaných dat zpracovat. Surová data je třeba pročistit, složit z nich kvalitní sekvenci, kterou je možné analyzovat a nakonec anotovat.

K identifikaci mikroorganismu a analýze genomu byly využity bioinformatické nástroje BLAST, RAST a SEED-Viewer. S využitím těchto nástrojů byla provedena online analýza sekvenovaných dat. Nástrojem BLAST byla provedena základní identifikace mikroorganismu. V genomových databázích byly vyhledány mikroorganismy vykazující nejbližší genetickou příbuznost. Podrobná analýza byla provedena za využití nástroje RAST v prostředí SEED-Viewer. Genom byl podrobně analyzován a byly nalezeny charakteristické sekvence kódující produkci proteinu kolicinu V a současně byl nalezen genomový klastr obsahující několik genů, které jsou zařazeny do subsystému „Colicin V and Bacteriocin Production Cluster“.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ROD *PSEUDOMONAS*

1.1 Charakteristika rodu *Pseudomonas*

Tento rod zahrnuje relativně velkou a rozmanitou skupinu gramnegativních bakterií. Zástupci tohoto rodu se hojně vyskytují jako volně žijící organismy v půdě, v čisté vodě, v mořských prostředích a mnoha dalších přírodních lokalitách. Dále jsou nalézáni jako normální flóra nebo jako původci chorob jak u rostlin, tak i u živočichů. Do čeledi se řadí také rod *Xanthomonas*, jehož zástupci jsou často rostlinnými patogeny a *Zooglea*, kam patří bakterie, u nichž byla popsána tvorba slizovitých povlaků. Rod *Pseudomonas* se podílí na udržování rovnováhy v přírodě. Celkově je aktivní v aerobních dekompozicích a biodegradacích. Pseudomonády jsou také běžnou složkou kontaminovaných potravin na tržištích a v domácnostech (Palleroni 2005).

1.1.1 Taxonomické vymezení rodu

Rod *Pseudomonas* je typovým rodem čeledi *Pseudomonadeceae*, která je zařazena do řádu *Pseudomonadales*, třídy Gammaproteobacteria, kmene Proteobacteria a domény Bacteria. (Sedláček, 2007).

První ucelený popis rodu vytvořil německý bakteriolog Walter Migula v roce 1894 (Palleroni, 1984). Za posledních 100 let prošlo vymezení rodu *Pseudomonas* mnoha změnami (Özen a Ussery, 2012). Mnoho bakterií, které byly dříve řazeny do této skupiny, bylo přeřazeno do jiných rodů (*Comamonas*, *Burkholderia* aj.), zatímco rody dříve popisované jako *Chryseomonas* a *Flavimonas* byly přemístěny do rodu *Pseudomonas* (Sedláček, 2007). I přes to, že druhů z původního souboru příliš nezůstalo, tento rod patří s více než dvěma sty taxony k druhově nejbohatším (Euzéby a Parte, 2016).

Pseudomonády zahrnují druhy patogenní pro člověka, zvířata i rostliny. Druhy rodu *Pseudomonas*, stejně tak jako druhy zahrnuté v nově vytvořených rodech *Burkholderia* a *Ralstonia* (dříve rod *Pseudomonas*), patří mezi nejdůležitější patogeny rostlin. Vyvolávají významné choroby pěstovaných plodin po celém světě, což se významně odráží v ekonomice. *Pseudomonas aeruginosa* je patogenní jak pro rostliny, tak pro živočichy a vyvinula se v jeden z nejběžnějších a nejlépe odolných nosokomiálních patogenů.

Rod *Xanthomonas* je blízké příbuzný rodu *Pseudomonas*, zahrnuje jak fytopatogenní tak saprofytické druhy bakterií. Další pseudomonádou je rod *Zooglea*, který má extrémně

aktivní oxidativní metabolismus v jeho přirozeném prostředí a je důležitým účastníkem cyklu uhlíku jako součást mikroflóry aktivovaného kalu. Rozlišení těchto tří rodů je možné pomocí určitých strukturálních, fyziologických nebo ekologických charakteristik (Tab. 1) (Sedláček, 2007).

Tab. 1. Rozlišující vlastnosti rodů dříve považovaných za pseudomonády (Sedláček, 2007).

Rod	Vlastnosti
<i>Pseudomonas</i>	Obvykle pohyblivé a oxidáza pozitivní. Schopné růst v obyčejných minerálních médiích s širokým výběrem organických složek o nízké molekulové hmotnosti. Nevyžadují organické růstové faktory.
<i>Xanthomonas</i>	Druhy patogenní pro rostliny produkují ve vodě nerozpustné žluté pigmenty (xantomonadiny). Růst na živném agaru je inhibován 0,1 % chloridem trifenylnitroimidazolu. Slabá nebo negativní oxigenázová reakce. Vyžadují organické růstové faktory.
<i>Zooglea</i>	Buňky jsou aktivně pohyblivé, když jsou mladé. Produkce stromečkovité masy, při růstu se připojují k pevnému detritu v přírodních a splaškových vodách.

Rod *Pseudomonas* v roce 2012 čítal 235 druhů a 18 poddruhů, které do něj byly zařazeny zejména na základě biochemických testů, analýzy sekvencí 16S rDNA a analýzy mastných kyselin (Özen a kol., 2012). Tento rod se neustále rozrůstá o nové druhy. V nedávné době byly popsány dva nové druhy, jež byly nalezeny na Antarktidě. Jedná se o *P. prosekii* popsanou v roce 2013 (Kosina a kol., 2013) a také nedávno popsanou *P. gregormendelii* (Kosina, a kol., 2015). Do roku 2010 byly popsány genomové sekvenace nejdůležitějších zástupců rodu z hlediska humánní a klinické mikrobiologie a fytopatologie – *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* a *P. syringae* (Klockgether a kol., 2008).

1.1.2 Systematické zařazení

Většinu druhů rodu *Pseudomonas* bylo možné dříve zařadit do jedné z pěti skupin vytvořených podle podobnosti sekvencí nukleotidů DNA kódujících geny pro ribozomální RNA. Toto členění do tzv. skupin podle podobnosti r-RNA zavedl Palleroni a kol. (Palleroni a kol., 1964), který však zároveň konstatoval, že některé z těchto skupin jsou bližší spíše zástupcům jiných rodů, jako jsou *Xanthomonas* či *Escherichia*. V nadcházejících letech

proto došlo k četným úpravám, které pozměnily taxonomické zařazení mnoha členů zejména z II., III., IV. a V. skupiny, kteří byli zařazení do nových nebo dříve existujících druhů. V roce 1984 bylo rozdělení pseudomonád následující:

Skupina I byla ze všech skupin největší. Obsahovala druhy, které produkují fluorescenční pigmenty jako *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* a rostlinné patogeny, *P. syringae* a *P. cichorii*. Mezi druhy, které fluorescenční barviva neprodukují a řadily se do této skupiny, patří například *P. stutzeri* a *P. mendocina*. Do této skupiny byl také zařazen typový druh *P. aeruginosa*. Tento druh je jeden z nejlépe definovaných a nejsnadněji identifikovatelných členů rodu *Pseudomonas*. Zároveň je také nejlépe prostudován z genetického hlediska a genom této pseudomonády byl zcela sekvenován.

Dále do této skupiny spadaly pseudomonády patogenní pro rostliny *P. cichorii* a *P. syringae*. Tyto bakterie jsou v laboratorních podmínkách rozlišovány neschopností využít arginin pomocí arginin dihydrolázového systému. Reprezentovaly skupinu fylogeneticky oddělenou od ostatních fluorescentních bakterií skupiny I. Tyto dva rody odlišuje oxidázová reakce *P. cichorii* (oxidáza pozitivní) a *P. syringae* (oxidáza negativní). Jak *P. aeruginosa* tak i *P. syringae* jsou reprezentované mnoha odlišnými kmeny tzv. patovary. Tyto kmeny byly původně popsány jako odlišné druhy.

Skupina II byla dříve složená zejména z patogenů. Jeden z nejdůležitějších druhů této skupiny byl *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia*, který je jak rostlinným, tak živočišným patogenem a který obsahuje nejproměnlivější kmeny v rodu, s ohledem na strukturu výživy. Další dva druhy, *Pseudomonas (Burkholderia) pseudomallei* a *Pseudomonas (Burkholderia) mallei*, způsobují choroby živočichů a také patří k velmi proměnlivým organismům.

Skupina III se dříve dělila do tří podskupin, jejichž zástupci se podstatně lišili svými fenotypovými vlastnostmi. Proto byly některé druhy přerazeny do rodu *Comamonas* (*C. testosteroni*, *C. acidovorans*).

Skupina IV obsahovala dva zástupce *P. diminuta* a *P. versicularis*, kteří museli podstoupit změnu týkající se jejich systematického zařazení, protože se více podobají zástupcům rodu *Caulobacter*. Na základě uspořádání jejich sekvencí pro 16S rRNA byl pro ně vytvořen nový rod *Brevundimonas* (Segers a kol., 1994).

Skupina V jejím hlavním zástupcem byla *P. maltophilia* a jiní zástupci podobajících se rodu *Xanthomonas*. Většina z nich dnes náleží do jiných rodů. Příkladem je *Stenotrophomonas maltophilia*. (Palleroni a kol., 1984)

Přehled zařazení některých zástupců do jednotlivých skupin na základě podobnosti r-RNA znázorňuje tabulka (Tab. 2) (Palleroni a kol., 1984).

Tab. 2. Přehled zařazení hlavních zástupců do skupin podle podobnosti r-RNA (Palleroni a kol., 1984).

Skupina podobnosti r-RNA	Hlavní zástupci
I	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> (několik biovarů), <i>P. putida</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. syringae</i> (mnoho patovarů), <i>P. cichorii</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. agarici</i> , <i>P. angulata</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. synxantha</i> , <i>P. taetrolens</i> , <i>P. mucidolens</i> , <i>P. oleovorans</i> , <i>P. resinovorans</i> , <i>P. psychrophila</i>
II	<i>P. cepacia</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. caryophylli</i> , <i>P. pseudomallei</i> , <i>P. mallei</i> , <i>P. solanacearum</i> , <i>P. pickettii</i> , <i>P. pyrrocinia</i> , <i>P. andropogonis</i>
III	<i>P. (Comamonas) acidovorans</i> , <i>P. (Comamonas) testosteroni</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>P. facilis</i> , <i>P. delafieldii</i> , <i>P. alboprecipitans</i> , <i>P. palleronii</i>
IV	<i>P. diminuta</i> , <i>P. vesicularis</i>
V	<i>Xanthomonas</i> spp. včetně <i>X. (Pseudomonas) maltophilia</i> , <i>P. geniculata</i> , <i>P. gardneri</i>

V dnešní době je rod *Pseudomonas* rozdělen do sedmi skupin. Název každé skupiny tvoří jméno nejvýznamnějšího zástupce (Tab. 3) (NCBI, online). V tabulce je zvýrazněna *Pseudomonas fulva*, která patří podle současného členění rodu do skupiny *Pseudomonas putida*.

Tab. 3. Rozdělení zástupců rodu *Pseudomonas* do skupin (NCBI, online).

Skupina	Zástupci
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. anguilliseptica</i> , <i>P. citronellolis</i> , <i>P. flavescens</i> , <i>P. jinjuensis</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. straminea</i> , <i>P. nitroreducens</i> , <i>P. oleovorans</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. resinovorans</i> ,
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>P. chlororaphis</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. lundensis</i> , <i>P. taetrolens</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. azotoformans</i> , <i>P. brenneri</i> , <i>P. cedrina</i> , <i>P. congelans</i> , <i>P. corrugata</i> , <i>P. costantini</i> , <i>P. extremorientalis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. fulgida</i> , <i>P. gessardii</i> , <i>P. libanensis</i> , <i>P. mandelii</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>P. mediterranea</i> , <i>P. migulae</i> , <i>P. mucidolens</i> , <i>P. orientalis</i> , <i>P. poae</i> , <i>P. rhodesiae</i> , <i>P. synxantha</i> , <i>P. tolaasii</i> , <i>P. trivialis</i> , <i>P. veronii</i>
<i>Pseudomonas pertucinogena</i>	<i>P. aestusnigri</i> , <i>P. denitrificans</i> , <i>P. pertucinogena</i> , <i>Pseudomonas pohangensis</i> , <i>P. populi</i> , <i>P. prosekii</i> , <i>P. psychrophila</i> , <i>P. pudica</i> , <i>P. punonensis</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>P. fulva</i> , <i>P. monteilii</i> , <i>P. mosselii</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>P. plecoglossicida</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. syncyanea</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>P. balearica</i> , <i>P. luteola</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. xanthomarina</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>P. asturiensis</i> , <i>P. avellanae</i> , <i>P. cannabina</i> , <i>P. caricapapayae</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. coronafaciens</i> , <i>P. fuscovaginae</i> , <i>P. tremae</i> , <i>P. viridiflava</i> , <i>P. taeanaensis</i>

1.1.3 Mikroskopická a makroskopická morfologie

Rod *Pseudomonas* jsou gramnegativní rovné nebo lehce zakřivené nesporulující tyčky, které jsou často uspořádány ve dvojicích. Tyto mikroorganismy nehromadí granula poly- β -hydroxybutyrátu (Garrity a kol., 2005). Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 1,5-5,0 μm na 0,5–1,0 μm (Murray a kol., 2009). Obsah GC v DNA se pohybuje v širokém rozpětí 58 - 69 mol%, což je jeden z ukazatelů značné heterogenity rodu (Palleroni, 2005).

Pseudomonády patří k nejrychleji se pohybujícím bakteriím (Todar, 2008). K pohybu bakteriím slouží speciální organely na povrchu buňky – bičík, resp. bičíky a pili typu IV. Umístění bičíku je vždy terminální, jejich počet se však liší u jednotlivých druhů. *Pseudomonas aeruginosa* má jeden bičík, ovšem *P. fluorescens*, *P. putida* nebo *P. stutzeri* mají bičíků více (Holt a kol., 1994). Množství a umístění bičíků je považováno za důležitý taxonomický znak (Palleroni, 2005). Bičík umožňuje bakteriím pohyb ve vodě a v prostředí s nízkou viskozitou. U *Pseudomonas* byl také popsán koordinovaný pohyb celé populace buněk, který je vykonáván pomocí bičíků (Overhage a kol., 2006). Pily IV typu jsou struktury dlouhé asi 100 nm a slouží zejména k adhezi. Umožňují pseudomonádám lepší přilnutí k epitelům hostitele a také jsou příčinou zvláštního trhavého pohybu na pevném povrchu. Pily mohou také sloužit jako receptory pro řadu fágů (Palleroni, 2005, Votava, 2005).

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou velmi nenáročné. Vyskytují se ve vodě, v půdě, na povrchu rostlin, živočichů i člověka, a také ve střevech obratlovců. Nalezneme je na zkaženém jídle, ale také mohou kolonizovat zředěné roztoky dezinfekčních prostředků a přežít mohou i v destilované vodě (Madigan, 2009). Jsou schopny přežít i v nemocničním prostředí, kde ulpívají na běžných předmětech, ale mohou se vyskytovat i na specializovaném nemocničním vybavení jako jsou dializační přístroje, katétry nebo také respirátory (Iglevski, 1996).

Jsou tolerantnější k vyšším koncentracím solí a přirozeně rezistentní vůči některým antibiotikům a antiseptikům (Todar, 2008). Pseudomonády jsou aerobní mikroorganismy s respiratorním typem metabolismu, v němž se jako terminální akceptor elektronů uplatňuje molekulový kyslík. V některých případech může být, jako alternativní akceptor, za anaerobních podmínek využíván nitrát, nitrit nebo arginin, který bakteriím umožňuje růst v anaerobních nebo mikroaerofilních podmínkách (Murray a kol., 2009). Většina zástupců roste v teplotním rozmezí 4-43 °C, s optimem růstu kolem 28 °C. Ke svému růstu nepotřebují růstové faktory a většina druhů neroste při nízkých hodnotách pH (< 4,5) (Stanier a kol., 1966). Jsou kataláza pozitivní a produkce oxidáz může být pozitivní i negativní.

Pseudomonády lze kultivovat na jednoduchých mediích (Todar, 2008). Většinou rostou za aerobních podmínek i na kultivačních bakteriologických půdách jako je krevní agar, Endův agar, MacConkey agar, kde vytváří kovově lesklé kolonie. Na krevním agaru tvoří zónu pravé β -hemolýzy, což je důsledek produkce dvou hemolyzinů: termolabilní

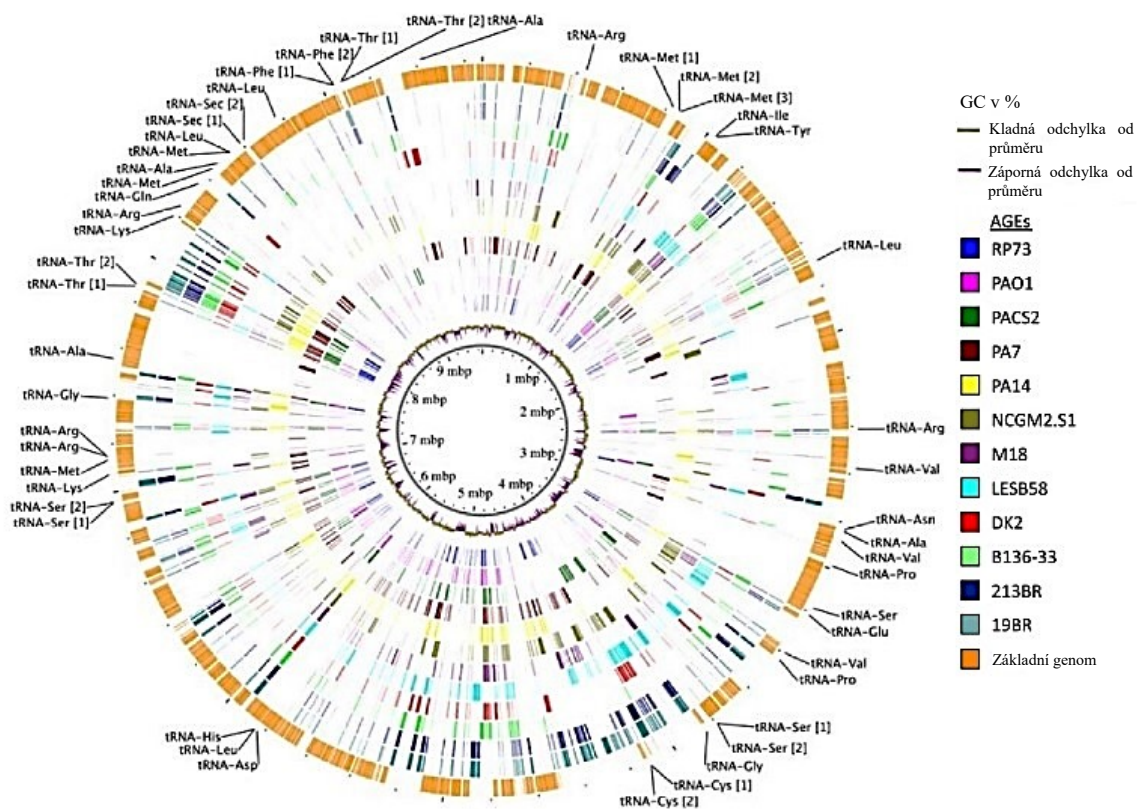
fosfolipázy C a termostabilního glykolipidu. Pseudomonády vytvářejí na pevném agaru několik morfotypů:

1. velké hladké kolonie s rovnými okraji a vyvýšeným středem;
2. malé drsné kolonie s konvexním profilem;
3. mukoidní kolonie (Palleroni, 2005).

Mladé kolonie *P. aeruginosa* voní po jasmínu, lipovém květu či fialkách – což je dáno přítomností redukovaného trimetylaminu (Mára, 1972). Při stárnutí se vůně mění a blíží se spíše amoniakálnímu zápachu (Ondrovčík, 2008).

Pigmentace byla uváděna jako jeden z obecných znaků tohoto rodu, nicméně v současné době rod *Pseudomonas* zahrnuje i tzv. nepigmentující druhy. Do nepigmentujících druhů je zařazena například *Pseudomonas stutzeri*, která má sice červenohnědé kolonie, ale ty jsou zbarveny díky vysoké koncentraci cytochromu c v buňkách nikoli kvůli obsahu pigmentu (Palleroni a kol., 1984). Většina pseudomonád ovšem produkuje typické solubilní pigmenty (Fuchs a kol., 2001) Mezi tyto pigmenty patří pyoverdin a skupina fenazinů – pyocyanin, pyorubin, chlororaphin a oxiphenazin (Garrity a kol., 2005). Pyoverdin je ve vodě rozpustný pigment (Elliott, 1958), který je produkován všemi fluorescentními pseudomonádami (Garrity a kol., 2005). Způsobuje žlutozelené zbarvení a má funkci sideroforu, tj. vylučuje ionty železa. Nejcharakterističtější pigmentem je pyocyanin, který způsobuje zelenomodré zbarvení kolonií *P. aeruginosa*. Dřívější taxonomické rozdělení dokonce zahrnovalo schopnost produkovat pigmenty jako jednu ze základních charakteristik členění tohoto rodu (Garrity a kol., 2005).

Genom bakterií tohoto rodu obsahuje části, jež můžeme identifikovat u více kmenů. Tvoří 86-93 % z celkového genomu a nazýváme ho základní genom. V tomto základním genomu je obsah CG (67 %) tedy vyšší oproti oblastem, jež jsou nazývány přídatným genomem. Přídatným genomem nazýváme ty části genomu, které jsou charakteristické výskytem mobilních genetických elementů, ke kterým patří integrativní a konjugativní elementy, profágy, transpozony, inzerční sekvenace a integrony a zároveň se jedná o soubor genů, které se nenachází u jednoho nebo více kmenů. Přídatný genom tvoří 6-18 % z celkového genomu, obsah CG je průměrně 61 mol% (Obr. 1) (Ozer, Allen a Hauser, 2014).



Obr. 1. Pangenom a základní genom dvanácti kmenů *P. aeruginosa*.

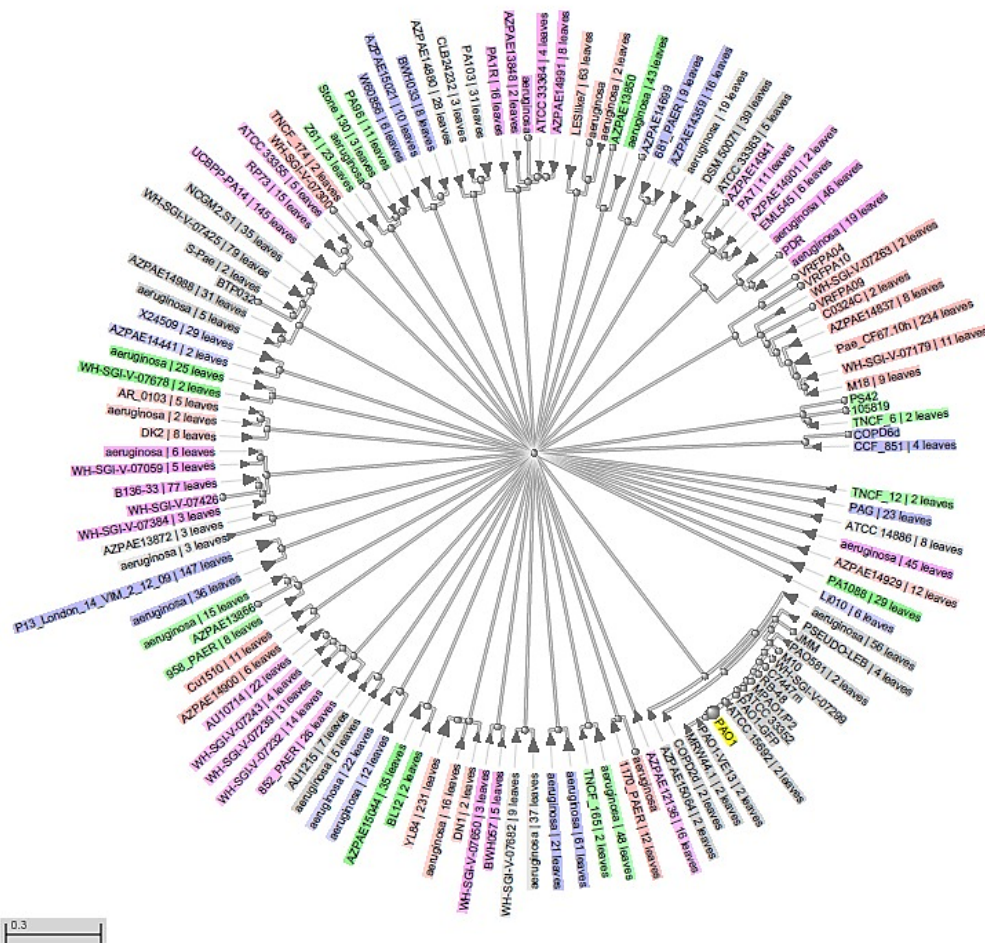
*Oranžově je vyznačen základní genom, barevně jsou zobrazeny přidatné genomové prvky kmenů. (převzato a upraveno z Ozer a kol., 2014)

1.2 Vybraní zástupci rodu *Pseudomonas*

1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Této bakterii je věnována větší pozornost, protože *Pseudomonas aeruginosa* náleží k oportunním patogenům, které způsobují lidská onemocnění. Zájem o tuto bakterii je doložen realizací úplného sekvenování genomu v roce 2000, konkrétně byl rozluštěn genom kmene PAO1. (Stover, 2000). Většina kmenů syntetizuje bakteriociny, produkuje 2 exotoxiny (exotoxin A a exoenzym S) a množství cytotoxických látek, mezi které patří proteázy štěpící stěny drobných cév, fosfolipázy, rhamnolipidy, siderofory a alginát. Exotoxin A patří mezi nejvíce toxické extracelulární enzymy produkované *P. aeruginosa* (Palleroni, 2005). Tento toxin narušuje proteosyntézu u eukaryotických buněk blokováním prodlužujícího se peptidového řetězce během elongace (Mohammed, 2014). Je často spojován se vznikem dermatonekróz při popálení nebo s poškozením tkáně při chronických plicních infekcích (Murray a kol., 2013). Proteázy jsou enzymy, které štěpí peptidové vazby

a tím degradují proteiny a peptidy. Poškozují tkáň hostitele a interagují s hostitelským obranným systémem například inhibicí funkce neutrofilů a leukocytů. Patří mezi ně elastáza A, elastáza B, proteáza IV a alkalická proteáza (Hoge a kol., 2010). Alginát je exopolysacharid uplatňující se při tvorbě biofilmu a je zodpovědný za mukoidní vzhled kolonií. Chrání bakterii před imunitním systémem hostitele a umožňuje adhezi bakteriální buňky k hostitelské tkáni (Stapper a kol., 2004). Lipopolysacharid je virulenční faktor, který se nachází na vnější membráně buněčné stěny gramnegativních bakterií (Iglewski, 1996). Rhamnolipidy jsou glykolipidy uplatňující se při plicních infekcích. Jejich činností je stimulována sekrece mucinu, změna transportu iontů a inhibice fagocytujících makrofágů (Walker, 1998). Dnes je v NCBI uloženo 80 kompletních sekvencí a 2 211 částečných sekvencí *P. aeruginosa*, s rozpětím genomu 6,2-7,2 Mb (NCBI, online).



Obr. 2. Dendrogram kmenů *P. aeruginosa* (převzato z: NCBI, online).

1.2.2 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens je ubikvitní druh, který se často vyskytuje ve vodě, v půdě a na rostlinách. Přítomnost těchto mikroorganismů je spojována s onemocněním rostlin i s kažením potravin (Garrity a kol., 2005). Bakterie zařazené do tohoto druhu vykazují vysokou úroveň heterogenity, a proto byly rozděleny do několika biovarů (Bossis a kol., 2000). Druhy kolonizující kořeny rostlin mohou produkovat antimykotické a antibakteriální látky. Tyto látky obsahují chitinázy, kyanid a pyrrolnitrin (Garrity a kol., 2005). U *P. fluorescens* kultivovaných v laboratorních podmínkách byla prokázána produkce mupirocinu, což je látka považovaná za antibiotikum a využívá se k léčení infekcí kůže, uší a očí. *P. fluorescens* vykazuje hemolytickou aktivitu a byly zjištěny jako kontaminující bakterie v krevních transfuzích (Gibb a kol., 1995). Bylo prokázáno, že *P. fluorescens* ojediněle mohou způsobovat onemocnění u lidí a mohou být původcem i nozokomiálních nákaz. Byly zaznamenány případy nálezu těchto bakterií v krevním řečišti pacientů, kde způsobily bakteriémii (Gershman a kol., 2008). V NCBI je uloženo 16 kompletních sekvencí a 95 částečně sekvenovaných *P. fluorescens*, s rozpětím genomu 4,8–7,2 Mb (NCBI, online).

1.2.3 *Pseudomonas fulva*

P. fulva je gramnegativní tyčinka, která je dlouhá 1,0 - 1,4 μm a široká 0,6 – 0,8 μm , se zaoblenými konci. Je pohyblivá s polárními bičíky. Je schopná růstu při teplotách 4 - 37 °C. Typické kolonie *P. fulva* jsou hladké a vlhké, kataláza pozitivní se slabou oxidázovou aktivitou. Má striktně aerobní metabolismus. Dříve byla sdružena s jinými rostlinnými pseudomonádami. Její zařazení bylo změněno na základě sekvenace genu 16S rRNA a nyní je *P. fulva* fylogeneticky zařazena do skupiny *P. putida*, v níž jsou zařazeny *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas plecoglossicida* a *P. putida*. Na rozdíl od blízkých příbuzných druhů *P. fulva* vytváří ve vodě nerozpustný žlutý pigment (Rebolledo a kol., 2014). Tato bakterie se hojně vyskytuje jako součást mikroflóry životního prostředí, ale byly popsány případy, kdy způsobila závažné infekce. V nemocničním prostředí je schopna získat geny rezistence. Často bývá zaměňována za *P. putida* (Almuzara a kol., 2010). V NCBI je aktuálně uložen jeden kompletně sekvenovaný genom *Pseudomonas fulva* a 3 částečné sekvenace (NCBI, online).

1.3 Inhibiční látky

Mikroorganismy, které jsou vybaveny tzv. faktory virulence, mají větší pravděpodobnost přežít v nepříznivých podmínkách makroorganismu. Virulentní faktory umožňují mikroorganismům proniknout do makroorganismu, udržet se v něm a také se vyhnout obrannému systému hostitelského makroorganismu (Votava, 2005). Geny pro tvorbu faktorů virulence jsou umístěny na chromozomech, ale také extrachromozomálně – na plazmidech, transpozonech nebo mohou být získány přenosem pomocí bakteriofága (Peterson, 1996). Extrachromozomálně kódované proteiny jsou zodpovědné mimo jiné za schopnost pseudomonád vzdorovat těžkým kovům a také antimikrobiálním látkám (Palleroni, 2005). Díky současnému výskytu nezávisle kódovaných faktorů může vzniknout vysoce virulentní a rezistentní kmen (Bednář a kol., 1996).

Quorum sensing je důležitým mechanismem uplatňujícím se při koordinování určitého chování, například při tvorbě biofilmu, při rezistenci vůči antibiotikům a ovlivňuje různé faktory virulence. Jedná se o zpětnovazebný systém vztažený na buněčnou denzitu, který umožňuje buňkám regulovat expresi genů (Rumbaugh a kol., 2000). *Pseudomonas aeruginosa* používá *quorum sensing* k tvorbě biofilmu, ke koordinovanému pohybu celé generace buněk – tzv. swarming motilitě, k produkci exopolysacharidu a agregaci buněk (Lewis a kol., 2002).

Nejlépe jsou popsány faktory virulence u *Pseudomonas aeruginosa*, protože tato bakterie se často vyskytuje v klinickém materiálu. Do této skupiny spadají struktury na povrchu bakteriální buňky (lipopolysacharidy, bičíky, pily) a také látky sekretované do prostředí, jež mají za účel poškodit hostitele, modifikovat imunitní reakci makroorganismu hostitele a chránit bakteriální buňku. Extracelulární látky můžeme rozdělit do několika skupin: adheziny, invaziny, agresiny a impediny (Kayser a kol., 2005).

2 PYOCINY

Bakteriociny jsou baktericidní látky bílkovinné povahy, jež jsou produkovány mnoha (grampozitivními i gramnegativními) bakteriemi a mají schopnost usmrtit bakterie stejných nebo blízce příbuzných kmenů (Ohsumi, 1980). Bylo rozpoznáno nejméně šestnáct tříd bacteriocinů, které byly pojmenovány na základě druhu bakterií, které je produkují (Takeda, 1975). Jedná se o koliciny – producent *Escherichia coli*, cloaciny – producent *Enterobacter cloacae*, pestisiny - *Yersinia pestis*, pyociny - *Pseudomonas aeruginosa* (dříve *P. pyocynia*), monociny - *Listeria monocytogenes*, cereciny - *Bacillus cereus*, staphylococciny – u bakterií rodu *Staphylococcus* a pediociny – produkované bakteriemi mléčného kvašení (Kim, 2006).

Pyociny produkuje více než 90 % kmenů bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Každý kmen může syntetizovat hned několik druhů pyocinů. Doposud byly popsány 3 typy pyocinů a to R-typ, F-typ, S-typ (Michel-Briand a Baysse, 2002).

Schopnost produkovat pyociny, je rozšířená u spousty druhů *P. aeruginosa*, ale spontánní úroveň produkce pyocinů je nízká, pouze u několika bakterií. Vystavení kultury mutagenním činitelům výrazně zvyšuje rychlost syntézy. Jacob používá ultrafialové záření (Jacob, 1954), zatímco Kageyama upřednostnil indukci pyocinů přidáním mitomycinu C k aktivním rostoucím kulturám (1-2 ug/ml) (Kageyama, 1964).

Každý kmen *P. aeruginosa* může syntetizovat zároveň několik pyocinů tří základních typů (Michel-Briand a Baysse, 2002), jejichž genetické determinanty se obvykle nacházejí ve variabilních oblastech genomu (He a kol., 2004). Ty se liší morfologií i způsobu usmrcování buněk. S-typy (rozpustné) pyociny jsou strukturálně podobné colicinům a mají i podobný způsobu účinku. Mají efektor a imunitní složku s komponentou efektorovou, která obsahuje DNázy a lipázy (Seo a Galloway, 1990). S-pyociny jsou proteáza sensitivní a nesedimentující při pozorování elektronovým mikroskopem, vzhledem k jejich malé velikosti. F-pyociny (flexuous) jsou zakřivené, nekontraktilní částice složené z vláken. Jsou konstrukčně, morfologicky i antigenně podobné (Kuroda a Kageyama, 1979). R-pyociny (tyčovité) se podobají bakterifágovým bičíkům, skládají se z kontraktilního pláště, jádra a bičíkovitých vláken (Smith a kol., 1992). Receptory pro R-pyociny jsou lipopolysacharidy nebo lipooligosacharidy nacházející se ve vnější membráně gramnegativních bakterií (Ishii a kol., 1965). Principem usmrcování citlivých mikroorganismů je s největší pravděpodobností narušení membránového potenciálu vytvořením pórů v cílových buněčných membránách (Uratani a Hoshino, 1984). Nukleotidové sekvence a genetické

organizace v R- a F- pyocinech genových klastrů, jsou podobné coliphagu P2 a λ , v daném pořadí (Michel-Briand a Baysse 2002). Syntéza pyocinů u *P. aeruginosa* zahrnuje dva transkripční regulátory (Prtn a PrtR) a je indukovatelná léčivými, která způsobují poškození DNA v *recA* způsobem, který může štěpit PrtR na homolog fágu λ , cI represor, jež normálně potlačuje pyocinovou genovou expresi. (Nakayama a kol., 2000).

2.1 Korpuskulární pyociny

Mezi tyto bakteriociny řadíme R- a F- pyociny, které na rozdíl od S-pyocinů nejsou citlivé k působení proteáz a jsou termolabilní (Ghequire a De Mot, 2014). Jedná se o vysokomolekulární (> 80 kDa) komplexy molekul, které bývají někdy nazývány tailociny (Ghequire a De Mot, 2015).

Dříve bylo nalezeno několik fágů nazvaných „R- a F- pyocin příbuzné fágy“, jsou to například fágy PS3, PS17 a KF1. Tyto fágy jsou nápadně podobné struktuře R- a F- pyocinům. Z výzkumu Nakayama a jeho kolegů jasně vyplývá, že R-pyociny jsou imunochemicky i geneticky blízké fágu P2 a F-pyociny jsou strukturně a sérologicky podobné fágu λ (Nakayama a kol., 2000). Nejedná se ale pravděpodobně o defektní verze těchto bakteriofágů, ale o evolučně specializované částice, jež pravděpodobně ztratily geny pro tvorbu fágové hlavičky a replikaci virionu (Lee a kol., 1999).

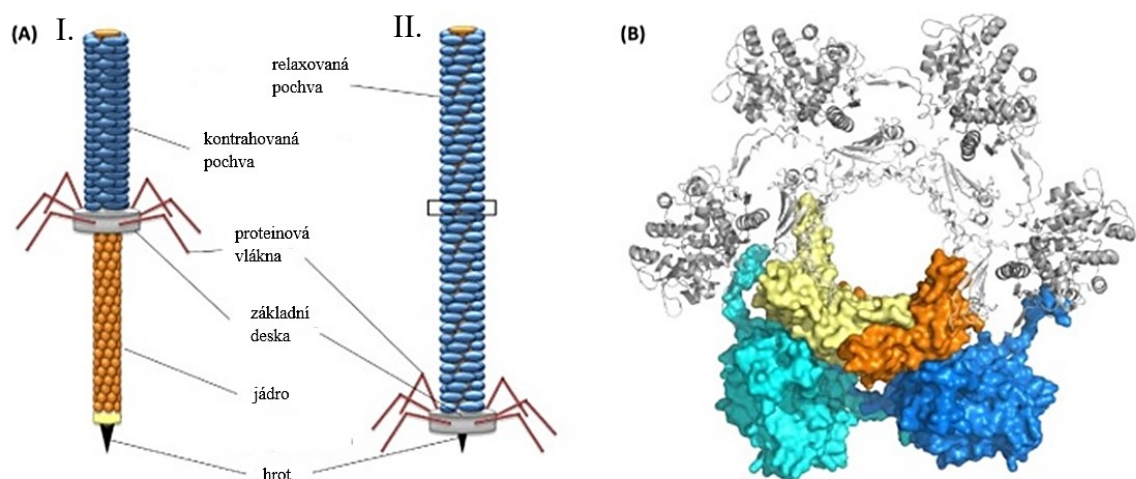
2.1.1 R-*typ* pyociny

Jsou prvním objeveným typem pyocinů, vypadají jako tyčovité částice připomínající bakteriofágový bičík, byly nazvány R-*typem*. Všechny R-*typy* pyocinů jsou nukleáza a proteáza resistantní. Tyto vlastnosti, mimo jiné, usnadňují purifikaci pyocinů a produkci specifického antiséra.

První pyocin R- produkovaný *P. aeruginosa* (později pojmenovaný R1) popsal v roce 1964 Kageyama (Kageyama, 1964). Následně bylo studováno několik dalších pyocinů C9, R2, R, R4, 21 a 430c (Govan, 1974), a R5. (Takeda, 1975). V současné době mají pyociny R-*typu* 5 podskupin, které byly charakterizovány a pojmenovány R1-R5 (Michel-Briand a Baysse, 2002). Existují některé další pyociny R-*typu*, které nejsou přiřazeny k některé z uvedených skupin, např. pyocin C9. Fyziologické funkce pyocinů R- jsou relativně neznámé (Heo a kol., 2007).

R-pyociny (z anglického „Rigid“ - pevný) se podobají bakteriofágovým bičíkům a jeví se jako pevné a nekontraktilní částice. Pozorování elektronovou mikroskopií naznačuje,

že jsou vytvořeny z dvojitého dutého válce, který se skládá z tuhého vnitřního jádra a kontraktilního vnějšího pláště. 120 nm dlouhé a ve vnějším průměru 15 nm široké. Plášť je tvořen přibližně 200 proteinovými podjednotkami uspořádanými do šroubovice symetricky (34 mezikruží, každé mezikruží se skládá ze šesti podjednotek, rozteč šroubovice 3,5 nm), a je schopný se smršťovat. Jádro (tvořeno ≈ 180 podjednotkami), které se nachází uvnitř pouzdra má stejnou délku (120 nm) a je 5,7 nm široké. Povrch rozšířeného pláště obsahuje různé shluky žmolků, pocházející ze spirálovitě strukturovaných šesti podjednotek obsažených v mezikruží. Koncovou částí je základní deska přichycena k pouzdru a slouží jako uchycující bod pro šest koncových proteinových vláken, fungujících jako kotva pro uchycení na receptor cílové buňky (Obr. 3) (Ghequire a De Mot, 2014). Specifické antigeny definující cílový kmen se nachází na distální části proteinových vláken a podle těchto specifických antigenů se pyociny řadí do jedné z pěti skupin (R1-R5) (Ohsumi, 1980).



Obr. 3. (A) Struktura R-pyocinu v kontrahované (I.) a relaxované (II.) konformaci. (B) Horní pohled v příčném řezu zobrazující hexamerní disk (převzato a upraveno z Ghequire a De Mot, 2015).

Receptor pro R-pyocin je většinou lipopolysacharid nebo lipooligosacharid, přesněji jejich karbohydrátová skupina nacházející se na vnější membráně gramnegativních bakterií (Ghequire a De Mot, 2014, Michel-Briand a Baysse, 2002). Účinnost R-pyocinů proti citlivým buňkám je vysoká. K usmrcení buňky postačí pouze jedna nebo dvě částice, což je mnohonásobně menší množství než v případě F- a S- pyocinů, u nichž se uvádí množství 280-300 částic (Heo a kol., 2007).

Ihned po adsorpci, všechny R- typy pyocinů zastavují syntézu makromolekul v citlivých buňkách a uvolňují intracelulární materiál a následně dochází k usmrcení buňky a to během

20 minut. Ve výsledku dojde ke smrti buňky z důvodu depolarizace cytoplazmatické membrány (minimálně 90 mV), zapříčiněnou také tvorbou pórů (Uratani a Hoshino, 1984)

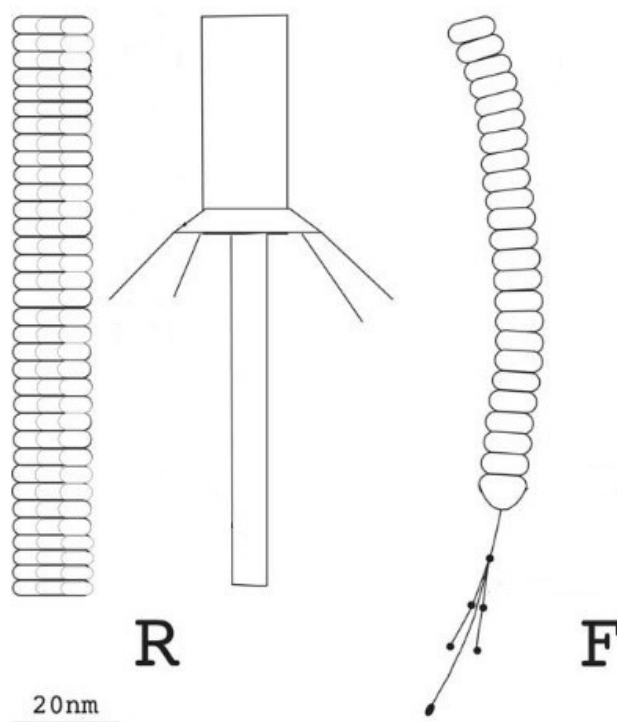
Zajímavé je, že R-pyociny produkované *P. aeruginosa* jsou schopny se zaměřit také na kmeny jiných bakteriálních rodů, jako jsou například *Campylobacter sp.* (Campagnari a kol., 1994), *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* (Phillips a kol., 1990) a *Neisseria meningitidis* (Blackwell a Law, 1981). Což naznačuje, že tyto bakterie sdílejí společné lipopolysacharidové receptory jako *P. aeruginosa*. (Connelly a Allen, 1983)

2.1.2 F-typ pyociny

Takeya a kolektiv zaznamenali v roce 1967 výskyt pyocinu, který se na základě elektronové mikroskopie jevil jako zakřivená tyč (Takeya a kol., 1967). Stejný typ částic (nazývaný 430f) byl nalezen u *P. aeruginosa* 430, která současně produkovala R- typ pyocinu (Govan, 1974). Tyto částice nevykazují typickou plášť-jádrovou strukturu jako pyociny R.

Bylo objeveno několik pyocinů typu F: pyocin 28, 430f (Govan, 1974), F1 a F2 (Kuroda, 1979) a F3. (Kuroda, 1981). Jejich výroba je často doprovázena produkcí R- typu pyocinu nebo produkcí bakteriofágu (Govan, 1974).

Analýzou pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že pyocin F1 vypadá jako zakřivená tyč, non-kontraktilní tyč o délce 106 nm s jednotnou šířkou 10 nm. Je složen z 23 proteinových podjednotek, na jednom konci má tvar čtverce, zatímco na druhém se zužuje do hrotu, který se táhne od vláknité struktury o celkové délce 43 nm (Kuroda, 1981). Struktura a sérologické vlastnosti jednotlivých typů pyocinů F-, jsou si velmi podobné, ale liší se specifitou k receptoru citlivého mikroorganismu (Ling a kol., 2010). Rozdíl ve struktuře R- a F- pyocinů je zobrazena na obrázku (Obr. 4).



Obr. 4. Schématické znázorění R- a F- typů pyocinů (Michel-Briand a Baysse, 2002).

2.2 Nízkomolekulární pyociny

2.2.1 S-typ pyociny

S-pyociny (z anglického „Soluble“ - rozpustný) neboli rozpustné pyociny se mechanismem účinku a strukturou podobají kolicinům, ale neobsahují lytický protein. Vzhledem k malé velikosti je nelze sledovat elektronovým mikroskopem ani je izolovat sedimentací (Lee a kol., 1999). Oproti pyocinům R- a F- jsou citlivé vůči působení proteáz a také na světlo (Ghequire a De Mot, 2014). Protože mají malou velikost, nelze je pozorovat pod elektronovým mikroskopem ani je izolovat sedimentací (Lee a kol., 1999)

S-pyociny jsou složeny ze dvou proteinových podjednotek, které jsou při produkci pyocinů do prostředí spojeny v jeden funkční komplex. Každá z podjednotek má svou funkci. Větší podjednotka tzv. letální protein zodpovídá za usmrcení cílové buňky. Menší podjednotka chrání produkující buňku před vlastním pyocinem – má tzv. imunitní funkci (Michel-Briand a Baysse, 2002). Větší podjednotka o velikosti 498-776 aminokyselin má doménovou strukturu. N-terminální doména je zodpovědná za vazbu k receptoru citlivé buňky. Za ní následuje doména, jejíž funkce zatím není známá. Třetí doména zajišťuje translokaci

S-pyocinu skrz buněčnou membránu citlivé buňky. Poslední doména nacházející se na C-konci větší podjednotky zajišťuje usmrcení cílové buňky (Ling a kol., 2010). Menší podjednotku tvoří 87-153 aminokyselin. Geny pro imunitní protein jsou přepisovány ve stejném směru jako zbytek genů pro S-pyociny. Vyjímkou jsou geny pro imunitní protein pyocinu S5, který je orientován v opačném směru než geny pro letální protein (Michel-Briand a Baysse, 2002). S-pyociny obsahují místa s navzájem homologními sekvencemi. Takovým místem je tzv. HNH endonukleázový motiv, který se nachází na C-terminálním konci větší podjednotky S-pyocinů. Jedná se o strukturu tvořenou dvěma antiparalelními β -listy spojenými smyčkou a obklopenými α -šroubovicí. Ve struktuře je navázaný ion kovu (Joshi a kol., 2015). Vyskytuje se u všech S-pyocinů s DNázovou aktivitou kromě pyocinu S3 a je zodpovědný za aktivitu vedoucí k degradaci DNA (Ghequire a De Mot, 2014). Nejvíce homologní v HNH motivu jsou pyociny S1:S2, kde podobnost činí až 85 %. C-terminální konec peptidové struktury S-pyocinů vykazuje také vysokou sekvenční homologii s některými koliciny. Například pyociny S1, S2 a AP41 mají evoluční vztah s kolicinem E2, pyocin S4 s kolicinem E5 a pyocin S5 s koliciny Ia a Ib (Michel-Briand a Baysse, 2002). Další konzervované sekvence S-pyocinů se nacházejí na imunitním proteinu. Pyociny S1:S2 mají v peptidovém řetězci imunitního proteinu pouze jednu rozdílnou aminokyselinu. U pyocinů S1, S2 a AP41 vykazuje imunitní protein vysokou sekvenční homologii s kolicinem E2 (Nakayama a kol., 2000).

Účinnost S-pyocinů může být ovlivněna okolním prostředím. Při nedostatku železa v prostředí se zvyšuje vazba S1, S2 a S3 na citlivé buňky, protože citlivá buňka vytváří, v prostředí s nedostatkem železa, více sideroforů a jejich receptorů, které jsou schopny železo z prostředí vychytávat. Při zvýšené produkci sideroforů se také zvyšuje počet membránových proteinů na povrchu citlivé buňky. Tyto proteiny dopravují siderofory s navázaným železem do buňky a slouží zároveň jako receptory pro vstup některých pyocinů do místa jejich působení (Ghequire a De Mot, 2014). Tyto receptory se nazývají ferisideroforové receptory a patří k nim ferripyoverdinové receptory (FpvA) a ferripyochelinový receptor (FptA). Receptory FpvA jsou využívány pyociny S2, S3 a S4, receptor FptA je využíván pyocinem S5 (Dingemans a kol., 2016).

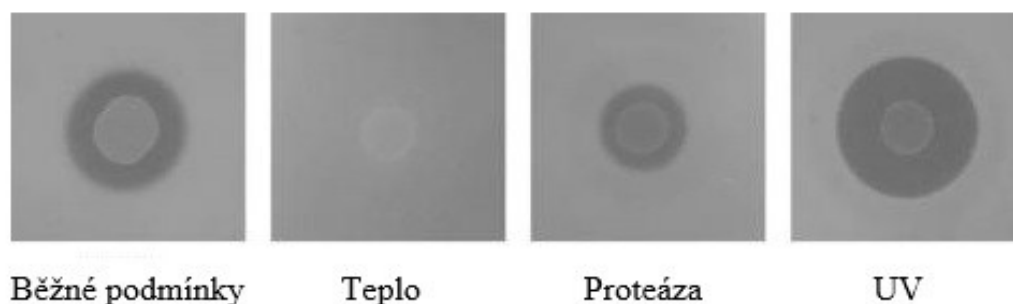
2.2.2 M-typ pyociny

M-typ pyociny (CMLB - colicin M-like bakteriociny) jsou strukturně podobné kolicinu M (ColM), který je produkován bakterií *Escherichia coli*. Ve své struktuře obsahují CMLB

Mg²⁺ ionty navázané na aktivní místo bakteriocinu. Mezi CMLB jsou řazeny PaeM (M1) produkovaný *P. aeruginosa*, PsyM (M2) produkovaný *P. syringae* a PflM (M3) produkovaný *P. fluorescens*. PaeM je strukturně podobný ColM, liší se ale konformací aktivního místa. Cytotoxická aktivita CMLB spočívá v degradaci lipidu II. Lipid II je prekurzor peptidoglykanu nacházející se v buněčné stěně bakterií. Pyocin tak přímo ovlivňuje tvorbu buněčné stěny, čímž se CMLB jeví jako účinné látky, které by mohly být v budoucnosti využity jako širokospektrální antibiotika. Mechanismus produkce CMLB však ještě není přesně znám (Barreteau a kol., 2012).

2.2.3 Pyociny s lektinovou doménou

Jedná se o bakteriociny (i pyociny) jež obsahují část vážící cukry, který vykazuje homologii s rostlinými manozu-vázajícími lektiny (MMLB–monocot mannose-binding lectins), (Ghequire a De Mot, 2014). MMLB jsou proteiny vyskytující se u rostlin, zvířat i mikroorganismů, jež mají schopnost aglutinace a zásadní vlastností je, že jsou schopny vázat specifické sacharidy s velmi vysokou afinitou (Etzler a Mohnen, 2009). Mohou mít také antimykotické, antivirové a insekticidní účinky (Ghequire, Loris a De Mot, 2012). Tyto pyociny jsou podobně jako pyociny-S uspořádány do funkčních částí – obsahují N-koncovou doménu, C-koncovou doménu a C-koncovou extenzi. C-doména slouží k navázání sacharidu, N-doména má odlišnou funkci – dodnes ne zcela známou (McCaughey a kol., 2014). Mechanismus působení proti citlivým buňkám je odlišný ve srovnání s ostatními pyociny, ale do dnešního dne není přesně známý (Ghequire, Loris a De Mot, 2012). Aktivita těchto pyocinů může být inhibována teplem nebo proteázami, stejně jako S-pyocinů. Poškození DNA, např. UV zářením, naopak vede ke zvýšení jejich produkce (Obr. 5). Od S-pyocinů se liší tím, že neprodukují imunitní protein, který by zajišťoval producentské buňce ochranu před vlastním bakteriocinem a také není přítomna cytotoxická doména ve struktuře proteinu (Parret a kol., 2005). Prvním identifikovaným pyocinem tohoto typu byl putacidin A (také známý jako LlpA) produkovaný *P. putida* BW11M1 (Parrett a kol., 2005).

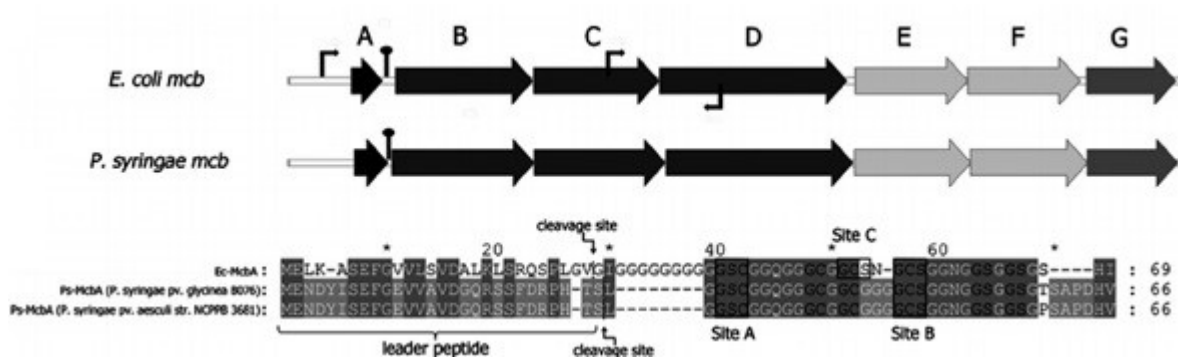


Obr. 5. Vliv UV záření, proteázy a tepla na aktivitu pyocinu s lektinovou doménou.

*Po vystavení UV záření je pozorováno zvětšení inhibiční zóny. Přidání proteázy (pronáza-E) snižuje inhibiční efekt bakteriocinu. Po vystavení produkujícího kmene teplotě 75 °C po dobu 15 minut není pozorovatelná žádná aktivita proti indikátorovému kmeni (převzato a upraveno z Parret a kol., 2005)

2.2.4 Mikrociny

Poměrně nedávno objevenou skupinou pyocynů jsou Mikrociny (MBLB - „microcin B-like“ bakteriocin). Jsou homologní s mikrocinem B17, který produkuje *E. coli* (Metelev a kol., 2013). Jedná se o posttranslačně modifikované peptidy, jejichž prekurzory jsou heterocyklické molekuly thiazol a oxazol. Souhrnně jsou tedy mikrociny nazývané jako thiazol/oxazol modifikované mikrociny (TOMM) (Metelev a kol., 2013). Za tvorbu TOMM je zodpovědný *mcb* operon, který reguluje 7 genů (Obr. 6). Gen *mcbA* kóduje peptidový prekurzor mikrocinu B. Geny *mcbBCD* kódují mikrocin B syntázu, enzymový komplex zodpovědný za posttranslační modifikaci prepeptidu. Gen *mcbEF* kóduje efluxní pumpu mikrocinu B, která zajišťuje transport mikrocinu ven z produkující buňky. Gen *mcbG* je zodpovědný za produkci imunitního proteinu (Shkundina a kol., 2014). Mechanismem účinku těchto bakteriocinů je inhibice aktivity DNA gyrázy, což je enzym účastnící se replikace DNA (Metelev a kol., 2013).



Obr. 6. Schematické zobrazení homologních genových klastrů zodpovědných za produkci MBLB u *E. coli* a *P. syringae*.

*Silnými šípkami je vyznačeno 7 genů, které jsou zodpovědné za produkci MBLB. Tenké šípky znázorňují promotory vyskytující se u *E. coli*. Svislá čára mezi *mcbA* a *mcbB* genem značí umístění transkripčních terminátorů. Vysoká sekvenční homologie je mezi geny *mcbA*, *mcbC* a *mcbG* (převzato a upraveno z Meteleev a kol., 2013).

3 ANALÝZA BAKTERIÁLNÍHO GENOMU

Jednou z hlavních metod molekulární biologie je sekvenace DNA. Jedná se o proces vedoucí k určení primární struktury DNA neboli pořadí nukleotidů (A, C, G, T) v polypeptidovém řetězci. Sekvenace je velmi významná při studiu bakterií, protože mikrobiální genom je velmi variabilní. Výsledky sekvenace nám umožňují nejen určovat oblasti genomů zodpovědné za patogenitu, ale i sledovat vnitrodruhové modifikace a adaptace, které vedou ke zvýšené odolnosti bakterií ke standardním léčebným postupům.

Počátky sekvenačních metod sahají do roku 1977, kdy byly téměř současně zavedeny dvě metody, Sangerova a Maxamova-Gilbertova. Sangerova metoda se během let ukázala jako efektivnější a až donedávna byla v laboratořích hojně používána. S pokrokem vědy se ale zvedají nároky i na sekvenační metody, zpracovávají se větší objemy dat a je třeba, aby sekvenace byla nejen přesná, ale i levná a rychlá. Proto se vedle klasické Sangerovy metody objevuje i sekvenování nové generace. V dnešní době je známo obrovské množství sekvenačních metod.

3.1 Klasické metody sekvenování

Ke klasickým metodám sekvenování DNA řadíme dvě základní metody Maxam-Gilbertovo sekvenování a Sangerovo sekvenování. Tyto metody byly nezávisle na sobě popsány dvěma nezávislými vědeckými týmy koncem 70. let minulého století. Přestože byly objeveny téměř současně, jsou založeny na zcela odlišných principech. Podstatou Maxam-Gilbertovy metody, která je známá také jako chemická metoda sekvenování, je specifické štěpení řetězce molekuly DNA po modifikaci jednotlivých bází chemickými činidly, zatímco Sangerova metoda, neboli enzymatická metoda sekvenování, je založena na ukončení procesu replikace DNA na specifických místech pomocí tzv. terminátorů replikace. Sangerova metoda se během let ukázala jako mnohem účinnější a s různými modifikacemi je běžně používána v laboratorní praxi i nadále. Maxam-Gilbertova metoda z finančních a praktických důvodů již používána není (King, 2006).

I když se obě metody principem sekvenace liší, mají i společné fáze:

- a) značení jednoho z konců fragmentu DNA, jehož sekvenci stanovujeme;
- b) vytvoření souboru různě dlouhých úseků DNA;
- c) využití gelové elektroforézy (GE) k oddělení jednotlivých úseků.

U obou metod je jejich účinnost značně ovlivněna rozlišovací schopnost GE – abychom mohli spolehlivě určit sekvenci dané DNA, jednotlivé úseky musí být od sebe odděleny s přesností na 1 nukleotid, což je u delších fragmentů (nad 1000 bp) téměř nemožné. Z tohoto důvodu je gelová elektroforéza, která určuje maximální teoretickou délku stanovovaných sekvencí, limitujícím faktorem obou metod.

3.1.1 Maxam-Gilbertova metoda

Neboli také chemická metoda sekvenace. Je pojmenována podle autorů Allana Maxama a Waltera Gilberta a poprvé byla zveřejněna v roce 1977. Principem této metody je specifická chemická degradace purinových a pyrimidinových bází (Maxam a Gilbert, 1977).

Výchozím materiálem pro tuto metodu je soubor identických molekul DNA. Je možné použít jak dvouvláknovou (dsDNA), tak i jednovláknovou DNA (ssDNA). V případě použití dvouvláknové DNA je třeba před začátkem samotné sekvenace provést denaturaci.

Postup sekvenace lze rozdělit do tří částí:

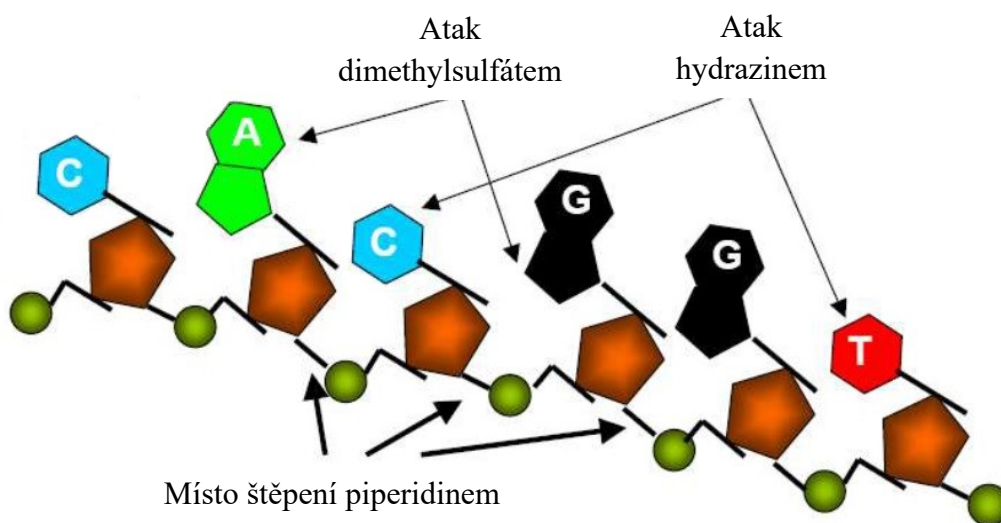
1. značení 5' konce ssDNA radioaktivním fosforem ^{32}P ;
2. rozdělení označených molekul DNA na 4 části a vystavení působení chemikálii, které jsou bázově specifické;
3. štěpení DNA piperidinem.

Bázově specifickými chemikáliemi jsou: kyselina mravenčí, dimethylsulfát, hydrazin a chlorid sodný (Tab. 4) (Šmarda a kol., 2005).

Tab. 4. Chemikálie používané při Maxam-Gilbertově metodě a jejich bázová specifická účinnost (Šmarda a kol., 2005).

Báze	Chemikálie	Specifická modifikace
G	Dimethylsulfát	Methylace guaninu pomocí dimethylsulfátu při pH 8,0 se guanin stává náchylným k odstranění při alkalickém pH.
A+G	Kyselina mravenčí	Přidání piperidinu v kyselině mravenčí při pH 2,0 vede k odstranění purinových bází
C+T	Hydrazin	Přidání hydrazinu vede k otevření pyrimidinového kruhu a jeho odstranění z DNA
C	Chlorid sodný	Při vysoké iontové síle (1,5 mol/l NaCl) reaguje s hydrazinem jenom cytosin

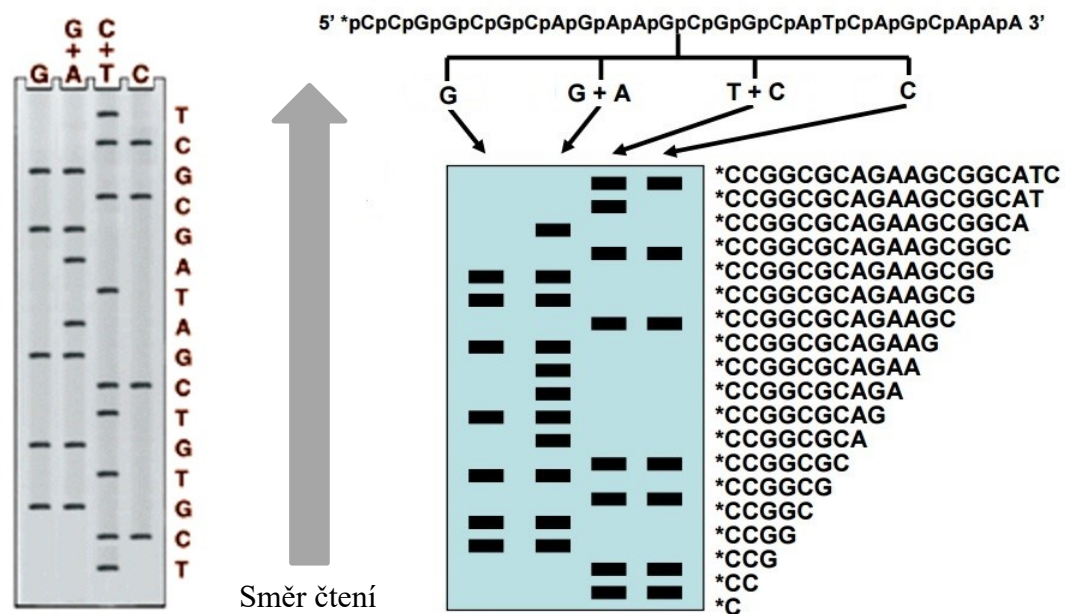
Následkem použití chemikálií dochází k narušení a následnému odštěpení bází z řetězce DNA. Podmínky reakcí jsou upraveny tak, aby v průběhu došlo k odštěpení vždy jen jedné báze v jednom řetězci, přičemž pozice této báze v každém řetězci by měla být jiná. Následuje přidání piperidinu, který za vysoké teploty (90 °C) štěpí cukr-fosfátovou kostru DNA (Obr. 7). Výsledkem reakcí je vznik souboru fragmentů DNA o různé délce, jež je dána pozicí příslušné báze vůči radioaktivně značenému konci (Maxam a Gilbert, 1977).



Obr. 7. Schématické zobrazení štěpení DNA.

**Chemické látky štěpí purinovou nebo pyrimidinovou vazbu, piperidin štěpí vazbu fosfátu na uhlíku 3' (převzato a upraveno z Istdna, online).*

Výsledky proběhlých reakcí se vedle sebe umístí do polyakrylamidového gelu a rozdělí se pomocí gelové elektroforézy, kde se jednotlivé fragmenty rozdělí podle hmotnosti a současně tedy i podle velikosti a délky. K odlišení fragmentů od zbytkových částí řetězců DNA se používá film citlivý na radioaktivní záření. Na výsledném záznamu jsou fragmenty zobrazeny jako tmavé proužky. Pozice jednotlivých bází se odečítají manuálně, a to směrem zespodu nahoru (Obr. 8) (Šmarda a kol., 2005).



Obr. 8. Schematické znázornění výsledného záznamu Maxam-Gilbertova sekvenování (převzato a upraveno z NationalDiagnostics, online).

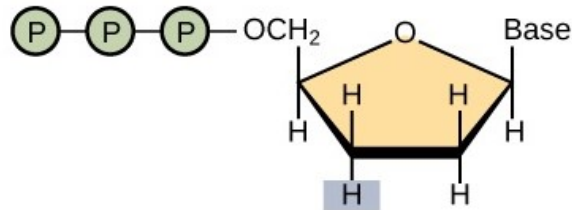
Tato metoda se běžně využívala v 80. letech minulého století. V počátcích vývoje dovozovala stanovit sekvenci 100 bp dlouhých fragmentů DNA. Avšak díky četným modifikacím a vylepšením se podařilo zvýšit účinnost této metody až na 400-500 bp, ale s rostoucí délkou fragmentů klesá přesnost sekvenace. Maxam-Gilbertova metoda i přes veškerá vylepšení není nyní využívána v běžné praxi. Jedná se o metodu, která je náročná a nelze ji zcela automatizovat, je třeba pracovat s velkým množstvím DNA a je třeba pracovat se zdraví škodlivými chemikáliemi a mutagenními radioaktivními značkami (Šmarda a kol., 2005).

3.1.2 Sangerova metoda

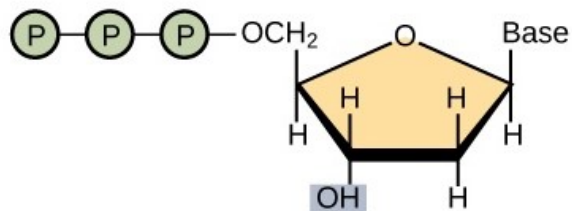
Sangerova metoda neboli enzymatická metoda, byla popsána v roce 1977. Na jejím objevu se podílel Frederik Sanger a kolektiv. Před začátkem experimentu je potřeba připravit tzv. DNA knihovny. Řetězec DNA je sestřižen na kratší úseky, naklonován do DNA vektorů a amplifikován *in vivo*. Amplifikace probíhá v bakteriálních buňkách, ze kterých se následně extrahují plazmidy nesoucí klonované fragmenty (Sanger a kol., 1977).

Principem je sekvenace pomocí detekce ukončení prodlužujícího se vlákna DNA. Podstatou je specifická terminace replikace za pomoci dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTPs), které se od obyčejných liší absencí OH- skupiny na 3' uhlíku cukru (Obr. 9). Struktura molekuly ddNTP je zásadní protože, jsou-li modifikované nukleotidy začleněny do sekvence, není

možné dál pokračovat v replikaci, kvůli absenci OH-skupiny je znemožněna vazba dalšího nukleotidu a tím je ukončena elongace řetězce (BIO, online).



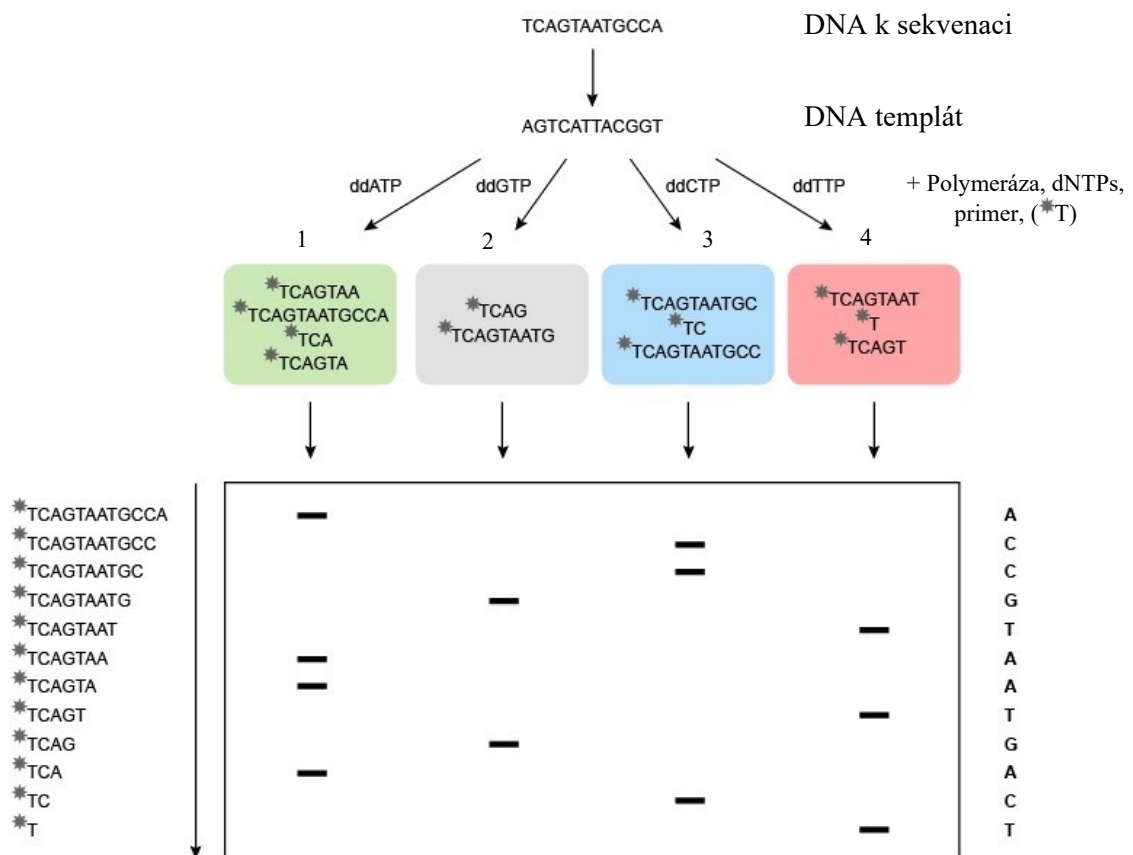
Dideoxynukleotidtrifosfát (ddNTPs)



Deoxynukleotidtrifosfát (dNTPs)

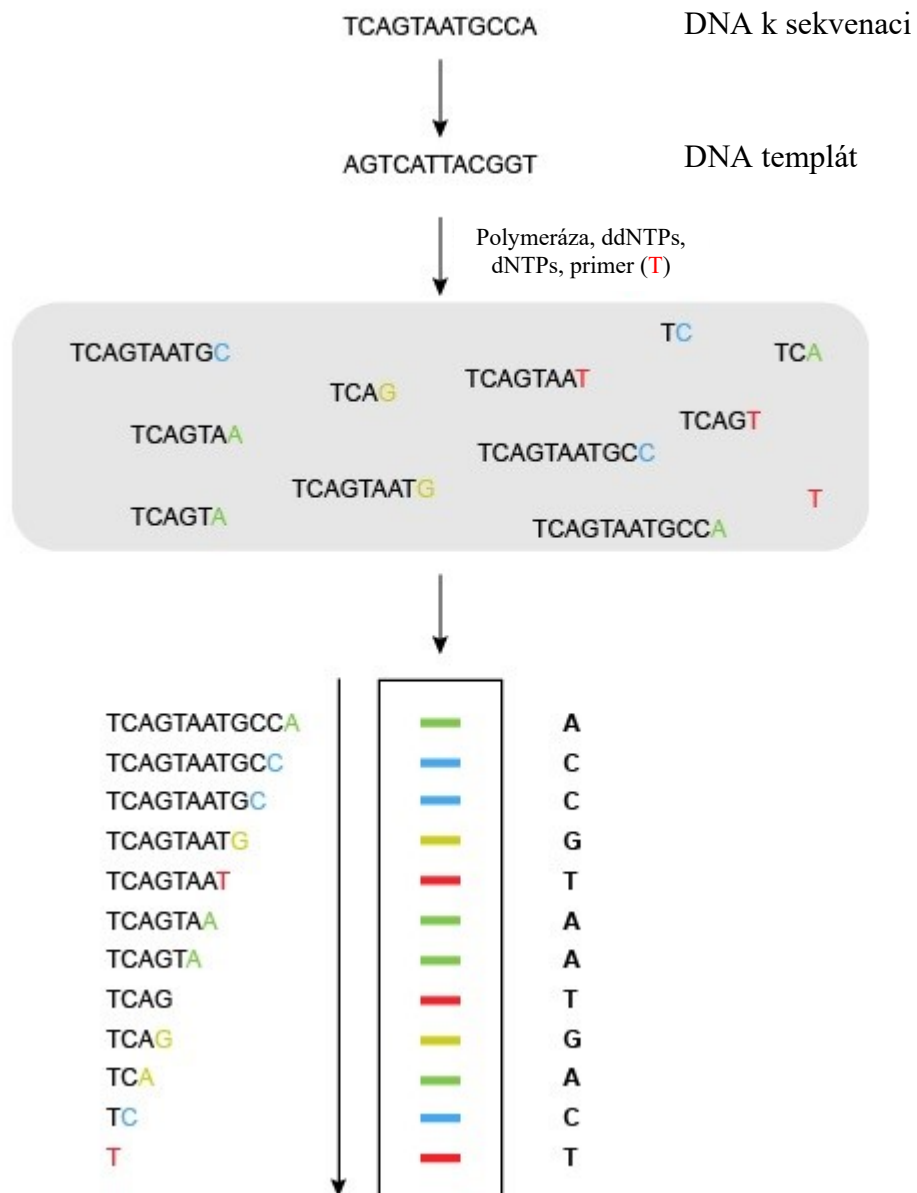
Obr. 9. Rozdíl mezi dNTPs a ddNTPs
(převzato a upraveno z Bioinformatics, online).

Sekvenace probíhá ve čtyřech nezávislých reakcích. Jsou vytvořeny čtyři reakční směsi. Základ směsi tvoří DNA-polymeráza, primery a více kopií templátu, k tomuto základu jsou přidány radioaktivně nebo fluorescenčně značené deoxynukleotidy (dNTPs) a také dideoxynukleotidy (ddNTPs). V každé ze čtyř směsí je přítomen jeden charakteristický ddNTP – ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP. Aby mohla probíhat i klasická syntéza DNA, jsou ddNTPs přítomny ve směsi v nízké koncentraci (poměr ddNTP : dNTP většinou odpovídá 1 : 100). Výsledkem reakce jsou fragmenty o různé délce, které jsou zakončeny označenými ddNTPs. Fragmenty jsou denaturovány a roztříděny podle velikosti elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Každá reakční směs má svou dráhu. Výsledky se odečítají příslušnou metodou v závislosti na způsobu značení. Výsledkem ruční sekvenace jsou typické proužky, ze kterých lze odvodit sekvenaci DNA (Obr. 10) (Sanger a kol., 1977).



Obr. 10. Schematické znázornění manuálního provedení Sangerovy metody sekvenování s využitím radioaktivně značených primerů (převzato a upraveno z Atdbio, online).

Dříve se používaly radioaktivní značky (podobně jako u Maxam-Gilbertovi metody se jednalo o ^{32}P), jež se odečítaly pomocí autoradiografie (Šmarda a kol., 2005). V 2. polovině 80 let se začala využívat fluorescenční barviva při sekvenování DNA (Prober a kol., 1987). Fluorescenční značkou je možné označit jak primer, tak i přímo ddNTPs. Značení primerů se provádí během jejich syntézy. Pro každou ze čtyř reakcí jsou primery označeny jiným barvivem, avšak při značení primerů nelze odlišit úseky s předčasně ukončenou syntézou od těch, které jsou zakončeny příslušným ddNTP. Z tohoto důvodu se ukázalo jako výhodnější označovat barvivem ddNTPs. Podobně jako u značení primerů se pro každý ze čtyř ddNTPs používá jiné barvivo. Proto nově syntetizované úseky zakončené různými ddNTPs dávají různé signály. Takto získané výsledky jsou kvalitnější a postup je technicky jednodušší (Obr. 11).



Obr. 11. Schematické znázornění automatizovaného provedení Sangerovy metody s využitím flurescenčně značených ddNTPs (převzato a upraveno z Atdbio, online).

Další modifikací této metody bylo zavedení kapilární elektroforézy na místo gelové. Všechny tyto pokroky umožnily provádět replikaci a následnou elektroforézu v jedné reakci, nikoli ve čtyřech oddělených reakcích, což přispělo ke zrychlení a zlevnění celého procesu.

Sangerova metoda patřila k nejpoužívanějším metodám sekvenace, k čemuž přispěla i automatizace této metody. Avšak v dnešní době je nahrazena metodami nové generace, které jsou časově i finančně méně náročné a také jsou přesnější.

3.2 Sekvenační metody nové generace (NGS)

Pro rozvoj genomiky a genomické medicíny bylo zásadním objevem to, že různá onemocnění mají původ v genetické změně, což vedlo k vývoji nových metod pro studování genetické informace. Klasické sekvenační metody nebyly schopny rozsáhlý lidský genom kompletně přečíst a proto započala práce na vývoji novějších metod, jež toho budou schopny (Wheeler a kol., 2008). Nové metody se začaly objevovat koncem 90. let 20. století jako alternativa k již existujícím technikám. Základ nových metod vycházel zejména z automatizované Sangerovy metody, jež ale po využití maximální kapacity a výkonu přestaly dostačovat. Bylo nutné vyvinout nové – výkonnější a levnější metody. K nejznámějším a nejpoužívanějším metodám sekvenace patří pyrosekvenace 454 Genome Sequencers (GS) od firmy Roche, SOLiD™ od Life Technologies a sekvenátory firmy Illumina.

3.2.1 Pyrosekvenace (metoda 454/Rosche)

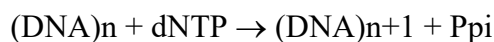
Pyrosekvenace je metoda nové generace, která se začala vyvíjet jako jedna z prvních alternativ ke klasické Sangerově metodě. Tato metoda začala vznikat v druhé polovině osmdesátých let, kdy P. Nyrén popsal možnosti detekce aktivity DNA-polymerázy za pomoci bioluminiscence (Nyrén, 1987). Následovalo zkoumání využití bioluminiscence v sekvenování DNA. Pyrosekvenování bylo popsáno až roku 1996. V roce 2005 byl uveden na trh první sekvenační systém, založený na metodě pyrosekvenace - FLX GS od firem Roche a 454 Life Sciences, určený pro masivní paralelní sekvenování. (Pospíšilová, 2009). V dnešní době jsou neznámějšími systémy využívající pyrosekvenování GS FLX+ a GS Junior+.

Metoda pyrosekvenování spojuje metodu sekvenování využívající syntézu komplementárního vlákna pomocí DNA-polymerázy za použití DNA-polymerázy a zároveň analýzu její aktivity pomocí dalších enzymů a chemických látek. Principem metody je detekce uvolnění pyrofosfátu (P_{pi}) při syntéze DNA enzymem DNA-polymerázou. Pokud se po přidání nukleotidů objeví světelný záblesk, značí to, že se uvolnil bisfosfát a víme, že se v daném místě vyskytuje komplementární báze. Při opakovaném přidávání všech nukleotidů a odečítáním intenzity světelného signálu vzniká pyrogram, ze kterého zjišťujeme pořadí bází. Tato metoda na rozdíl od klasických metod nevyužívá značek ani rozdělení produktů pomocí elektroforézy.

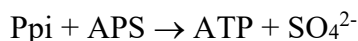
Reakční směs obsahuje templát u něhož stanovujeme pořadí nukleotidů, 4 enzymy (DNA-polymerázu, ATP-sulfurylázu, luciferázu a apyrázu), fluorescein (luciferin), adenosin-5'-fosfosulfát (APS) a primery. Po jednom jsou přidávány jednotlivé dNTPs (dATP, dTTP, dCTP a dGTP) a pokud dojde k začlenění daného dNTP za pomoci DNA-polymerázy do syntetizovaného řetězce, uvolní se pyrofosfát P_{pi}, což následně spouští řadu biochemických reakcí (Obr. 12) (omicsonline, online).

Čtení sekvence se sestává ze čtyř cyklicky se opakujících kroků:

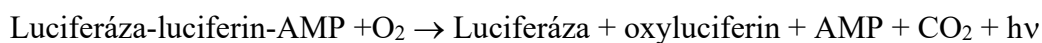
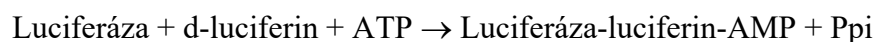
1. inkorporace nukleotidu do DNA pomocí polymerázy a následné uvolnění anorganického bisfosfátu



2. vytvoření ATP, substrátu pro luciferázu pomocí ATP sulfurylázy

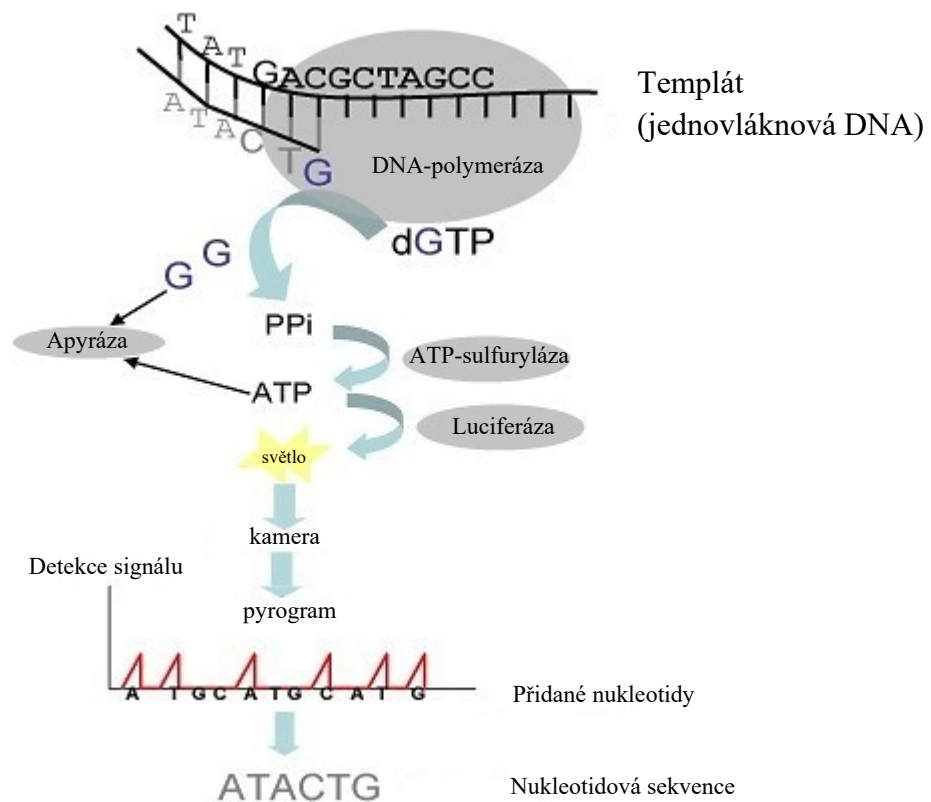


3. vyzáření světelného kvanta luciferázou



4. odstranění zbylého ATP a neinkorporovaných nukleotidů pomocí apyrázy (popř. promytím)





Obr. 12. Schématické znázornění biochemických reakcí, které následují po začlenění dNTP do řetězce DNA při pyrosekvenování.

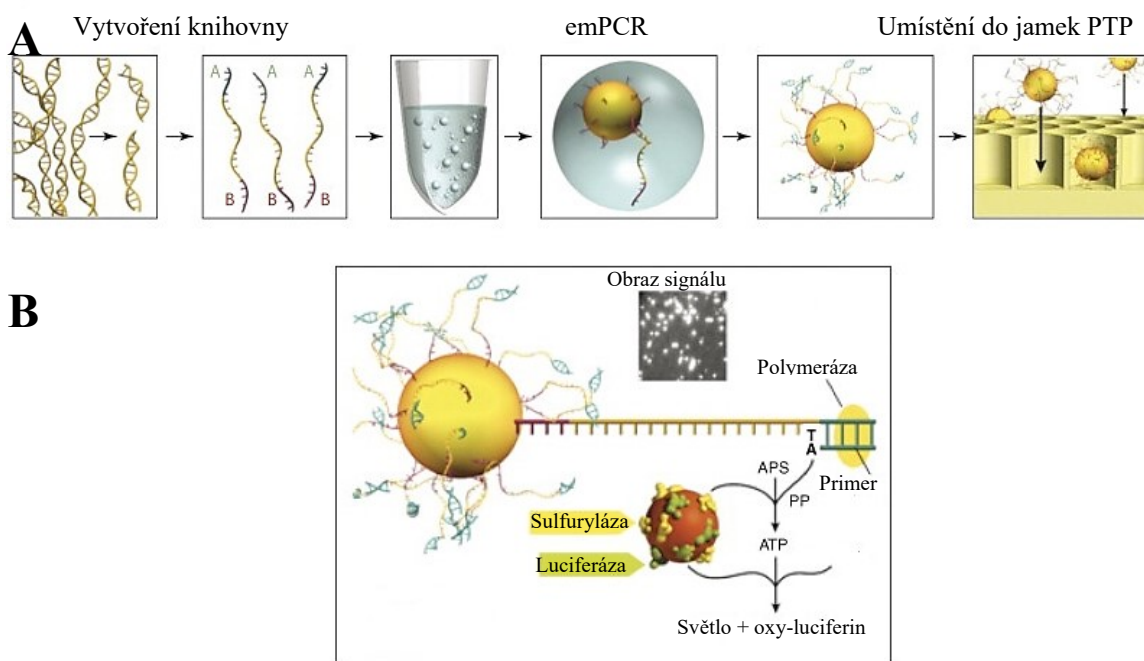
*Uvolněný PPi je za přítomnosti APS přeměněn na ATP, který je následně využit luciferázou ke konverzi luciferinu na oxyluciferin. Oxyluciferin emituje světelné záření, které je zaznamenáno detektorem (převzato a upraveno z Sun a Xi, 2014).

Jako vzorek může sloužit genomová DNA, produkty PCR a cDNA. Před začátkem samotné sekvenace je třeba delší templátovou DNA rozštěpit na krátké fragmenty o délce 300-800 bp. Fragmentace není nutná pro menší vzorky jako např. amplikony PCR nebo nekódující RNA. Dalším krokem je příprava DNA-knihovny. Konce 3' a 5' každého fragmentu jsou označeny dvěma různými adaptory (Rapid Library Adaptors) se známými sekvencemi, které hrají důležitou roli při čištění, amplifikaci a následném sekvenování. Takto označené úseky DNA jsou u technologie 454/Roche imobilizovány pomocí jednoho z adaptérů na 28 μm mikrokuličkách, nesoucích oligonukleotidy komplementární k tomuto adaptoru (Jarvie, 2005). Volný adaptor slouží k vazbě univerzálního primeru při vlastním

sekvenování. Vzhledem k tomu, že je důležité, aby byl na mikrokuličce vždy navázán jen jeden fragment DNA, jsou mikrokuličky přidávány v přebytku. Zbytek vzorku, obsahující neoznačené úseky nebo ty označené pouze na jednom konci, je odmyt (Pettersson a kol., 2009).

Následujícím krokem je amplifikace DNA-knihovny pomocí emulzní polymerazové řetězové reakce (emPCR). Při emPCR probíhá amplifikace na všech kuličkách současně, protože kapky vody v emulzi voda-olej obsahují veškeré nutné komponenty a stávají se z nich tzv. mikroreaktory. V důsledku emPCR dojde na každé mikrokuličce k tvorbě až 10^7 kopií templátu (Margulies a kol., 2005).

Před samotným sekvenováním jsou mikrokuličky s amplifikovanou DNA umístěny do pikolitrových jamek čipu PicoTiterPlate™ (PTP), který je tvořen optickými vlákny. V každé jamce by měla být umístěna vždy jedna kulička, ovšem u 2-5 % naplněných jamek je možné, že je přítomno více kuliček. Čip se umístí do nástroje pro sekvenování. V sekvenátoru je do jamek aplikována reakční směs, která obsahuje nadbytek DNA- polymerázy, ATP sulfurylázy a luciferázy. Probíhá vlastní sekvenační reakce. Průběh sekvenování v každé jamce je sledován pomocí detektoru (CCD kamery - The Charge-Coupled Device) (Pettersson a kol., 2009). CCD kamera zachycuje světlo, které je uvolňováno při průběhu sekvenační reakce a výsledné signály jsou řazeny v pořadí (Jarvie, 2005). Získaná data jsou analyzována pomocí bioinformatických nástrojů a vyhodnocena v podobě pyrogramu. Program přístroje pro pyrosekvenaci je založen na detekci změny množství Ppi, který je uvolňován po polymerázou zprostředkované adici na dNTP na volném řetězci. Schématické znázornění celého průběhu sekvenační reakce 454/Roche je vyobrazeno na obrázku (Obr. 13).



Obr. 13. Schématické znázornění průběhu sekvenace technikou 454/Roche.

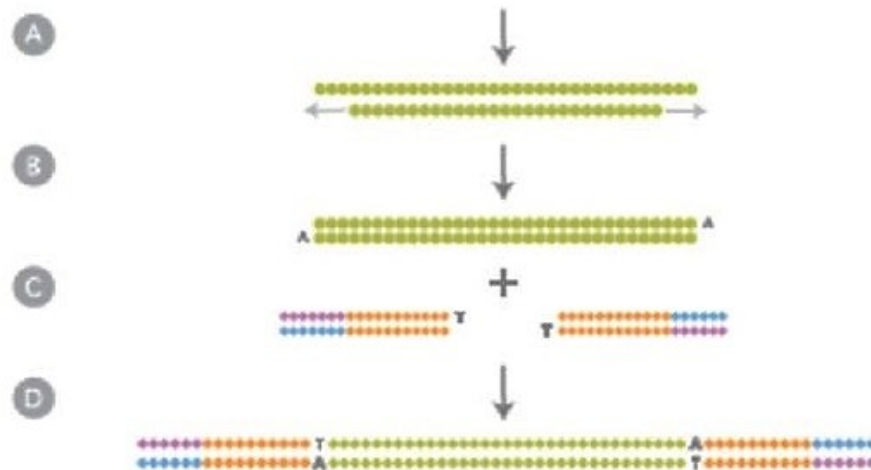
*A - Fragmentace vzorku, příprava DNA knihovny, vložení mikrokuličky s fragmentem do emPCR, amplifikace úseku a uložení mikrokuličky a amplifikovanými úseky DNA do PicoTiterPlate™, B - Sekvenační reakce při pyrosekvenaci. Jedna mikrokulička obsahuje miliony kopií DNA molekul (převzato a upraveno z Ansorge, 2009).

3.2.2 Illumina (Solexa)

První přístroj firmy Solexa byl uveden na trh v roce 2006. V roce 2007 jej odkoupila firma Illumina. Principem metody je podobně jako u 454/Roche, mnohonásobná amplifikace a následná sekvenace s využitím reverzních terminátorů replikace (Ansorge, 2009). Illumina nabízí různé přístroje lišící se výkonem a vhodností použití v různých případech sekvenace, konkrétně se jedná o sérii MiSeq, NextSeq a HiSeq. Pro cílenou sekvenaci krátkých úseků DNA, genů nebo malých genomů je vhodná řada MiSeq. Pro rutinní použití k rychlé a spolehlivé sekvenaci se hodí řada NextSeq, jež nabízí i možnost cytogenetické analýzy. HiSeq je vhodný pro celogenomové sekvenování (Illumina, online).

Před samotnou sekvenací je stejně jako u metody 454/Roche nutná příprava DNA knihovny (Obr. 14). Příprava knihovny, však probíhá odlišným způsobem v několika krocích. Nejprve je DNA podrobena mechanickému nebo enzymatickému štěpení na kratší úseky, délka vzniklých fragmentů se pohybuje v délce 0-1200 bp. Konce těchto fragmentů jsou následně upraveny enzymatickou reakcí směsí Kleowova fragmentu, T4 polymerázy a T4

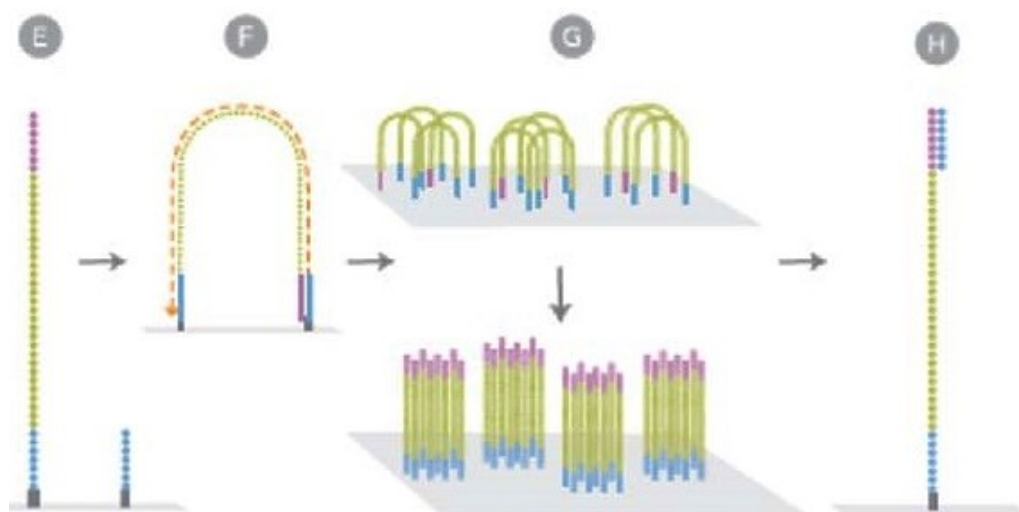
polynukleotidkinázy. Na 3' konec fragmentu je připojen adenin, příštím krokem je navázání dvou různých adaptorů na 3' a 5' konce. Adaptory slouží k vazbě na povrch destičky pro amplifikaci a zároveň jsou potřebné pro navázání primerů během sekvenace. Pro sekvenaci jsou optimální fragmenty o délce 200-250 bp, fragmenty o této délce vybereme pomocí gelové elektroforézy.



Obr. 14. Příprava DNA knihovny.

**Na odděleném úseku DNA (A) dochází k připojení adeninu (B) a pomocí adaptérů (C) dochází k výběru fragmentů (D), (převzato a upraveno z Ansorge, 2009).*

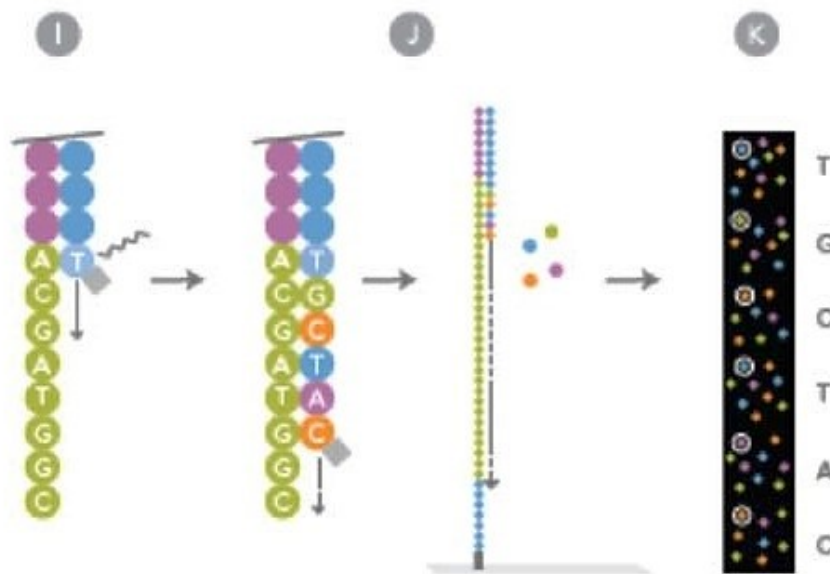
Následuje amplifikace vybraných fragmentů (Obr. 15) za pomoci PCR s využitím fúzní DNA-polymerázy (Croucher a kol., 2009). Celý proces probíhá na amplifikační destičce (angl. „the flow cell“), která obsahuje osm oddělených drah, což umožňuje amplifikovat najednou osm vzorků. Destička je pokryta oligonukleotidy, jež jsou komplementární k oběma typům adaptérů. Templát je nejprve uchycen pouze jedním koncem, po přidání enzymů však dojde k ohnutí řetězce DNA a napojení pomocí druhého adaptéru na příslušný oligonukleotid. Vznikají tzv. můstky, proto je tato metoda PCR nazývána jako „bridge PCR“. Celkem probíhá amplifikace v osmnácti cyklech, při kterých dochází ke klonování každého fragmentu knihovny. Na každý konec úseku DNA je na závěr navázán primer. Výsledkem této izotermické amplifikace jsou shluky (angl. „Clusters“), kdy každý obsahuje asi 10^6 kopií (Croucher a kol., 2009).



Obr. 15. Proces amplifikace fragmentů z DNA knihovny.

**DNA je vkládána na amplifikační destičku (E), kde dochází k vytvoření můstku (F), naklonování úseků DNA (G) a nakonec k navázání příslušného primeru (H), (převzato a upraveno z Ansorge, 2009).*

Při samotném sekvenování (Obr. 16) jsou využívány dNTPs, jež jsou na 3' koncích pozměněny fluorescenční značkou a slouží zároveň jako terminátory replikace. K začlenění takto pozměněných dNTPs do vznikajícího řetězce DNA se využívá modifikovaná DNA-polymeráza. Reakce probíhá ve všech shlucích najednou v přístroji Illumina. Všechny čtyři označené typy dNTPs se přidávají do reakční směsi najednou. Po začlenění odpovídajícího dNTP dojde k terminaci replikace a odečtení signálu CCD kamerou, která rozezná, o jakou bázi se jedná podle vlnové délky emitovaného světla. Poté jsou odblokovány 3' konce začleněného dNTP a je připojena další báze.



Obr. 16. Sekvenace v Illumina Genome Analyzeru.

**Dochází v emisi fluorescenčního světla u první navázané báze (I), která se postupně opakuje až na konec čteného úseku DNA (J). Pomocí laseru dochází k detekci (K), (převzato a upraveno z Ansorge, 2009).*

3.2.3 Life Technologies SOLiD™

Tato metoda je založena na ligaci krátkých oligonukleotidů, které jsou komplementární k templátu. Princip metody je obsažen již v názvu metody „Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection“. První přístroj založený na této technologii představila firma Life Technologies v roce 2007. Při této metodě dochází k masivnímu paralelnímu sekvenování, kde je templát nejprve mnohonásobně zmnožen a poté následuje sekvenace, jež se provádí zároveň ve více kopiích (Mardis, 2007).

Nejprve je nutné připravit DNA knihovnu, kdy se templátová DNA štěpí na kratší úseky a poté se na konce těchto fragmentů naváží adaptory P1 a P2. Jeden z těchto adaptorů je důležitý k navázání na mikrokuličky o velikosti 1 μm (Pettersson a kol., 2009). Dále proběhne emPCR a mikrokuličky s amplifikovanou DNA jsou po modifikaci 3' konců se naváží na skleněnou destičku, na níž se následně provádí sekvenování (Ansorge, 2009). Na destičce je možné analyzovat najednou až osm odlišných vzorků, lze ji totiž rozdělit na dvě, čtyři až osm oddělených částí.

Samotná sekvenace probíhá v pěti cyklech, v každém z pěti cyklů se používá jeden z pěti primerů. Tyto primery mají rozdílnou délku – liší se vždy o jeden nukleotid. Do reakční

směsi se po navázání primerů, přidává DNA-ligáza a oligonukleotidy. Tyto oligonukleotidy mají délku 8 bp, definují je dvě počáteční báze, jež jsou schopny vytvořit 16 kombinací. Jsou upraveny tak, že po začlenění do řetězce DNA zabraňují vazbě dalšího oligonukleotidu. V pozicích 1 a 2 jsou báze určeny následujícím způsobem. Jestliže je oligonukleotid komplementární s templátem, dochází k navázání tohoto oligonukleotidového oktameru na primer a to za pomoci DNA-ligázy. Následně se odečte signál za pomoci detektoru. Poté jsou na všech mikrokuličkách štěpeny navázané oligonukleotidy mezi 5. a 6. bází. Dojde tedy i k odštěpení fluorescenční značky a může se navázat další oligonukleotid. Při opakování procesu se stanovují báze až do požadované délky, poté je vzniklý řetězec odstraněn. Celý proces je opakován s novým primerem, který je kratší o jeden nukleotid než předchozí. Dojde k posunutí čtecího rámce, a jestliže dříve byly detekovány báze na pozicích 6 a 7, 11 a 12, 16 a 17 atd. nyní budou detekovány báze na pozicích 0 a 1, 5 a 6, 10 a 11, 15 a 16 atd. U cyklů 3., 4. a 5. se nemusí odečítat první oligonukleotid v důsledku posunu a vzájemného překryvu čtecích rámců (McKernan a kol., 2009). Probíhá celkem pět cyklů kompletních sekvenací, kdy se vždy postupně zařazuje primer, který je kratší o jeden dNTP než předchozí (n-2, n-3 a n-4), (Ansorge, 2009).

V průběhu tohoto typu sekvenace je každá báze určena dvakrát, jako součást dvou odlišných dvojic. Toto je často označováno jako dvoufázové kódování. Každá dvojice je označena různými fluorescenčními značkami, takže je možné za pomoci detektoru ihned určit o jakou dvojici přesně jde. Vzhledem k výměnám primerů je každá báze určena ze dvou nezávislých ligací. Tento způsob sekvenace se díky dvoufázovému kódování vyznačuje vysokou přesností a nízkou chybovostí (Mardis, 2007).

3.3 Metody třetí generace sekvenování (TGS)

Vývoj na poli sekvenačních technologií stále pokračuje. V současné době se již v praxi běžně objevují metody třetí generace. Tyto metody jsou schopny provést sekvenaci z jedné molekuly, takže je potřeba daleko menší množství DNA. Není tedy potřeba provádět mnohonásobnou amplifikaci DNA. Metody třetí generace jsou oproti předchozím metodám rychlejší a levnější (Mardis, 2013). Sekvenační metody je možné dělit podle způsobu odečtu výsledků na light a post-light metody. Nebo je možné metody dělit podle toho zda při sekvenaci dochází nebo nedochází k přerušení mezi jednotlivými kroky sekvenace (Schadt, Turner a Kasarskis, 2010). Podle principu průběhu sekvenace lze rozdělit techniky TGS do tří skupin:

1. metody založené na sekvenování syntézou („sequencing by synthesis“);
2. metody využívající technologii nanoporů („nanopore sequencing“);
3. metody provádějící sekvenování pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Schadt a kol., 2010).

Na trhu jsou dostupné sekvenátory PacBio (Pacific Biosciences), SMRT (Single Molecule Real Time sequencing), Illumina Tru-seq Synthetic Long-Read a Oxford Nanopore Technologies. Tyto technologie jsou schopny produkovat fragmenty o průměrné délce 5000-15000 bp, přičemž nejdelší úseky mohou obsahovat až 100000 bp. Tyto metody mají srovnatelnou chybovost kolem 15 %, ale díky algoritmickým vylepšením může být dosaženo přesnosti až 99,99 % (Lee a kol., 2016).

První sekvenace metodou SMRT, byla popsána v roce 2009. Tato technologie je jedinečná v tom, že disponuje největší délkou čtených úseků (až 40 kb). Sekvencování se provádí na jedné molekule templátu bez nutnosti amplifikace (Eid a kol., 2009). Principem této metody je sledování aktivity jednotlivých molekul enzymu DNA-polymerázy v reálném čase. Sekvenace se provádí na čipu, který je tvořený jamkami o průměru několika desítek nanometrů ve vrstvě kovu o tloušťce 100 nm, která je položena na tenkou skleněnou destičku, jež je pokryta vrstvou biotinu (Flusberg a kol., 2010). Každý čip nese desítky tisíc jamek, které obsahují imobilizovanou molekulu Φ 29 DNA-polymerázy. Tato DNA-polymeráza se vyznačuje svou stabilitou a schopností přesně a začlenit fluorescenčně značené dNTPs, kde je fluorescenční značka vázána na trifosfát, nikoli přímo na báze deoxynukleotidů (Lee a kol., 2016). Při začlenění daného dNTP do znikajícího řetězce, je fluorescenční značka uvolněna společně s Ppi a replikace pokračuje.

Sekvenační reakce začíná tvorbou komplexu: templát - DNA-polymeráza. Konce templátu jsou upraveny tak, aby bylo umožněno navázání primeru. Čip je následně překryt směsí všech čtyř typů dNTPs. Deoxynukleotidy volně difundují do jamek, ale nedochází k emisi světla, jelikož jsou ve tmavé části jamek a nejsou excitovány. Je-li DNA-polymerázou detekován komplementární dNTP, dochází k jeho začlenění. Odečtení výsledku probíhá v okamžiku, kdy je daný dNTP v bezprostřední blízkosti DNA-polymerázy, ale ještě před samotným začleněním dNTP a odštěpením fluorescenční značky. Celkový proces excitace a emise po vstupu do ozářené části jamky trvá pouhých (Schadt, Turner a Kasarskis, 2010).

Poslední technologii třetí generace vydala společnost Oxford Nanopore Technologies v roce 2014. Jejich přístroj Oxford Nanopore MinION využívá sledování velikosti elektrického

proudu procházejícího nanopórem při průchodu biomakromolekuly tímto pórem. V závislosti na typu a velikosti této molekuly dochází k poklesu velikosti elektrického proudu. Jednovláknové molekuly DNA putují po směru elektrického proudu, čímž je zajištěn jejich průchod přes nanopory. Zpomalení translokace je dosahováno tím, že bezprostředně před vstupem do nanoporu je vlákno ssDNA zpracováváno Φ 29 DNA-polymerázou (Lee a kol., 2016).

Po spuštění elektrického proudu na *trans* straně vzniká pozitivní náboj, a celkově negativně nabitě templáty začínají putovat k nanopórům. Svými volnými konci je DNA vtahována dovnitř pórů a dochází k zachycení komplexů DNA - DNA-polymeráza na jejich povrchu. Do reakční směsi na *cis* straně jsou aplikovány všechny čtyři typy dNTPs a $MgCl_2$ a může tak být zahájena replikace DNA. Φ 29 DNA-polymeráza je schopná překonat elektrostatičnou interakci mezi řetězcem DNA a elektrickým polem na *trans* straně membrány, a templát je postupně translokován zpátky na *cis* stranu. Výsledky sekvenování se odečítají v průběhu transportu vlákna DNA přes nanopór v podobě poklesu elektrického proudu. Získána data jsou vyhodnocena počítačem a zpracována do grafu (Manrao a kol., 2012).

3.4 Kompletace genomů

Po ukončení sekvenace dostaneme velké množství dat, které je třeba následně zpracovat za využití moderních informačních technologií. Toto zpracování spočívá ve správném uspořádání krátkých fragmentů, které vznikly při sekvenaci do souvislých sekvenací. Tento postup je odborně nazýván Assembly, což můžeme přeložit do češtiny jako skládání nebo kompletace. Důležité je počítat s chybovostí fragmentů. Pro získání informace ze sekvenace, ji musíme zpracovat a následně anotovat. Pro analýzu surových dat jsou většinou od výrobců sekvenačních přístrojů dodávány bioinformatické nástroje. Metody NGS a TGS jsou charakteristické tím, že při jednom běhu je sekvence daného úseku stanovena vícekrát, takže je možné odhalit případné chyby vzájemným porovnáním vzniklých sekvenací.

Při použití metod nové generace dochází k chybám a ke vzniku artefaktů, které jsou zásadním problémem při kompletaci genomu. Původ chyb je rozličný a chyby se odvíjí od použité metody a zvoleného postupu (Becker a kol., 2012). Chyby mohou ovlivnit vytváření kontigů, jejich skládání a analýzu. Abychom předešli práci s chybnými daty, je třeba získaná data před dalším zpracováním pročistit a odstranit chybné sekvenace.

Existuje více metod, kterými lze provést čištění a tím minimalizovat následné chyby (Kunin a kol., 2010).

Kvalita vzniklého fragmentu není stejná v celé jeho délce, na koncích se častěji objevují chybně řazené báze. Z tohoto důvodu je omezena použitelná délka fragmentů. Často se přistupuje k odstranění konců fragmentů nebo k vyřazení příliš krátkých fragmentů, tato opatření však vedou k velkým ztrátám dat (Salmela, 2010). Kvalitu fragmentů lze zlepšit použitím spolehlivějších polymeráz, jež jsou modifikovány metodami proteinového inženýrství nebo využitím párového čtení obou konců (Li a kol., 2008).

Pro kompletaci genomu existují dva způsoby. Je možné využít buď metodu referenčního skládání, nebo komplementaci *de novo*. Metoda referenčního skládání využívá již existující referenční genom, ke kterému jsou fragmenty přiřazovány, kompletovány a výsledkem je sekvence podobná nebo shodná s referenčním genomem. Tuto metodu je vhodné využít v případě, že existuje důvěryhodná reference. Komplementace *de novo* probíhá bez využití referenční sekvence, tzv. „od počátku nově“. Fragmenty sekvenace jsou skládány bez předlohy a výsledkem je celá nová sekvence (Miller, Koren a Sutton, 2010). Další složkou skládání genomové sekvence je tzv. sekvenační přiložení (alignment). Pomocí alignmentu jsou uspořádány fragmenty DNA tak, že identické nukleotidové zbytky leží pod sebou. Tímto způsobem jsou nalezeny shodné překrývající se fragmenty a sousedící fragmenty jsou tak vedle sebe řazeny v odpovídajícím pořadí. Tímto způsobem se tvoří větší genomové úseky, tzv. kontigy (Nagarajan a Pop, 2009).

Výstupem zpracování dat pomocí bioinformatického programu je mezinárodně uznávaný formát textového souboru. Nejvíce používaným formátem je FASTA, který je používán jak pro nukleotidové, tak i aminokyselinové sekvence. V tomto formátu je sekvence zapsána jako sled znaků A, C, G, T, mohou se objevit znaky mající zvláštní význam, pomlčky mohou představovat vynechané báze, písmeno N značí mezeru v kontigu. Jednotný formát výstupních dat je důležitý při následném vkládání do mezinárodních databází a také při analýze získaných dat (Miller, Koren a Sutton, 2010).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cíle této diplomové práce:

- Provedení experimentu a zjištění inhibičního spektra *Pseudomonas fulva* 373 kvalitativním testem.
- Provedení sekvenace bakteriální genomu *Pseudomonas fulva* 373 a následná analýza získaných dat.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Materiál

5.1.1 Mikroorganismy

V této práci byl použit zkoumaný mikroorganismus, který byl izolován v roce 2013 z jedlého hmyzu saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*). Pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byla tato bakterie identifikována jako *Pseudomonas fulva* a označena číslem 373. Dále byly použity indikátorové gramnegativní bakterie ze sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně (Tab. 5), které byly izolovány z chlazené drůbeže v letech 2006-2013 a z bažantů v letech 2011 (Tab. 6). Všechny mikroorganismy byly uchovávány v glycerolu při -80 °C. Indikátorové kmeny byly použity k testování inhibičního spektra bakterie *Pseudomonas fulva* 373. V práci bylo také použito 7 indikátorových sbírkových kmenů získaných z Biologického ústavu LF MU v Brně (Tab. 7).

Tab. 5. Seznam použitých indikátorových gramnegativních kmenů izolovaných z chlazené drůbeže na FT UTB ve Zlíně.

Název	Označení	Původ
<i>Citrobacter freundii</i>	217	kůže chlazené drůbeže
<i>Enterobacter</i> sp.	212	kůže chlazené drůbeže
<i>Escherichia coli</i>	125W	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	kůže chlazené drůbeže
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	40	kůže chlazené drůbeže
<i>Pantoea agglomerans</i>	21	kůže chlazené drůbeže
<i>Pseudomonas fragi</i>	19	kůže chlazené drůbeže
<i>Pseudomonas putida</i>	23	kůže chlazené drůbeže

Tab. 6. Seznam použitých indikátorových gramnegativních kmenů izolovaných z bažantů na FT UTB ve Zlíně.

Název	Označení	Původ
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	B15	stehno (voliéra)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	B30	prsa (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B1	prsa (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B6	prsa (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B7	prsa (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B9	stehno (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B27	játra (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B28	prsa (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B35	prsa (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B36	prsa (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B37	stehno (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B38	stehno (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B39	stehno (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B52	játra (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B53a	játra (příroda)
<i>Escherichia coli</i>	B55	prsa (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B56	prsa (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B67	stehno (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B72	stehno (voliéra)
<i>Escherichia coli</i>	B73	stehno (voliéra)
<i>Ewingella americana</i>	B94	stehno (příroda)
<i>Moelleralla wisconsensis</i>	B111	játra (příroda)
<i>Pantoea agglomerans</i>	B78	játra (voliéra)
<i>Serratia liquefaciens</i>	B108	játra (příroda)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	B85	prsa (příroda)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	B100	stehno (příroda)

Tab. 7. Seznam použitých indikátorových sbírkových kmenů. Z Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.

Sbírkový kmen	Označení	Zdroj
<i>Escherichia coli</i>	K12 Row	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	B1	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	ϕ	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	P400	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	Sabina40	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Shigella sonnei</i>	17	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Shigella flexneri</i>	25W	Biologický ústav LF MU, Brno

Všechny kmeny byly vyočkovány křížovým roztěrem na MPA ze zkumavek, které byly uchovány při -80 °C. Vyočkované misky byly kultivovány 24 hodin při teplotách optimálních pro vyočkované mikroorganismy. Pro další práci byly misky s kulturami uchovány v lednici při 4 °C.

5.1.2 Použité přístroje a pomůcky

- Autokláv 135 S, H+P Varioklav - H+P Labortechnik AG, Německo
- Automatické mikropipety, Eppendorf Reserch, Německo
- Automatické mikropipety, Nichiryo, Japonsko
- Bakteriologické kličky
- Biohazard box EUROFLOX, Scholler, Holandsko
- Biologický termostat BT 120, Česká republika
- Digitální váha Kern & Sohn GmbH, Německo
- Chladnička Electrolux, Švédsko
- Laboratorní sklo a běžné pomůcky:
 - Kádinky
 - Erlenmeyerova baňka
 - Petriho misky
 - Odměrné válce
 - Zkumavky (běžné, centrifugační)
- Mikrovlnná trouba Electrolux EMS2, Švédsko

5.1.3 Kultivační média

V této práci byla použita tato kultivační média: masopeptonový bujon (MPB), masopeptonový agar (MPA) a Soft agar (Tab. 8).

Jednotlivé složky MPA, MPB a Soft agaru byly naváženy s přesností na 0,01 g. Jednotlivé směsi byly převedeny do roztoku, ten byl zahříván, až došlo k úplnému rozpuštění všech složek a následně sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Tab. 8. Složení použitých kultivačních médií.

Kultivační médium	Složení	Množství
Masopeptonový bujón (MPB)	NaCl	3 g
	Masový extrakt	3 g
	Pepton	5 g
	Destilovaná voda	1000 ml
Masopeptonový agar (MPA)	NaCl	3 g
	Masový extrakt	3 g
	Pepton	5 g
	Bakteriologický agar	15 g
	Destilovaná voda	1000 ml
Soft agar	NaCl	5 g
	Masový extrakt	3 g
	Pepton	5 g
	Bakteriologický agar	10,5 g
	Destilovaná voda	1000 ml

5.1.4 Vpichový test – kvalitativní stanovení bakteriocinů

Testovaný mikroorganismus *Pseudomonas fulva* 373 byl vpichem vyočkován do misek s MPA a kultivován 48 hodin v termostatu při teplotě 30 °C. Po usmrcení bakterií parami chloroformu (30 minut) následovalo přelití misek 3 ml Soft agaru s 0,1 ml kultur indikátorových kmenů, které byly přes noc pomnoženy ve zkumavkách s MPB. Následovala kultivace po dobu 24 hodin při teplotě optimální pro indikátorový kmen. Druhý den byla zjišťována přítomnost inhibičních zón okolo původních kolonií produkčního kmene. V případě přítomnosti zóny byla hodnocena její velikost (-/+, +, ++, +++, +++) a to, zda byla zóna čirá nebo matná. Indikátorový kmen byl označen jako citlivý v případě, že byla vytvořena inhibiční zóna kolem produkčního kmene.

5.2 Metody

5.2.1 Sekvence a analýza sekvencí

Analýza genomu zkoumané bakterie *Pseudomonas fulva* 373, byla provedena po sekvenaci a kompletaci genomu. Nejprve bylo třeba připravit DNA knihovnu, k čemuž byl použit kit Nextra® XT DNA Sample Preparation Guide. Následná sekvenace byla provedena na přístroji Illumina MiSeq. Získaná data byla upravena pomocí programu SeqMan 4. Data získaná při sekvenaci, byla nahrána do tohoto programu. Byly zadány podmínky zpracování a sekvenační fragmenty byly upraveny a seskládány metodou *de novo*, do tzv. kontigů, což jsou řetězce po sobě jdoucích fragmentů DNA, které vytváří spojitou sekvenci. Tyto operace byly provedeny ve spolupráci s MU Brno a VUVeL. Kontigy bylo možné následně analyzovat pomocí bioinformatických programů a databází.

Nejprve byla genomická data analyzována pomocí algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Tento algoritmus využívá tzv. alignment, což je způsob porovnání dvou a více homologních sekvencí aminokyselin nebo nukleových kyselin (Li a kol., 2009). Je to základní postup pro programy, vyhledávající podobnosti v databázích. Výstupem porovnání, které využívá tuto metodu, jsou sekvence zapsané pod sebou, kdy se shodné aminokyseliny nebo nukleotidy řadí pod sebe do stejného sloupce (Mount, 2004). Soubor s kontigy analyzovaného genomu kmene *Pseudomonas fulva* 373 byl nahrán do BLASTu, byla zvolena kritéria pro analýzu. Následně BLAST provedl srovnání s dostupnými databázemi NCBI, které obsahují anotované genomy mikroorganismů.

BLAST je algoritmus, který je používán v bioinformatice pro srovnání sekvencí DNA. Umožňuje srovnání vložené sekvence se sekvencemi anotovanými v databázích. Tento algoritmus je schopen rozpoznat nejen naprosto shodné sekvence, ale i sekvence, které vykazují podobnost nad stanovenou mezí. BLAST jako program byl navržen v roce 1990 autory Stephenem Altschulem, Warrenem Gishem a kolektivem. K analýze využívá heuristický princip testování, kdy ve většině případů je stanovovaná sekvence menší než sekvence uvedená v databázích. Sekvenční alignment je prováděn v několika krocích. Nejprve jsou odfiltrovány repetitivní sekvence, které mohou negativně ovlivnit nalezení signifikantních sekvencí v databázích. Poté vzniká k-písmenný seznam úseků ze zadané sekvence, kde „k“ označuje délku úseku a pro DNA je většinou $k=11$. Seznam obsahuje všechny možné varianty úseků zadané sekvence a tyto úseky jsou následně hledány v databázi. Vyhodnocení zda úsek odpovídá úseku v databázi je prováděno pomocí

přiřazování skóre jednotlivým kombinacím. V případě, že skóre přesáhne zadanou hodnotu je úsek hodnocen jako odpovídající. Toto probíhá až do doby než skóre začne klesat (Xiong, 2006).

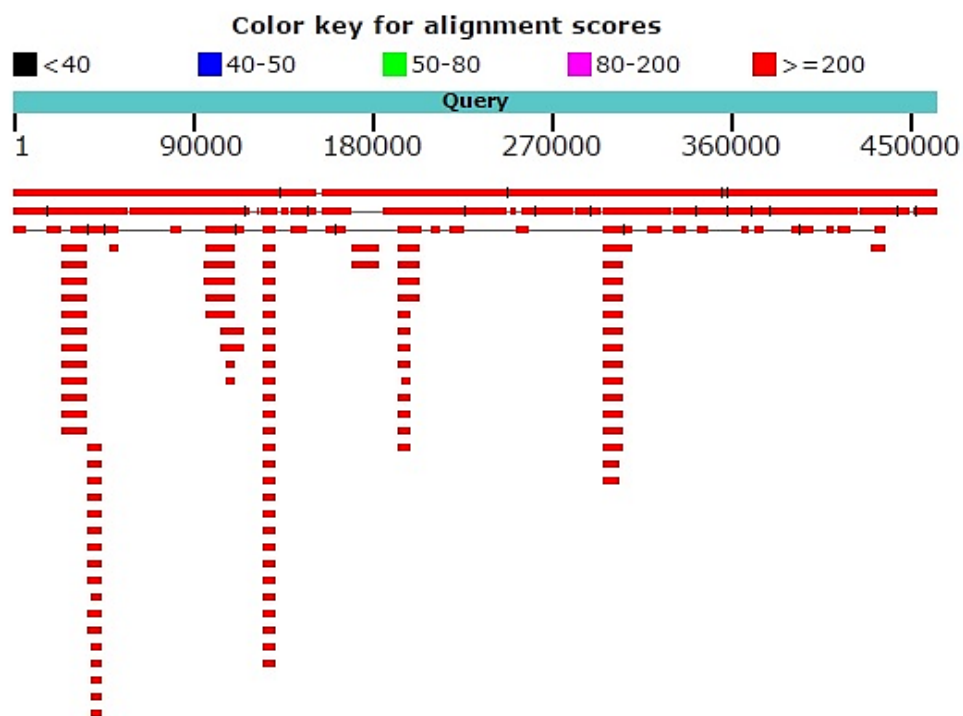
Následovala analýza v programu RAST do kterého byl taktéž nahrán soubor s vytvořenými kontigy. Analýza dat byla provedena pomocí nástrojů v prostředí SEED-Viewer. RAST představuje automatickou službu pro anotaci bakteriálních genomů. RAST identifikuje geny, které kódují proteiny, rRNA a tRNA. Je schopen přiřadit funkce genům a predikuje, které subsystémy jsou zastoupeny v genomu, a využívá tyto informace k vytvoření metabolické sítě. Anotovaný genom je možné stáhnout v různých exportních formátech (např. GenBank, FASTA, GFF3, Excel) nebo procházet v porovnávacím prostředí SEED-Viewer. Toto prostředí nabízí řadu možností pro analýzu nahraného genomu. Internetové stránky SEED a RAST podporují řadu nástrojů srovnávací genomiky (Aziz a kol., 2008).

Jako poslední byla provedena analýza bioinformatickým programem MUMmer 4, který pracuje na platformě Linux a je ovládán pomocí příkazového řádku. Tento program je schopen zpracovat velký objem dat v krátkém čase. Byl použit ke srovnání známých sekvencí bakteriocinů, které jsou popsány a uloženy v databázích se sekvencemi námi zkoumaného mikroorganismu (Mummer, online).

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Analýza genomu – identifikace

Pro analýzu genomu a identifikaci studovaného kmene byl použit nástroj BLAST. Tento program využívá algoritmus – tzv. alingment. Po nahrání souboru s kontigy analyzovaného genomu kmene *Pseudomonas fulva* 373 do programu, který pracuje online, proběhlo porovnání s genomy uloženými v databázích NCBI. Byly vyhledány mikroorganismy, které vykazují největší podobnost a zároveň byla při srovnávání genomů počítána statistická významnost shod. Grafické znázornění podobnosti genomů je zobrazeno na obrázku (Obr. 17).



Obr. 17. Výsledek po porovnání s databázemi NCBI programem BLAST.

*Vyobrazené pokrytí (Query) nahraných sekvencí se sekvencemi uvedenými v databázích. Červeně jsou zobrazeny výsledky se skóre alignmentu > 200 , které jsou nejspolehlivější.

Dalším výstupem, který nám poskytne program BLAST je tabulka, v níž jsou uvedeny základní statistiky párových porovnání s nahranou sekvencí. (Obr. 18) V tabulce je zobrazen název mikroorganismu (Description), dále pak hodnoty maximálního skóre (Max score) a celkového skóre (Total score). Kdy maximální skóre udává skóre alignmentu jednoho z úseků nalezené sekvence, který se povedlo ztotožnit s nahranou sekvencí. Hodnota

celkového skóre uvádí součet skóre všech nekontinuálních částí lokálních alignmentů mezi nahranou a nalezenou sekvencí. V případě, že nahraná a nalezená sekvence jsou totožné v celé délce, rovnají se i hodnoty maximálního a celkového skóre. Pokrytí (Query cover) vyjadřuje jaká část nahrané sekvence je porovnávána s nalezenou sekvencí. E-hodnota (E-value) udává, kolikrát je možné náhodně, v prohledávané databázi, očekávat sekvenci se stejným skóre alignmentu jako má nalezená sekvence vůči nahrané sekvenci. E-hodnota by měla být co nejmenší, ideálně nula. Shoda (Ident) značí, kolik procent stejných nukleotidových bází se nachází v nalezené sekvenci. V posledním sloupci je uveden přístup, což je odkaz na nalezenou sekvenci.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pseudomonas sp. URMO17WK12:i11 genome assembly YEL.embl.gz, chromosome : 1	2.418e+05	8.411e+05	99%	0.0	99%	LN865164.1
Pseudomonas parafulva strain PRS09-11288, complete genome	86597	6.608e+05	92%	0.0	94%	CP019952.1
Pseudomonas sp. FGI182, complete genome	12757	4.101e+05	82%	0.0	89%	CP007012.1
Pseudomonas putida HB3267, complete genome	12706	4.091e+05	83%	0.0	89%	CP003738.1
Pseudomonas monteilii SB3101, complete genome	12682	4.061e+05	83%	0.0	89%	CP006979.1
Pseudomonas monteilii SB3078, complete genome	12682	4.061e+05	83%	0.0	89%	CP006978.1
Pseudomonas plecoqlossicida strain NyZ12, complete genome	12680	4.055e+05	82%	0.0	89%	CP010359.1
Pseudomonas sp. DRA525 genome	12676	4.153e+05	82%	0.0	89%	CP018743.1
Pseudomonas putida strain DLL-E4, complete genome	12670	4.460e+05	83%	0.0	89%	CP007620.1
Pseudomonas putida S16, complete genome	12637	4.066e+05	83%	0.0	89%	CP002870.1
Pseudomonas putida strain AA7, complete genome	12429	3.866e+05	81%	0.0	89%	CP018846.1
Pseudomonas putida GlB gene, complete cds	5541	5541	0%	0.0	89%	AY885268.1
Pseudomonas putida S13.1.2, complete genome	12395	4.006e+05	82%	0.0	88%	CP010979.1
Pseudomonas sp. JY-Q, complete genome	12296	3.894e+05	81%	0.0	88%	CP011525.1
Pseudomonas putida B6-2, complete genome	12268	3.889e+05	81%	0.0	88%	CP015202.1
Gamma proteobacterium NT2-3 isolate NT2-2Contig2 genomic sequence	6017	7807	1%	0.0	88%	KU505136.1
Pseudomonas putida strain PP112420, complete genome	16367	4.012e+05	84%	0.0	87%	CP017073.1
Pseudomonas putida GB-1, complete genome	16362	4.012e+05	84%	0.0	87%	CP000926.1
Pseudomonas putida W619, complete genome	15837	3.560e+05	79%	0.0	87%	CP000949.1
Pseudomonas putida H8234, complete genome	13636	4.012e+05	84%	0.0	87%	CP005976.1

Obr. 18. Výstup z BLASTu, základní statistiky párových porovnání se zájmovou sekvencí.

Výsledkem provedené identifikace byla nalezená podobnost s genomem bakterií *Pseudomonas parafulva* a *Pseudomonas putida*. Tyto bakterie byly izolovány ze vzorků rýže. Studie genomu *Pseudomonas parafulva* byla provedena na China National Rice Research Institute v Číně a anotace byla uveřejněna v únoru 2017. Studie druhého velmi shodného genomu bakterie *Pseudomonas putida* proběhla na First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University v Číně a tento genom byl anotován v srpnu 2016. Jako první je v tabulce uveden genom vykazující shodu 99,99 %, který byl studován ve Švýcarsku a anotován byl v červnu 2015, avšak k tomuto genomu nejsou uvedeny podrobnější údaje.

Shoda s genomem *Pseudomonas fulva* nebyla prokázána, což může být způsobeno tím, že doposud byla v databázích NCBI uložena pouze jedna kompletní sekvenace genomu tohoto bakteriálního kmene. Podle současných nejnovějších postupů taxonomického zařazení, spadá kmen *Pseudomonas fulva* do skupiny *Pseudomonas putida* (Tab. 3). Nalezenou podobností, může být usuzováno na blízkou příbuznost těchto bakterií.

Identifikace, klasifikace a taxonomické zařazení mikroorganismu je nyní prováděno polyfázickým přístupem, kdy se fenotypové charakterizace mísí s genotypovými a fylogenetickými informacemi. To může vést někdy k nepřesnostem při identifikacích hůře charakterizovatelných mikroorganismů (Baltrus, 2016). Díky pokroku sekvenačních metod a také tomu, že se sekvenace genomu stává rutinním postupem je možné, že v budoucnu bude identifikace, klasifikace i taxonomické zařazení bakterií prováděno pouze na základě výsledků genetické analýzy (Pallen, 2016). Sekvenace prvního bakteriálního genomu byla zveřejněna v roce 1995, kdy Fleischmann a kolektiv publikovali sekvenaci kompletního genomu bakterie *Haemophilus influenzae* (Fleischmann a kol., 1995).

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) je součástí United States National Library of Medicine (NLM) a pobočkou National Institutes of Health (NIH). Spojuje v sobě databáze související s biotechnologickými a biomedicínskými obory. Hlavní databází je GenBank, která obsahuje informace o DNA sekvencích. Součástí je i sekce PubMed, která je databází biomedicínské literatury. Od roku 1992 jsou součástí NCBI také další databáze – např. Gene (kompletní informace o uložených genech), the Molecular Modeling Database (proteinové struktury 3D), dbSNP databáze single-nukleotidových polymorfismů) a další (NCBI, online).

NCBI obsahuje také softwarové nástroje, jako například BLAST, který umožňuje porovnání sekvenací s databází GenBank online. Díky těmto možnostem se s databáze NCBI stává univerzální nástroj, kterým lze zjistit zajímavé skutečnosti, které vyplívají ze sekvenovaných dat. První verze BLASTu byla autory představena v roce 1990. Tento nástroj představoval nový přístup k rychlému srovnání sekvenací (Altschul a kol., 1990).

V databázích NCBI se aktuálně nachází 170 kmenů pseudomonád s kompletní sekvenací genomu. Spolu s částečně zpracovanými sekvenacemi se v databázích nachází 3279 anotací, z čehož ve 29 případech byly anotovány sekvenace plazmidů. 4 anotace se týkají *Pseudomonas fulva*, kompletně zpracovaná sekvenace genomu této bakterie je v databázích pouze 1.

6.2 Inhibiční spektrum

Bylo testováno inhibiční spektrum kmene *Pseudomonas fulva* 373 vpichovým testem vůči 41 bakteriím z 13 rodů (*Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Moelleralla*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*). Bylo zjištěno, že inhibuje 11 citlivých kmenů patřících do 4 rodů. Čirá velmi slabá inhibiční zóna (-/+) okolo vpichu byla zjištěna u kmenů *Escherichia coli* (B1, B27, B36, B37, ϕ). Matná velmi slabá inhibiční zóna (-/+) okolo vpichu byla zjištěna u kmenů *Escherichia coli* (B7, B28) u kmenů *Acinetobacter lwoffii* (B30) a *Yersinia enterocolitica* (B85). Čirá slabá (+) inhibiční zóna byla zjištěna u kmenů *Escherichia coli* (Sabina40) a *Shigella sonnei* (17).

Osm citlivých kmenů patří do rodu *Escherichia*, který je zařazen do čeledi *Enterobacteriaceae*. Do stejné čeledi patří také další citlivé bakterie - *Yersinia enterocolitica* a *Shigella sonnei*. Čeď *Enterobacteriaceae* patří do řádu *Enterobacteriales*. Poslední kmen, u kterého byla prokázána citlivost - *Acinetobacter lwoffii*, spadá do čeledi *Moraxellaceae*. Tato čeď je součástí řádu *Pseudomonadales* (Tab. 9).

Tab. 9. Taxonomické zařazení testovaného kmene a produkčních kmenů.

	Citlivé kmeny		Testovaný kmen
Řád	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadales</i>
Čeď	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Pseudomonadeceae</i>
Rod	<i>Yersinia</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Escherichia</i>		
	<i>Shigella</i>		

Z tabulky taxonomického zařazení je patrné, že látky produkované testovaným kmenem *Pseudomonas fulva* 373 působí nejen na kmeny, které jsou blízce příbuzné. Dřívější teorie tvrdily, že pyociny, které produkují bakterie rodu *Pseudomonas*, inhibují pouze blízce příbuzné druhy bakterií (Cascales a kol., 2007). V poslední době se objevují studie, které popisují případy, kdy pyociny produkované *P. aeruginosa* působí na bakterie nepříbuzných rodů – příkladem citlivých bakterií vůči pyocinům *P. aeruginosa* jsou *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* a komplex bakterií *Burkholderia cepacia* (France a Remold, 2016). Výsledky potvrzují tento trend.

6.3 Analýza genomu – vyhledávání charakteristických sekvencí

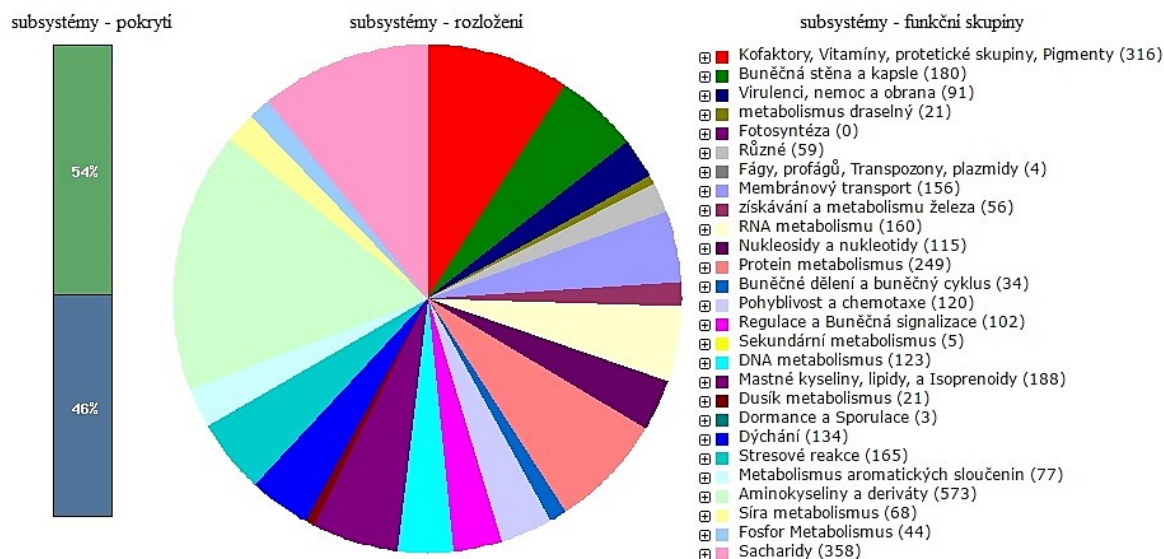
Vyhledávání charakteristických sekvencí a podrobná analýza genomu bakterie *Pseudomonas fulva* 373, byla provedena pomocí RASTu. Soubor kontigů byl nahrán do online nástroje RAST a následně byl zpracován v prostředí SEED-Viewer, které umožnilo porovnat námi zkoumaný genom s již anotovanými genomy. Výstupem ze základní analýzy programem RAST je přehledná charakteristika genomu, která je uvedena v tabulce (Tab. 10).

Tab. 10. Základní charakteristika genomu – RAST.

Kmen	<i>Pseudomonas fulva</i>
Doména (Domain)	Bacteria
Taxonomie (Taxonomy)	Bacteria
Velikost genomu (Size)	4752876 bp
Celkový počet kontigů (Number of Contigs)	195
Počet kódujících sekvencí (Number of Coding Sequences)	4254
Obsah GC párů (GC Content)	61,8 mol%

*Počet kódujících sekvencí: sekvence DNA, která obsahuje informace pro vytvoření proteinu. U bakterií *Pseudomonas fulva* se běžně pohybuje v rozmezí 4119-4459 genů kódujících protein (Peña a kol., 2016). Obsah GC párů: podíl guaninocytosinového komplementárního páru (GC). Obsah GC v DNA *Pseudomonád* se pohybuje v širokém rozpětí 58 – 69mol%, což je jeden z ukazatelů značné heterogenity rodu (Palleroni, 2005).

Prostředí SEED-Viewer je schopné vytvořit strukturu metabolismu a přiřadit nalezeným genům funkce. Na obrázku (Obr. 19) je vlevo zobrazen sloupcový graf, který znázorňuje procento genů, které jsou zařazeny do subsystémů. U studovaného genomu bylo 54 % genů zařazeno do subsystémů, oproti zbylým 46 %, které zařazeny nebyly. Koláčový graf uprostřed zobrazuje rozložení kategorií subsystémů v mikroorganismu. Vpravo od koláčového grafu je uveden seznam subsystémů.



Obr. 19. Grafické zobrazení subsystémů v programu SEED-Viewer.

V seznamu subsystémů je možné zobrazit i podkategorie jednotlivých subsystémů. Subsystémy pokrývají všechna odvětví buněčného života, včetně metabolických drah. Největší pozornost v této práci byla věnována subsystému pro virulenci, rezistenci a obranyschopnost, do kterého je zařazeno 91 genů (Tab. 11).

Tab. 11. Tabulka rozdělení subsystému virulence, rezistence a obranyschopnost.

Kategorie	Podkategorie	Počet genů
Bakteriociny a ribosomálně syntetizované antibakteriální peptidy	Tolerance ke kolicinu E2 (1)	11
	Colicin V a klast pro produkci bakteriocinů (10)	
Odolnost proti antibiotikům a toxickým látkám	Inhibitory lysozymů (1)	72
	Regulace metabolismu mědi (12)	
	Odolnost vůči kobaltu, zinku a kadmiu (12)	
	Rezistence k tripartitním systémům u gramnegativních bakterií (15)	
	Odolnost vůči fluorochinolonům (4)	
	Odolnost vůči arzenu (7)	
	Odolnost vůči mědi (3)	
	β-laktamázy (2)	
	Vícenásobná rezistence (12)	
	MexE-MexF-OprN víceúčelový efektový systém (4)	
Invazivita a intracelulární rezistence	Virulenční operon podílející se na transkripci DNA (2)	8
	Virulenční operon zapojený do biosyntézy chinolinátu (3)	
	Virulenční operon, podílející se na syntéze proteinů (LSU ribozomální proteiny) (3)	
Detekce	Tyto geny nejsou v genomu obsaženy	0
Bez zařazení		
Adheze		
Toxiny a superantigeny		

*Počet zařazených genů u jednotlivých podkategorií je uveden v závorkách.

Pomocí programu RAST bylo také analyzováno, které genomy mikroorganismů vykazují nejbližší genetickou příbuznost. Tyto mikroorganismy jsou uvedeny v tabulce na obrázku (Obr. 20). Z tabulky je patrné, že převládá podobnost s bakteriemi kmene *Pseudomonas putida*.

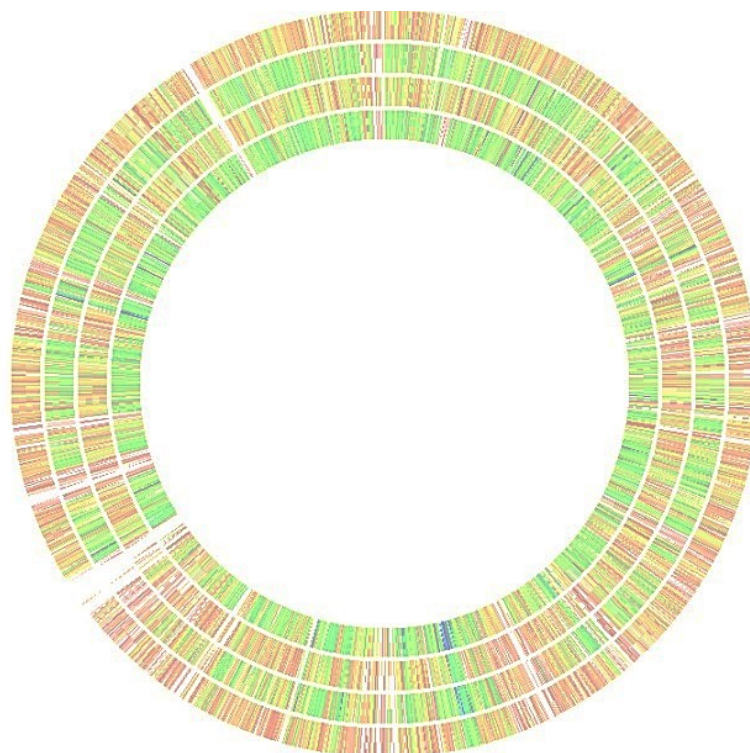
Genome ID ▲▼	Score ▲▼	Genome Name ▲▼
160488.1	513	Pseudomonas putida KT2440
160488.4	501	Pseudomonas putida KT2440
351746.4	500	Pseudomonas putida F1
1081940.5	495	Pseudomonas putida B6-2
76869.3	491	Pseudomonas putida GB-1
351746.6	483	Pseudomonas putida F1
76869.5	479	Pseudomonas putida GB-1
931281.3	461	Pseudomonas putida BIRD-1
390235.3	452	Pseudomonas putida W619
390235.5	436	Pseudomonas putida W619
384676.6	434	Pseudomonas entomophila L48
384676.9	417	Pseudomonas entomophila L48
1042876.5	402	Pseudomonas putida S16
1193146.3	381	Pseudomonas putida LS46
1193499.3	365	Pseudomonas putida SJTE-1
1215087.3	333	Pseudomonas putida S12
231023.4	328	Pseudomonas putida ND6
1005395.3	309	Pseudomonas putida CSV86
1215088.3	309	Pseudomonas putida HB3267
1196325.3	290	Pseudomonas putida DOT-T1E
1217722.3	235	Pseudomonas sp. S13.1.2
220664.3	201	Pseudomonas fluorescens Pf-5
264730.3	196	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A
220664.5	194	Pseudomonas fluorescens Pf-5
1163398.3	188	Pseudomonas sp. HYS
264730.9	184	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A
205922.3	179	Pseudomonas fluorescens Pf0-1
205918.4	172	Pseudomonas syringae pv. syringae B728a
205922.5	171	Pseudomonas fluorescens Pf0-1

Obr. 20. Tabulka nejbližších geneticky příbuzných mikroorganismů vygenerovaná v prostředí SEED-Viewer.

Genom zkoumané pseudomonády byl následně použit jako referenční pro porovnání se čtyřmi vybranými anotovanými genomy pseudomonád. Byly zvoleny genomy bakterií *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas putida*. Výsledky srovnání jsou vyobrazeny v kruhovém grafu (Obr. 21). Každý kruh představuje genom jednoho kmene a tyto genomy jsou řazeny od vnějšího kruhu směrem do středu. Shodnost genomů je znázorněna pomocí barevné škály, kdy místa vykazující největší podobnost jsou zobrazena modře až zeleně, místa s nižší podobností jsou zobrazena oranžově až červeně. Hodnocení dle barevné škály ukazuje nejvyšší míru podobnosti mezi genomy *Pseudomonas entomophila* a *Pseudomonas putida*. Bílá místa značí delece v porovnání s referenčním genomem.

Reference	Pseudomonas fulva (6666666.253191)
Comparison Organism 1	Pseudomonas aeruginosa PAO1 (208964.1)
Comparison Organism 2	Pseudomonas entomophila L48 (384676.6)
Comparison Organism 3	Pseudomonas fluorescens Pf-5 (220664.3)
Comparison Organism 4	Pseudomonas putida F1 (351746.4)

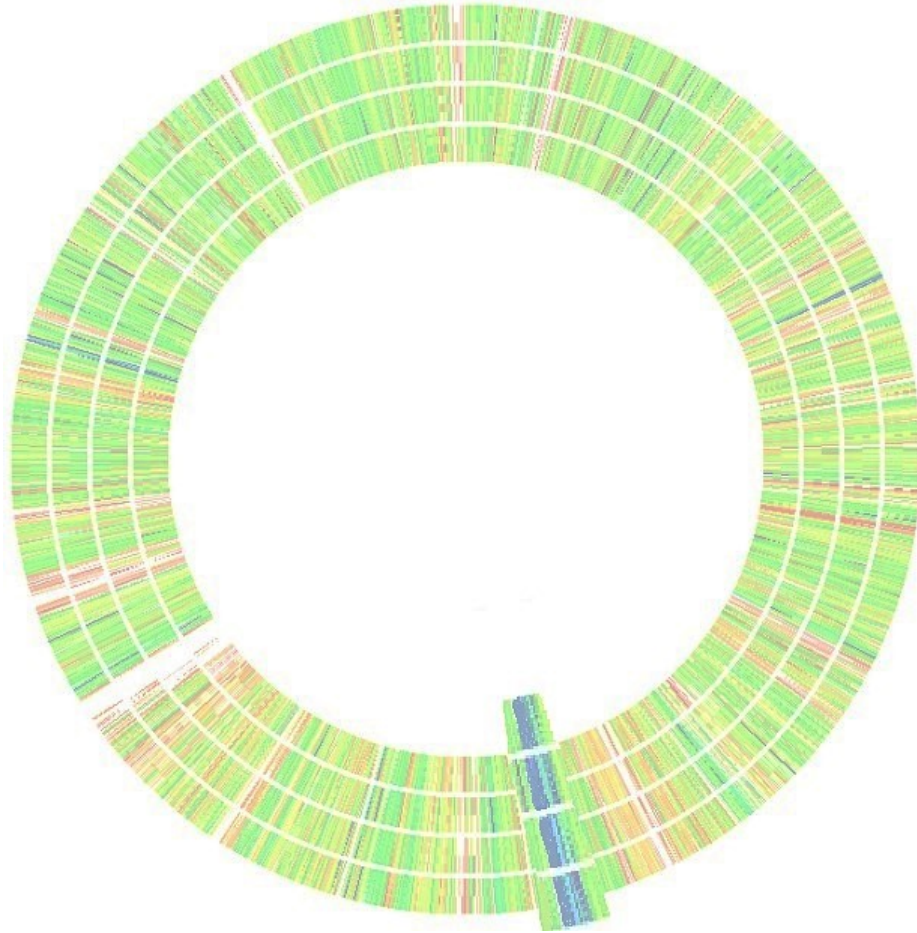
	Percent protein sequence identity															
	100	99.9	99.8	99.5	99	98	95	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Bidirectional best hit	100	99.9	99.8	99.5	99	98	95	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Unidirectional best hit	100	99.9	99.8	99.5	99	98	95	90	80	70	60	50	40	30	20	10



Obr. 21. Kruhový graf zobrazující srovnání podobnosti čtyř anotovaných genomů vybraných mikroorganismů s referenčním genomem námi zkoumané *Pseudomonas fulva*.

Při porovnání čtyř bakterií kmene *Pseudomonas putida* s referenčním genomem byly nalezeny části vykazující nejvyšší podobnost. Tyto části obsahují geny kódující ribozomální proteiny. Oblast vykazující největší shodnost je vyznačena na obrázku (Obr. 22). V databázi RASTu se aktuálně nenachází anotovaný genom bakterie *Pseudomonas fulva*, proto nebylo provedeno porovnání s tímto genomem a byly vybrány genomy bakterií, které vykazují blízkou příbuznost.

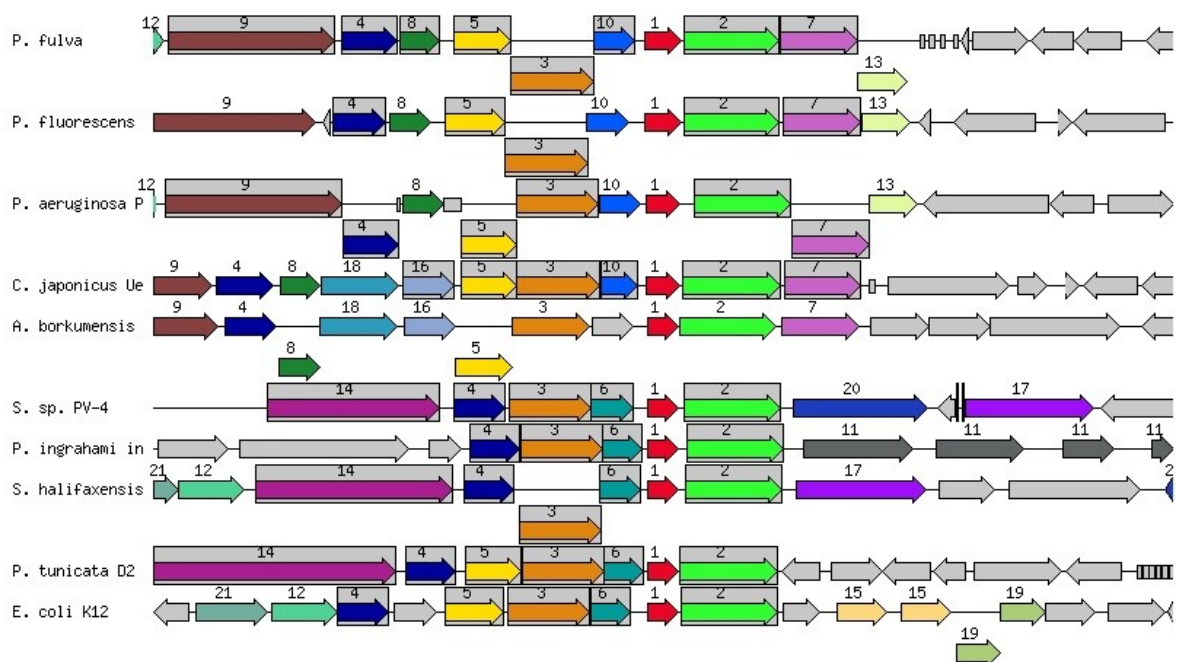
Reference	Pseudomonas fulva (6666666.253191)
Comparison Organism 1	Pseudomonas putida F1 (351746.4)
Comparison Organism 2	Pseudomonas putida GB-1 (76869.3)
Comparison Organism 3	Pseudomonas putida KT2440 (160488.1)
Comparison Organism 4	Pseudomonas putida W619 (390235.3)
	Percent protein sequence identity
Bidirectional best hit	100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10
Unidirectional best hit	100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10



Obr. 22. Kruhový graf zobrazující srovnání podobnosti čtyř anotovaných genomů vybraných bakterií *Pseudomonas putida* s referenčním genomem.

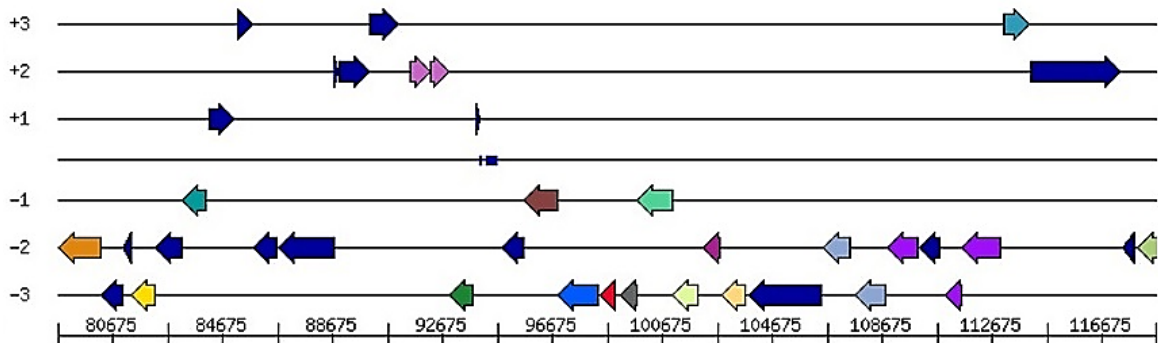
Dalším srovnávacím nástrojem je Compare Regions View, tedy nástroj, který umožňuje porovnat blízké okolí genu s uspořádáním genomů příbuzných mikroorganismů (Obr. 23). Geny mající stejnou funkci jsou zobrazeny stejnými barvami a označeny stejným číslem. Geny, jejichž relativní pozice je zachována nejméně u čtyř dalších organismů, jsou funkčně spojeny a mají šedé pozadí. Červenou šipkou je označen gen pro produkci proteinu kolicinu V⁽¹⁾ (➡). Tento gen je umístěn v těsné blízkosti čtyř genů, které jsou zařazeny

do jednoho klastru nazvaného „Colicin V and Bacteriocin Production Cluster“. Ke genům zařazeným do tohoto klastru patří gen kódující tvorbu enzymu amido-fosforibosyltransferázy (2), dále gen kódující DedD protein (10, 6), gen pro Acetyl-koenzym A beta-karboxytransferázu (5), pro syntézu enzymů dihydrofolátreduktázu a folylpolyglutamate syntázu (3) a gen kódující tRNA pseudouridin syntázu (4).



Obr. 23. Srovnání sad homologních genů u vybraných bakterií. Homologní oblasti jsou zobrazené stejnou barvou a číslem.

Prohlížeč Genom Browser umožňuje v prostředí SEED-Viewer zobrazit rysy genomu v jejich genomovém kontextu. Řádky (-3, -2, -1, 1, 2, 3) představují šest čtecích rámců. Na řádku bez označení jsou zobrazeny geny pro RNA (tRNA, rRNA nebo jiné genomové vlastnosti jako například vazebná místa). Šipky jsou odlišeny barvami, podle zařazení do subsystémů. Červenou šipkou je zobrazen gen pro produkci proteinu kolicinu V (Obr. 24).



Obr. 24. Zobrazení rysů genomu v jejich genomovém kontextu.

Sekvence genů pro pyociny je možné nalézt v databázích. K těmto databázím patří také BACTIBASE, Pseudomonas Genome Database (PSD) a již použité databáze NCBI (NCBI, online).

Bactibase je internetová databáze ve které jsou shromažďovány informace o bakteriocinech produkovanými grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. V databázi jsou uvedeny informace o aminokyselinové sekvenci, struktuře, fyzikálně-chemických vlastnostech bakteriocinů. Data o genech pro jednotlivé bakteriociny jsou uváděny bez širšího genetického pozadí (Hammami a kol., 2007). Je zde uloženo 229 bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi a pouze 19 bakteriocinů gramnegativních bakterií. Databáze je volně dostupná na <http://bactibase.pfba-lab-tun.org> (2016) V databázi jsou uloženy 2 pyociny – pyocin S1 a S2. Vzhledem k nedostatečnosti této databáze – nebyla použita pro analýzu. Pseudomonas Genome Database je databáze, ve které se nachází pravidelně aktualizované anotace o genomech pseudomonád. Je zde uloženo 184 kompletních anotací, avšak tato databáze neumožňuje nahrání a analýzu vlastních sekvenovaných dat, proto nebyla více využita (Winsor a kol., 2009).

Jako poslední byla provedena analýza pomocí programu MUMmer 4, byly srovnány známé sekvence bakteriocinů a colicinů se sekvenovaným genomem bakterie *Pseudomonas fulva* 373. Tento program byl ovládán příkazovým řádkem a pracoval v operačním systému Linux. Při analýze tímto programem nebyly nalezeny žádné zatím anotované bakteriociny, které by byly shodné s dodanými sekvenačními daty. Srovnáním s různými dostupnými databázemi anotovaných genomů nebyl prokázán výskyt genu, který je zodpovědný za produkci některého doposud popsáno pyocinu. Což může znamenat, že kmen *Pseudomonas fulva* 373 produkuje nový typ – dosud nepopsáno pyocinu.

Častým problémem v anotaci otevřených čtecích rámců (ORF z anglického „Open reading frame“) je v identifikaci genů, které jsou funkčně podobné, ale mají omezenou nebo žádnou sekvenční homologii. Tento problém se týká zejména bakteriocinů, které patří do velmi různorodé skupiny antimikrobiálních peptidů a jsou obvykle kódované malými ORF, jejichž okolí většinou tvoří biosyntetické geny (de Jong a kol., 2006). Což může být jedna z příčin, proč nebyla prokázána shoda s již anotovanými geny, odpovědnými za produkci bakteriocinů.

Možným řešením jak identifikovat pyocin, který nejspíš kmen *Pseudomonas fulva* 373 produkuje, je určení proteinového spektra studované bakterie, izolace proteinů za využití dělicích technik jako je SDS-PAGE, 2-D PAGE nebo nedenedaturující polyakrylamidová elektroforéza s následnou identifikací a charakterizací proteinů. V současné době lze využít několik různých technik. Jednou z nich je selektivní štěpení proteinů, které umožňuje vytvoření diagnostické mapy konkrétního proteinu. Další možnosti představují metody sekvenace aminokyselin v proteinech nebo rentgenová krystalografie pro určení trojrozměrné struktury proteinu (Alberts a kol, 2005).

ZÁVĚR

Rod *Pseudomonas* je velmi heterogenní rod, jehož klasifikace se neustále vyvíjí. Bakterie tohoto rodu jsou schopny produkovat inhibiční látky, které potlačují růst bakterií blízké příbuzných kmenů, ale byla prokázána také inhibice bakterií taxonomicky vzdálených rodů. Vpichový test pro učení inhibičního spektra prokázal inhibici hned několika různých druhů - *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia coli*, a *Yersinia enterocolitica*.

Díky rozvoji sekvenačních technik, rozvoji online genomových databází a různých bioinformačních nástrojů je možné celkem spolehlivě identifikovat mikroorganismus a provést genomovou analýzu. Pomocí nástroje BLAST byla provedena identifikace studovaného kmene *Pseudomonas fulva* 373. Výsledkem byla podobnost pouze s genomy bakterií *Pseudomonas parafulva* a *Pseudomonas putida*. Shoda s genomem *Pseudomonas fulva* nebyla prokázána, což může být způsobeno tím, že doposud byla v databázi NCBI uložena pouze jedna kompletní sekvence genomu této bakterie. Jelikož druh *Pseudomonas fulva* dle nejnovějších fylogenetických studií spadá do skupiny *Pseudomonas putida*, není tento výsledek překvapivý a ukazuje na jejich blízkou příbuznost.

Genom *Pseudomonas fulva* 373 byl dále analyzován sovnávacím algoritmem RAST v prostředí SEED-Viewer. Nejprve byl genom porovnán se 4 genomy bakterií rodu *Pseudomonas*. Byla prokázána vysoká shoda s genomem bakterie *Pseudomonas putida*. V databázi RASTu se aktuálně nenachází anotovaný genom bakterie *Pseudomonas fulva*, proto nebyl genom porovnán.

Srovnáním s databázemi anotovaných genomů v prostředí RAST nebyl prokázán výskyt genu, který je zodpovědný za produkci některého dosud popsaného pyocinu. Na druhou stranu za využití nástroje SEED-Viewer byl zjištěn a lokalizován gen pro kolicin V. Avšak není vyloučeno, že kmen *Pseudomonas fulva* 373 produkuje nový typ dosud nepopsaného pyocinu. Možným řešením jak identifikovat nový pyocin je určení proteinového spektra s následnou identifikací a charakterizací proteinů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALBERTS, B., a kol., 2005. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902-9062-0.

ALMUZARA, M. N., a kol., 2010. First Case of Human Infection Due to *Pseudomonas fulva*, an Environmental Bacterium Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**(2), 660-664. DOI: 10.1128/JCM.01849-09. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01849-09>

ALTSCHUL, S. F., a kol., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **215**(3), 403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. ISSN 00222836. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605803602>

ANSORGE, W. J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. **25**(4), 195-203.

AZIZ, R. K., a kol., 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* [online]. **9**(1), 75- [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-75>

BALTRUS, D. A., 2016. Divorcing Strain Classification from Species Names. *Trends in Microbiology*. **24**(6), 431-439. DOI: 10.1016/j.tim.2016.02.004. ISSN 0966842x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16000408>

BARRETEAU, H., TIOUAJNI, M., GRAILLE, M., JOSSEAUME, N., BOUHSS, A., PATIN, D., TOUZE, T., 2012. Functional and structural characterization of PaEM, a colicin M-like bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 287, 37395-37405.

BECKER, E. A., BURNS, C. M., LEON, E. J., RAJABOJAN, S., FRIEDMAN, R., FRIEDRICH, T. C., O'CONNOR, S. L., HUGHES, A. L., 2012. Experimental analysis of sources of error in evolutionary studies based on Roche/454 pyrosequencing of viral genomes. *Genome Biol. Evol.* **4**, 457-465.

BEDNÁŘ, M., SOUČEK, A., VÁVRA, J., 1994. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton. ISBN 80-901-5214-7.

BLACKWELL, C. C., LAW, J. A., 1981. Typing of non-serogroupable *Neisseria meningitidis* by means of sensitivity to R-type pyocines of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect*, **3**, 370–378.

BOSSIS, E., LEMANCEAU, P., LATOUR, X., GARDAN, L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, **20**, 51-63.

CAMPAGNARI, A. A., a kol., 1994. Use of pyocin to select a *Haemophilus ducreyi* variant defective in lipooligosaccharide biosynthesis. *Infect Immun* **62**, 2379–2386.

CASCALES, E., a kol., 2007. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **71**(1), 158-229. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06. ISSN 1092-2172. Dostupné také z: <http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00036-06>

CONNELLY, M. C., ALLEN, P. Z., 1983. Chemical and immunochemical studies on lipopolysaccharides from pyocin 103-sensitive and -resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Carbohydr Res* **120**, 171–186.

CROUCHER, N. J., FOOKES, M. C., PERKINS, T. T., TURNER, D. J., MARGUERAT, S. B., KEANE, T., QUAIL, M. A., HE M., ASSEFA, S., BÄHLER, J., KINGSLEY, R. A., PARKHILL, J., BENTLEY, S. D., DOUGAN, G., THOMSON, N. R., 2009. A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology. *Nucleic Acids Res*. **37**(22), 148.

DE JONG, A. a kol., 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Research*. **34**(Web Server), W273-W279. DOI: 10.1093/nar/gkl237. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl237>

DINGEMANS, J., GHEQUIRE, M. G. K., CRAGGS, M., DE MOT, R., CORNELIS, P., 2016. Identification and functional analysis of a bacteriocin, pyocin S6, with ribonuclease activity from a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolate. *Microbiologyopen*, **5**(3), 413-23.

ELLIOTT, R. P., 1958. Some properties of pyoverdine, the water-soluble fluorescent pigment of the pseudomonads. *Appl. Microbiol.*, **6** (4), 241-246.

FLEISCHMANN, R. D., a kol., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*., **269**(5223), 496-512.

FLUSBERG, B. A., a kol., 2010, Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature Methods*. **7**(6), 461-465. DOI: 10.1038/nmeth.1459. ISSN 1548-7091. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.1459>

FRANCE, M. T., REMOLD, S. K., 2016. Interference Competition Among Household Strains of *Pseudomonas*. *Microbial Ecology*. **72**(4), 821-830. DOI: 10.1007/s00248-015-0652-1. ISSN 0095-3628. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-015-0652-1>

FUCHS, R., SCHAFFER, M., GEOFFROY, V., MEYER, J., 2001. Siderotyping - A powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.*, **1**(1), 31-57.

GARRITY, G., BRENNER, D. J. a STALEY, J. R., 2005. *Bergey's Manual of systematic bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, 2nd ed. New York: Springer, ISBN 978-038-7280-226.

GERSHMAN, M. D., KENNEDY, D. J., NOBLE-WANG, J., KIM, C., GULLION, J., KACICA, M., JENSEN, B., PASCOE, N., SAIMAN, L., MCHALE, J., WILKINS, M., SCHOONMAKER-BOPP, D., CLAYTON, J., ARDUINO, M., SRINIVASAN, A., 2008. Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. *Clin. Infect. Dis.*, **47**(11), 1372-9.

GHEQUIRE, M. G. K. a DE MOT, R., 2015. The Tailocin Tale: Peeling off Phage Tails. *Trends in Microbiology*. **23**(10), 587-590. DOI: 10.1016/j.tim.2015.07.011. ISSN 0966842x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X15001742>

GHEQUIRE, M.G.K. a DE MOT, R. 2014. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*. **38**(4), 523-568. DOI: 10.1111/1574-6976.12079. ISSN 1574-6976. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12079>

GHEQUIRE, M.G.K., LORIS, R. a DE MOT, R., 2012. MMBL proteins: from lectin to bacteriocin. *Biochemical Society Transactions*. **40**(6), 1553-1559. DOI: 10.1042/BST20120170. ISSN 0300-5127. Dostupné také z: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST20120170>

GIBB, A. P., MARTIN, K. M., DAVIDSON, G. A., WALKER, B., MURPHY, W.G., 1995. Rate of growth of *Pseudomonas fluorescens* in donated blood. *Journal of Clinical Pathology*. **48**(8): 717–8.

GOVAN, J. R. W., 1974. Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: morphology and mode of action of contractile pyocins, *J. Gen. Microbiol.* 80, 1–15.

HAMMAMI, R., ZOUHIR, A., BEN HAMIDA, J., FLISS, I., 2007. BACTIBASE: a new webaccessible database for bacteriocin characterization. *MC Microbiology*. **7**(1), 89-. DOI: 10.1186/1471-2180-7-89. ISSN 1471-2180. Dostupné také z: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-7-89>.

HE, J. a kol., 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(8), 2530-5.

HEO, Y. J., CHUNG, I. Y., CHOI, K. B., CHO, Y. H., 2007. R-Type Pyocin is Required for Competitive Growth Advantage Between *Pseudomonas aeruginosa* Strains, *J Microbiol Biotechnol.*, **17**(1), 180-5

HOGUE, R., PELZER, A., ROSENAU, F., WILHELM, S., 2010. Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, **2**, 383-395

HOLT J. G., KRIEG N. R., SNEATH P. H. A., STALEY J. T., WILLIAMS S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore, Md. [u.a.]: Williams. ISBN 978-068-3006-032.

IGLEWSKI, B. H., 1996. *Pseudomonas*. In: *Medical Microbiology*, 4. ed. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN-10: 0-9631172-1-1, Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>

ISHII, S. I., NISHI, Y., EGAMI, F., 1965. The fine structure of a pyocin. *Journal of Molecular Biology*. **13**(2), 428-IN12. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80107-3. ISSN 00222836. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283665801073>.

JACOB, F., 1954. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea*, *Ann. Inst. Pasteur* **86**, 149–160.

JOSHI, A., GRINTER, R., JOSTS, L., CHEN, S., WOJDYLA, J. A., LOWE, E. D., KAMINSKA, R., SHARP, C., MCCAUGHEY, L., ROSZAK, A. W., COGDE, R. J., BYRON, O., WALKER, D., KLEANTHOS, C., 2015. Structures of the ultra-high-affinity protein-protein complexes of pyocins S2 and AP41 and their cognate immunity proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.*, **427**(17), 2852-66.

KAGEYAMA, M., 1964. Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties, *J. Biochem.*, Tokio, **55**(1), 49-53.

KAYSER F. H., BIENZ K. A., ECKERT J., ZINKERNAGEL R. M., 2006. *Color atlas of medical microbiology*. 2. ed., reprinted. Edinburgh [u.a.]: Mosby. ISBN 978-072-3433-552.

KIM, J. D., LEE, C.G., 2006. Influence of extracellular products from *Haematococcus pluvialis* on growth and bacteriocin production by three species of *Lactobacillus*. *J. Microbiol. Biotech.* **16**(6), 849-854.

KING, R. K., STANFIELD, W. D., MULLIGAN, P. K., 2006. *A dictionary of genetics*. 7th ed. New York: Oxford University Press. ISBN 978-019-5307-610.

KLOCKGETHER J., WÜRDEMANN D., WIEHLMANN L., BINNEWIES T., USSERY D. V., TÜMMLER B., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Frontiers in Microbiology*. **2**, -. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00150. ISSN 1664-302x. Také dostupné také z:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00150/abstract>.

KOSINA, M., BARTÁK, M., MAŠLANOVÁ, I., PASCUTTI, A. V., ŠEDO, O., LEXA, M., SEDLÁČEK, I., 2013. *Pseudomonas prosekii* sp. nov., a Novel Psychrotrophic Bacterium from Antarctica. *Current Microbiology*. **67**(6), 637-646. DOI: 10.1007/s00284-013-0406-6. ISSN 0343-8651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-013-0406-6>.

KOSINA, M., ŠVEC, P., ČERNOHLÁVKOVÁ, J., BARTÁK, M., OLEJNÍČKOVÁ, K., SEDLÁČEK, I., 2016. Description of *Pseudomonas gregormendelii* sp. nov., a Novel Psychrotrophic Bacterium from James Ross Island, Antarctica. *Current Microbiology*. **73**(1), 84-90. DOI: 10.1007/s00284-016-1029-5. ISSN 0343-8651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-016-1029-5>.

- KUNIN, V., ENGELBREKTSON, A., OCHMAN, H., HUGENHOLTZ, P., 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ. Microbiol.* **12**, 118–123.
- KURODA, K., KAGEYAMA, M., 1981 Comparative study of F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biochem.*, Tokio, **89**, 1721–1736.
- KURODA, K., KAGEYAMA, M., 1979. Biochemical properties of a new flexuous bacteriocin, pyocin F1, produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* **85** (1), 7-19.
- LEE, F. K., DUDAS, K. C., HANSON, J. A., NELSON, M. B., LOVERDE, P. T., APICELLA, M. A., 1999. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* C is a bacteriophage tail-like particle that contains single-stranded DNA. *Infect. Immun.*, **67**(2), 717-25.
- LEE, J. H., a kol., 2005. Identification of bacteriocin-producing *Lactobacillus paraplantarum* first isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 428-433.
- LEWIS SAUER, K., CAMPER, A., EHRLICH, G., COSTERTON, J., DAVIES, D., 2002. "*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm". *Journal of Bacteriology*. **184**(4), 1140-1154. DOI: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>.
- LI, H. a kol., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. **25**(16), 2078-2079. DOI: 0.1093/bioinformatics/btp352. ISSN 1367-4803. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp352>
- LI, H., RUAN, J., DURBIN, R., 2008. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res.* **18**, 1851–1858.
- LING, H., SAEIDI, N., RASOULIHA, B. H., CHANG, M. W., 2010. A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage. *FEBS Letters*. **584**(15), 3354-3358. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.06.021. ISSN 00145793. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2010.06.021>
- MADIGAN, M.T., BROCK, T. D., c2009. *Brock biology of microorganisms*. 12th ed. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings. ISBN 01-323-2460-1.

- MANRAO, E. A., a kol., 2012. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nature Biotechnology*. **30**(4), 349-353. DOI: 10.1038/nbt.2171. ISSN 1087-0156. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt.2171>
- MÁRA M., 1972. 2. vyd.: *Metabolismus bakteriální buňky*. In: Patočka F.: Lékařská mikrobiologie. 59–90. Avicenum. Praha.
- MARDIS, E. R., 2007. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. **24**, 133-141.
- MARDIS, E. R., 2013. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*. **6**, 287–303.
- MARGULIES, M., a kol., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380. DOI: 10.1038/nature03959. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature03959>.
- MAXAM, A. M., GILBERT, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 560–564.
- MCCAUGHEY, L. C., GRINTER, R., JOSTS, I., ROSZAK, A. W., WALOEN, K. I., COGDELL, R. J., MILNER, J., EVANS, T., KELLY, S., TUCKER, N. P., BYRON, O., SMITH, B., WALKER, D., 2014. Lectin-Like Bacteriocins from *Pseudomonas* spp. Utilise D-Rhamnose Containing Lipopolysaccharide as a Cellular Receptor. *PLoS Pathogens*. **10**(2), e1003898-. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003898. ISSN 1553-7374. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003898>.
- MCKERNAN, K. J. a kol., 2009. Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Research*. **19**(9), 1527-1541. DOI: 10.1101/gr.091868.109. ISSN 1088-9051. Dostupné také z: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.091868.109>
- METELEV, M., SEREBRYAKOVA, M., GHILAROV, D., ZHAO, Y. F., SEVERINOV, K., 2013. Structure of Microcin B-Like Compounds Produced by *Pseudomonas syringae* and Species Specificity of Their Antibacterial Action: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Journal of Bacteriology*. **195**(18), 4129-4137. DOI: 10.1128/JB.00665-13. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00665-13>.

MICHEL-BRIAND, Y., BAYSSE, CH., 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*. **84**(5-6), 499-510. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01422-0. ISSN 03009084. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402014220>

MILLER, J. R., SERGEY KOREN, S., A SUTTON, G., 2010. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*. **95**(6), 315-327. DOI: 10.1016/j.ygeno.2010.03.001. ISSN 08887543. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754310000492>

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

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A., 2009. *Medical microbiology*. 7th ed. St. Louis: Elsevier Mosby. ISBN 978-032-3091-244.

NAGARAJAN, N. a POP, M., 2009. Parametric Complexity of Sequence Assembly: Theory and Applications to Next Generation Sequencing. *Journal of Computational Biology*. **16**(7), 897-908. DOI: 10.1089/cmb.2009.0005. ISSN 1066-5277. Dostupné také z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/cmb.2009.0005>

NAKAYAMA, K., TAKASHIMA, K., ISHIHARA, H., SHINOMIYA, T., KAGEYAMA, M., KANAYA, S., OHNISHI, M., MURATA, T., MORI, H., HAYASHI, T., 2000. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.*, **38**(2), 213-31.

NOURIZAD, N., GHARIZADEH, B., NYRÉN, P., 2003. Method for clone checking. *ELECTROPHORESIS*. **24**(11), 1712-1715. DOI: 10.1002/elps.200305434. ISSN 01730835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200305434>.

OHSUMI, M., SHINOMIYA, T., KAGEYAMA, M., 1980. Comparative study on R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem*. **87**, 1119–1125.

OVERHAGE J., LEWENZA S., MARR A.K., HANCOCK R.E., 2006. Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J. Bacteriol.* **189**, 2164–2169.

ÖZEN, A. I., USSERY, D. W., 2012. Defining the *Pseudomonas* genus: Where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microb. Ecol.*, 63: 239-248.

OZER, E. A., ALLEN, J. P., HAUSER, A. R., 2014. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*. **15**(1), 737-. DOI: 10.1186/1471-2164-15-737. ISSN 1471-2164. Dostupné také: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-737>

PALLEN, M. J., 2016. Microbial bioinformatics 2020. *Microbial Biotechnology*. **9**(5), 681-686. DOI: 10.1111/1751-7915.12389. ISSN 17517915. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12389>

PALLERONI N. J., 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Stanley J. T. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Verlag. New York. **2**, 323-379.

PALLERONI N. J., STANIER R. Y., 1964. Regulatory Mechanisms Governing Synthesis of the Enzymes for Tryptophan Oxidation by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of General Microbiology*. **35**(2), 319-334. DOI: 10.1099/00221287-35-2-319. ISSN 0022-1287. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-35-2-319>.

PALLERONI, N. J., KRIEG N. R., HOLT J. G. a kol., 1984. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, Volume 1, 140-168,

PARRET A.H., TEMMERMAN K., DE MOT, R., 2005. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Sep. **71**(9), 5197-207.

PEÑA, A., a kol., 2016. High quality draft genome sequences of *Pseudomonas fulva* DSM 17717T, *Pseudomonas parafulva* DSM 17004T and *Pseudomonas cremoricolorata* DSM 17059T type strains. *Standards in Genomic Sciences*. **11**(1), -. DOI: 10.1186/s40793-016-0178-2. ISSN 1944-3277. Dostupné také z: <http://standardsingenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40793-016-0178-2>

PETTERSSON, E., LUNDEBERG, J., AHMADIAN, A., 2009. Generations of sequencing technologies. *Genomics* **93**, 105-111.

PHILLIPS, J. N., a kol., 1990. Structural models for the cell surface lipooligosaccharides of *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. *Biomed Environ Mass Spectrom* **19**, 731-745.

- POSPÍŠILOVÁ, Š., TICHÝ, B. A MAYER, J., 2009. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy?. *Časopis lékařů českých*. **148**, 296
- PROBER, J. M., TRAINOR, G. L., DAM, R. J., HOBBS, F. W., ROBERTSON, C. W., ZAGURSKY, R. J., COCUZZA, A. J., JENSEN, M. A., BAUMEISTER, K., 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**, 336-341.
- REBOLLEDO, P. A. a kol., 2014. Polymicrobial Ventriculitis Involving *Pseudomonas fulva*. *Journal of Clinical Microbiology*. **52**(6), 2239-2241. DOI: 10.1128/JCM.03545-13. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.03545-13>
- RILEY, M. A., WERTZ, J. E., 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 117- 137.
- RONAGHI, M., 2000. Improved Performance of Pyrosequencing Using Single-Stranded DNA-binding Protein. *Analytical Biochemistry*. **286**, 282-288.
- RUMBAUGH, K. P., GRISWOLD, J. A., HAMOOD, A. N., 2000. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.*, **2**, 1721-1731.
- SALMELA, L., 2010. Correction of sequencing errors in a mixed set of reads. *Bioinformatics* **26**, 1284–1290.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**, 5463-5467.
- SEDLÁČEK, I., 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno, Masarykova univerzita. ISBN 80-210-4207-9.
- SEGERS P., VANCANNEYT M., POT B., TORCK U., HOSTE B., DEWETTINCK D., FALSEN E., KERSTERS K., DE VOS P., 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 499-510.
- SEO, Y., GALLOWAY, D. R., 1990. Purification of the pyocin S2 complex from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Analysis of DNase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 455-461

- SHKUNDINA, I., SEREBRYAKOVA, M., SEVERINOV, K., 2014. The C-terminal part of microcin B is crucial for DNA gyrase inhibition and antibiotic uptake by sensitive cells. *J. Bacteriol.*, **196**, 1759-1767.
- SCHADT, E. E., TURNER, S. a KASARSKIS, A., 2010. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*. **19**(R2), R227-R240. DOI: 10.1093/hmg/ddq416. ISSN 0964-6906. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddq416>
- SMITH, A. W., HIRST, P. H., HUGHES, K., GENSBERG, K., GOVAN, J. R., 1992. The pyocin Sa receptor of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with ferripyoverdin uptake, *J. Bacteriol.* **174**, 4847–4849.
- STANIER R. Y., PALLERONI N. J., DOUDOROFF M., 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159–271.
- STAPPER, A. P., NARASIMHAN, G., OHMAN, D. E., BARAKAT, J., HENTZER, M., MOLIN, S., KHARAZMI, A., HOIBY, N., MATHEE, K., 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J. Med. Microbiol.*, **53**, 679-690.
- STOVER, C. K., PHAM, X. Q., ERWIN, A. L., MIZOGUCHI, S. D., WARRENER, P., HICKEY, M. J. a kol., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen, *Nature*, **406**, 959–964.
- SUN, Y. a XI, Y., 2014. Human Leucocyte Antigen Matching Strategy. *HLA and Associated Important Diseases*. InTech. DOI: 10.5772/57500. ISBN 978-953-51-1230-3. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/hla-and-associated-important-diseases/human-leucocyte-antigen-matching-strategy>
- ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno, Masarykova univerzita, ISBN 80-210-3841-1.
- TAKEDA, Y., KAGEYAMA, M., 1975. Subunit arrangement in the extended sheath of pyocin R, *J. Biochem.*, Tokio, **77**, 679–684.
- TAKEYA, K., MINAMISHIMA, Y., AMAKO, K., OHNISHI, Y., 1967. A small rod-shaped pyocin, *Virology*, **31**, 166–168.
- URATANI, Y., HOSHINO, T., 1984. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *J. Bacteriol.*, **157**, 632-636.

VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vydání. Brno: Neptun. ISBN-13: 80-86850-00-5.

WALKER, S. T., 1998. *Microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders company. ISBN 13: 9780721646411

WHEELER, D. A., a kol., 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Nature*. **452**(7189), 872-876. DOI: 10.1038/nature06884. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature06884>.

WINSOR, G. L., VAN ROSSUM, T., LO, R., KHAIRA, B., WHITESIDE, M. D., HANCOCK, R. E., BRINKMAN, F. S. (2009). *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D483-D488.

XIONG, J., 2006. *Essential bioinformatics*. New York: Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-60082-8.

Elektronické zdroje:

ATDBIO [online] [cit. 2017-02-01]

Dostupné z: <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>

BACTERIO.NET [online] [cit. 2017-03-12]

Dostupné z: <http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>

BLAST [online] [cit. 2017-03-27]

Dostupné z: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>

BIO [online] [cit. 2017-03-14]

Dostupné z: <http://www.bio.davidson.edu>

BIOINFORMATICS [online] [cit. 2017-03-01]

Dostupné z: <http://www.bioinformatics.nl/webportal/background/images/dideoxyNTP.png>

ETZLER, M. E. a MOHNEN, D., 2009. [online] Viridiplantae. In: *Essentials of glycobiology* (2th Ed.). New York: Cold Spring Harbor. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1924/> [cit. 2017-03-08]

EUZÉBY, J. P. a PARTE, A. C. (2016). LPSN [online] List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Dostupné na <http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>. [cit. 2017-03-04].

IDTDNA [online] [cit. 2017-03-12]

Dostupné z: <https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/dna-sequencing.pdf?sfvrsn=5>

ILLUMINA [online] [cit. 2017-02-20]

Dostupné z: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>

MOHAMMED, A., (2014). Bacterial toxins. Jean Gariépy Research Laboratory. [online] [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://www.jeangariepy.com/toxin.html>

MUMMER [online]. [cit. 2017-04-27]

Dostupné z: <http://mummer.sourceforge.net/>

NATIONALDIAGNOSTICS [online]. [cit. 2017-02-16]

Dostupné z: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/maxam-gilbert-sequencing>

NCBI [online] [cit. 2017-03-02]

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/150>

OMICSONLINE [online] [cit. 2017-03-27]

Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/articles-images/JCSB2.74Figure1.html>

TODAR K. (2008): Todar's Online Textbook of Bacteriology, [cit. 2017-03-20]

Dostupné z: www.textbookofbacteriology.net

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A/C/G/T	Adenin/cytosin/guanin/ thymin
APS	Adenosin-5´-fosfosulfát
ATP	Adenosintrifosfát
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
bp	Jednotka délky nukleové kyseliny udaná v počtu párů bází (pair base)
CCD	Kamera (z angl. the charge-coupled device)
cl	Represor
CMLB	Colicin M-like bakteriociny
ColM	Colicin M
kb	Jednotka 1000 (kilo) párů bází
ddATP	Dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	Dideoxycytidintrifosfát
ddGTP	Dideoxyguanosintrifosfát
ddNTP	Dideoxynukleosidtrifosfát
ddTTP	Dideoxythymidintrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
dNTPs	Deoxynukleotidy dNTPs
dsDNA	dvouvláknová DNA (z angl. double strand DNA)
emPCR	Emulzní polymerazové řetězové reakce
FptA	Ferripyochelinový receptor
FpvA	Ferripyoverdinové receptory
GE	Gelová elektroforéza
kDa	Atomová hmotnostní jednotka, 1000 (kilo) Daltonů

MBLB	Microcin B-like bakteriocin
mcbG	Gen zodpovědný za produkci imunitního preteinu
MMBL	Monocot mannose-binding lectins
mol/l	Mol na litr – jednotka molární koncentrace
MPA	Maospeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujon
NLM	United States National Library of Medicine
NaCl	Chlorid sodný
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NGS	Metody nové generace sekvenování (z angl. next-generation sequencing)
NLM	National Library of Medicine
ORF	Otevřený čtecí rámeček
Ppi	Pyrofosfátu
PrtN	Transkripční regulátor
PrtR	Transkripční regulátor
PTP	Čip PicoTiterPlate™
RAST	Rapid Anotace using Subsystem Technology
rDNA	Ribozomální DNA
<i>recA</i>	Protein nezbytný pro opravy DNA
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální RNA
ssDNA	Jednovláknová DNA
TGS	Třetí generace sekvenování (z angl. third generation sequencing)
TOMM	Thiazol/oxazol modifikované mikrocin
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
UV	Ultrafialové záření

λ Lambda (písmeno řecké abecedy)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Pangenom a základní genom dvanácti kmenů <i>P. aeruginosa</i> (Ozer a kol., 2014)	18
Obr. 2. Dendrogram kmenů <i>P. aeruginosa</i> (NCBI, online).	19
Obr. 3. (A) Struktura R-pyocinu v kontrahované (I.) a relaxované (II.) konformaci. (B) Horní pohled v příčném řezu zobrazující hexamerní disk (Ghequire a De Mot, 2015).	24
Obr. 4. Schématické znázornění R- a F- typů pyocinů (Michel-Briand a Baysse, 2002).	26
Obr. 5. Vliv UV záření, proteázy a tepla na aktivitu pyocinu s lektinovou doménou (Parret a kol., 2005).	29
Obr. 6. Schematické zobrazení homologních genových klastrů zodpovědných za produkci MBLB u <i>E. coli</i> a <i>P. syringae</i> (Metelev a kol., 2013).	30
Obr. 7. Schématické zobrazení štěpení DNA (Šmarda a kol., 2005).	33
Obr. 8. Schematické znázornění výsledného záznamu Maxam-Gilbertova sekvenování (NationalDiagnostics, online).	34
Obr. 9. Rozdíl mezi dNTPs a ddNTPs (Bioinformatics, online).	35
Obr. 10. Schematické znázornění manuálního provedení Sangerovy metody sekvenování s využitím radioaktivně značených primerů (Atdbio, online).	36
Obr. 11. Schematické znázornění automatizovaného provedení Sangerovy metody s využitím fluorescenčně značených ddNTPs (Atdbio, online).	37
Obr. 12. Schématické znázornění biochemických reakcí, které následují po začlenění dNTP do řetězce DNA při pyrosekvenování (Sun a Xi, 2014).	40
Obr. 13. Schématické znázornění průběhu sekvenace technikou 454/Roche (Ansorge, 2009).	42
Obr. 14. Příprava DNA knihovny (Ansorge, 2009).	43
Obr. 15. Proces amplifikace fragmentů z DNA knihovny (Ansorge, 2009)	44
Obr. 16. Sekvenace v Illumina Genome Analyzeru (Ansorge, 2009)	45
Obr. 17. Výsledek po porovnání s databází NCBI programem BLAST (autor)....	59
Obr. 18. Výstup z BLASTu, základní statistiky párových porovnání se zájmovou sekvencí (autor)	60
Obr. 19. Grafické zobrazení subsystémů v programu SEED-Viewer (autor)	64

- Obr. 20. Tabulka nejbližších geneticky příbuzných mikroorganismů vygenerovaná v prostředí SEED-Viewer (autor).....66
- Obr. 21. Kruhový graf zobrazující srovnání podobnosti čtyř anotovaných genomů vybraných mikroorganismů s referenčním genomem námi zkoumané *Pseudomonas fulva* (autor).....67
- Obr. 22. Kruhový graf zobrazující srovnání podobnosti čtyř anotovaných genomů vybraných bakterií *Pseudomonas putida* s referenčním genomem (autor)68
- Obr. 23. Srovnání sad homologních genů u vybraných bakterií. Homologní oblasti jsou zobrazené stejnou barvou a číslem (autor)69
- Obr. 24. Zobrazení rysů genomu v jejich genomovém kontextu (autor).....70

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Rozlišující vlastnosti rodů dříve považovaných za pseudomonády (Sedláček, 2007).....	12
Tab. 2. Přehled zařazení hlavních zástupců do skupin podle podobnosti r-RNA (Palleroni a kol., 1984).....	14
Tab. 3. Rozdělení zástupců rodu pseudomonas do skupin (NCBI, online).....	15
Tab. 4. Chemikálie používané při Maxam-Gilbertově metodě a jejich bázová specifita (Šmarda a kol., 2005).....	32
Tab. 5. Seznam použitých indikátorových gramnegativních kmenů izolovaných z chlazené drůbeže na FT UTB ve Zlíně (autor).....	52
Tab. 6. Seznam použitých indikátorových gramnegativních kmenů izolovaných z bažantů na FT UTB ve Zlíně (autor).....	53
Tab. 7. Seznam použitých indikátorových sbírkových kmenů. Z Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity (autor).....	54
Tab. 8. Složení použitých kultivačních médií (autor).....	56
Tab. 9. Taxonomické zařazení testovaného kmene a produkčních kmenů (autor).....	62
Tab. 10. Základní charakteristika genomu – RAST (autor).....	63
Tab. 11. Tabulka rozdělení subsystému virulence, rezistence a obranyschopnost (autor).....	65