



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Detekce železem indukovaných proteinů a jejich vlivu na produkci
antracyklinů v submerzní kultuře *Streptomyces coeruleorubidus*

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Karel Beneš, Ph.D.

Autor: Zuzana Michalcová

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 23.4.2021

.....

Zuzana Michalcová

ABSTRAKT

V rámci této bakalářské práce byly analyzovány proteiny ze skupiny enzymů – esteráz a jejich možná indukce po přidání železa do kultivačního media. Dále byl hodnocen vliv přídavku Fe^{2+} kationtů na produkci daunomycinu v submerzní kultuře *Streptomyces coeruleorubidus*. Práce je rozdělena na dvě části. V první části byl představen rod aktinobakterií *Streptomyces*, jejich výskyt, vlastnosti a možný přínos díky produkci sekundárních metabolitů. Ve druhé, experimentální části, byl popsán použitý kmen *Streptomyces coeruleorubidus*. Vliv přídavku železa byl hodnocen pomocí HPLC analýzy a nativní polyakrylamidové elektroforézy (nativní PAGE).

Pomocí analýzy HPLC bylo zjištěno, že přidání železa ve formě FeSO_4 do media zvyšuje produkci daunomycinu, a to přibližně 21,5x. Při nativní PAGE byly po obarvení gelu zjištěny proteiny (esterázy), nejspíše ze skupin α a β esteráz, které byly kmenem *Streptomyces coeruleorubidus* produkovány navíc či ve větší míře, pokud medium obsahovalo železo.

Klíčová slova: *Streptomyces*, sekundární metabolity, antracykliny, PAGE, proteiny, esterázy

ABSTRACT

In this bachelor's thesis, proteins from the group of enzymes – esterases and their possible induction after the addition of iron to the culture medium were analyzed. Furthermore, the effect of the addition of Fe^{2+} cations on daunomycin production under submersion cultivation conditions of *Streptomyces coeruleorubidus* culture was evaluated. The work is divided into two parts. The first part introduced the genus actinobacteria called *Streptomyces*, their occurrence, properties and possible benefits due to the production of secondary metabolites. In the second, experimental part, the use of the *Streptomyces coeruleorubidus* strain was described. The effect of iron addition was evaluated by HPLC analysis and native polyacrylamide electrophoresis (native PAGE).

HPLC analysis showed that the addition of iron in the form of FeSO_4 to the medium increased daunomycin production by approximately 21.5-fold. During native PAGE and after staining, proteins, i.e. esterases, most likely from the groups of α and

β esterases, were detected. Those were more or to a greater extent produced by the *Streptomyces coeruleorubidus* if the medium contained iron.

Key words: *Streptomyces*, secondary metabolites, anthracyclines, PAGE, proteins, esterases

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Karlu Benešovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při osobních konzultacích.

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární rešerše	7
2.1	Bakterie rodu <i>Streptomyces</i>	7
2.1.1	Sekundární metabolity	9
2.1.2	Antracykliny	11
2.2	Enzymy produkované bakteriemi rodu <i>Streptomyces</i>	12
2.3	Úloha železa v sekundárním metabolismu bakterií r. <i>Streptomyces</i> a jeho vliv na produkci antracyklinů.....	13
2.4	Úloha železa v syntéze proteinů bakterií r. <i>Streptomyces</i>	14
3	Cíl práce	16
4	Metodika	17
4.1	Popis kmene <i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	17
4.2	Příprava kultivačních medií	Chyba! Záložka není definována.
4.2.1	Inokulace, kultivace vegetativního media	21
4.2.2	Inokulace, kultivace produkčního media.....	22
4.3	HPLC analýza.....	22
4.4	Analýza proteinů	23
4.4.1	Vertikální polyakrylamidová elektroforéza	23
4.4.2	Příprava polyakrylamidového gelu	24
4.4.3	Příprava vzorků, nanesení vzorků, vlastní elektroforéza	26
4.4.4	Barvení, odbarvení gelu.....	27
5	Výsledky a diskuse	28
5.1	Produkce sekundárních metabolitů (daunomycinu) v různých kultivačních mediích	28
5.2	Detekce proteinů indukovaných železem dodaným do kultivačního media	31
6	Závěr.....	33

7	Seznam citované literatury	34
8	Seznam obrázků	40
9	Seznam tabulek	41

1 Úvod

Bakterie rodu *Streptomyces* se v současné době těší poměrně velkému zájmu, a to především díky jejich schopnosti produkovat širokou škálu sekundárních metabolitů. Těmi jsou antifungální a antibakteriální látky. Ty přinášejí jisté výhody přímo jejich producentům, hlavně při soupeření o stanoviště. A zároveň, co je z pohledu člověka velmi důležité, se uplatňují ve farmaceutickém průmyslu, a to ve formě antibiotik, imunosupresiv či při léčbě nádorových onemocnění. Pozornost se pak věnuje hlavně produkci antracyklinů – antibiotik, která bakterie rodu *Streptomyces* přirozeně produkují, a která se řadí mezi nejúčinnější chemoterapeutika při léčbě rakoviny.

Společnost v současné době čelí několika náročným výzvám, které spolu úzce souvisí. Jednou z nich je zvyšující se průměrný věk populace a kvalita života, druhou zvýšený výskyt civilizačních chorob a nádorových onemocnění. Cílem výzkumů by mělo být jednak objevování nových účinných látek, ale i optimalizace stávajících a používaných postupů. To by mělo vést ke snížení nežádoucích účinků, například snížení negativního působení antracyklinových antibiotik na srdeční tkáň pacienta.

Cílem této bakalářské práce je zjistit, zda přítomnost železa v submerzní kultuře bakterií rodu *Streptomyces* může podpořit produkci daunomycinu a zda dochází k syntéze proteinů právě za přítomnosti železa v kultivačním mediu.

2 Literární rešerše

2.1 Bakterie rodu *Streptomyces*

Poprvé byl rod *Streptomyces* představen Waksmanem a Henrici v roce 1943. *Streptomyces* je největší rod Aktinobakterií (Hong et al., 2009). Bylo popsáno více než 500 druhů bakterií rodu *Streptomyces*. Obecně se vyznačují podobnými fyziologickými a morfologickými vlastnostmi, chemickým složením buněčné stěny, typem peptidoglykanu, fosfolipidů, řetězci mastných kyselin, procentuálním obsahem GC (guanino-cytosinový komplementární pár), 16 SrRNA analýzou a hybridizací DNA – DNA (Korn-Wendish a Kutzner, 1992).

Streptomyceta jsou aerobní, chemoorganotrofní, vláknité, gram-pozitivní bakterie. Potřebují k životu organický uhlík, anorganický dusík, minerální soli, nepotřebují však vitamíny ani růstové faktory (Lee a Demain, 1997). Většina jsou mezofilní, rostou při teplotách 15-37 °C a v pH 6,5-8. Jsou odolnější vůči suchu, vyžadují méně vlhkosti než jiné bakterie (Subbarao, 1999).

Svou strukturou jsou velmi podobné houbám. Vlákna a výtrusy jsou velmi malé, obvykle 1 µm nebo i méně (Willemse et al., 2011). Výtrusy jsou tvořeny fragmentací vláken, tvoří síť, tzv. mycelium. Kolonie jsou pomalu rostoucí. Díky produkci těkavého metabolitu geosminu mají často půdní zápach (Jüttner a Watson, 2007).

Na počátku růstu jsou kolonie hladké, až později se objevuje vzdušné mycelium, které může být vločkovité, práškovité, granulované či sametové (Ambarwati et al., 2012). Produkují širokou škálu pigmentů, které jsou odpovědné za zbarvení vegetativních a vzdušných mycelií (Flärdh a Buttner, 2009).

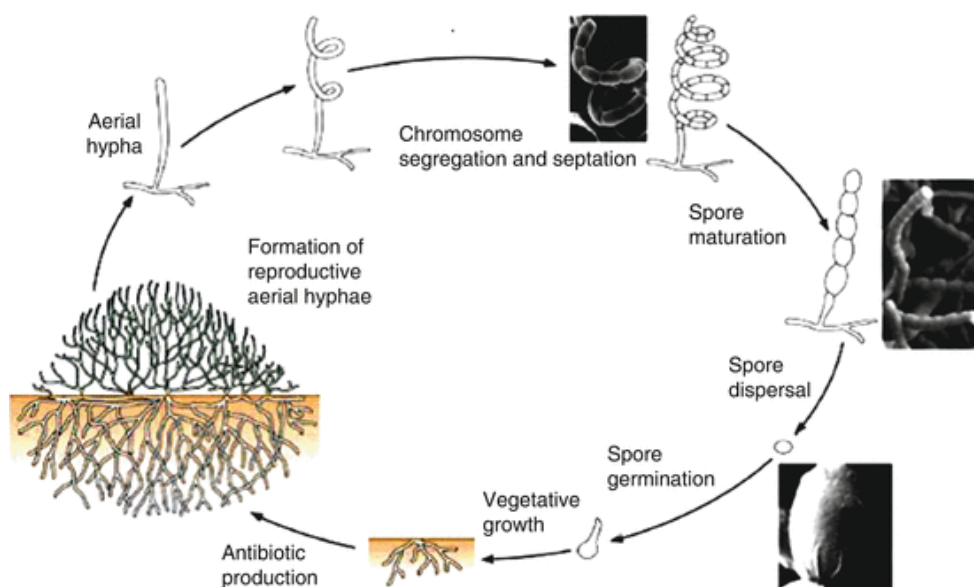
Streptomyceta jsou nepohyblivá, pozitivní na katalázu, redukují dusičnany na dusitany, rozkládají adenin, esculin, casein, gelatin, hypoxantin, škrob a L-tyrosin (Smaoui et al., 2011). Peptidoglykan buněčné stěny obsahuje z velké části L-diaminopimelovou kyselinu (L-DAP).

Nemají žádné mykolové kyseliny, obsahují množství nasycených iso- a anteiso-mastných kyselin, mají buď hexa- nebo okta -hydrogenované menachinony s devíti izoprenovými jednotkami. Mají komplexní polární lipidy, které obvykle obsahují difosfatidyl glycerol, fosfatidylethanolamin, fosfatidilinositol a jeho monosidy (Cummins a Harris, 1958).

Metabolická rozmanitost Streptomycet tkví především v tom, že mají extrémně velký genom se stovkami transkripčních faktorů řídících genovou expresi. To jim umožňuje reagovat na dané potřeby.

Streptomyceta se podobají houbám nejen vzhledem, ale i jejich životním cyklem. Ten začíná, když se spory usadí na bohaté médium. To stimuluje existenci spor v klidovém stavu, začíná klíčení a tvoří se zárodky.

Ve vegetativním stádiu růstu buňky nepodstupují binární štěpení. Prodlužují se a větví, čímž vzniká síť vláken, které rostou na povrchu a uvnitř média. Tato síť se nazývá substrátové mycelium (Flärdh a Buttner, 2009). Jak kolonie dále roste, mycelium uprostřed se začíná odlišovat. Výsledkem diference je vznik vzdušných hyf.



Obrázek 2.1.1 Životní cyklus bakterií rodu *Streptomyces* (Mohammadipanah a Dehhaghi, 2017)

Streptomyceta jsou v přírodě rozšířena, a to především v půdě, kde tvoří asi 40 % všech půdních bakterií. Jejich populace v ekosystému je dána řadou chemických, fyzikálních a biologických faktorů. Především záleží na půdní vodě a živinách v půdě, na půdním pH, vlhkosti, slanosti, na struktuře půdy a na podnebí (Locci, 1989).

I když je půda jejich nejdůležitější stanoviště, jsou i další, kterými jsou:

- seno a jiný organický materiál – zde mají důležitou úlohu při rozkladu organické hmoty, kde rozkládají obtížně rozložitelné látky, jako například celulózu a chitin, dále se podílejí na tvorbě humusu a produkují velké množství antibiotik (Kalhotka a Tesařová, 2014),

-
- sladké a slané vody,
 - rostliny – zde hrají malou roli jako rostlinné patogeny, například *Streptomyces scabies*, *Streptomyces aureofaciens* mohou způsobovat hnilobu půdy, strupovitost (Fatope et al., 2000). Na druhé straně některé druhy *Streptomyces* lze efektivně využít jako biologickou kontrolu (Rugthaworn, 2007),
 - lidé a zvířata – některé kmeny *Streptomyces* mohou způsobovat infekce, včetně kontaminace ran a tvorby abscesů – bakterie prorůstá do podkožní tkáně, tvoří se léze (Seipke et al., 2012), Streptomyceta jsou také považována za respirační alergeny u lidí.

2.1.1 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou složité chemické sloučeniny neboli produkty, které mají jistý význam pouze pro svého producenta. Nejsou pro organismus esenciální, ale umožňují mu druhové interakce a poskytují konkurenční výhodu nebo ochranu před nepříznivými životními podmínkami (Keulen a Dyson, 2014). Sekundární metabolity jako produkty jsou chemicky velmi rozmanité, což je způsobeno především přítomností různých metabolických drah, tzv. intermediátů, které vedou k syntéze sekundárních metabolitů. Soubor biochemických drah, které vedou k jejich vzniku se souhrnně nazývá sekundární metabolismus (Bibb, 2005). Tyto metabolické dráhy umožňují vytvořit velmi chemicky rozmanité látky, které z primárního metabolismu neznáme. Existuje několik metabolických drah vedoucích k syntéze sekundárních metabolitů – peptidová, polyketidová syntáza (PKS), dráha nonribozomální polypeptidové syntázy (NRPS), hybridní (nonribozomální polyketidová syntáza), dráha shikimate, syntéza β -laktamu a dráha sacharidů. Geny kódující tyto syntetické dráhy jsou obecně přítomny v chromozomální DNA a jsou často uspořádány do shluků (Harir, 2018).

Od primárního se sekundární metabolismus liší:

- je postradatelný, není spojen s růstem
- je aktivní pouze v určité fázi životního cyklu a závisí na podmínkách prostředí, jako je například složení kultivačního media

Z pohledu důležitosti se většinou sekundární metabolity považují za méně důležité. Avšak význam pro svého producenta mají jistě velký a mohou přinášet i jisté výhody. Důkazem toho může být schopnost zvyšovat růst, reprodukci organismu. Nebo mohou být účinnými chemickými zbraněmi proti predátorům a kompetitorům, tedy zvyšují naději producenta na přežití (Masák, 2014). Většina sekundárních metabolitů se projevuje jako chemické signály, které třeba u *Streptomyces* koordinují tvorbu spor. Také produkce antibiotik, toxinů nebo pigmentů, jako produktů sekundárního metabolismu, hraje významnou roli v životním cyklu mikroorganismů. Mikroorganismy produkují sekundární metabolity ve stacionární fázi a ve fázi zpoždění jejich růstu, avšak aktinomyceta, zvláště rod *Streptomyces*, může sekundární metabolity produkovat v exponenciální, stacionární i smrtící fázi růstu (Zitouni, 2005).

Ve vztahu k člověku hrají sekundární metabolity velmi významnou roli, jejich využití je široké. Především pak bakteriím rodu *Streptomyces* se dostává pozornosti. Od objevení streptomycinu v roce 1943 následovaly objevy mnoha dalších antibiotik, která jsou hojně farmaceuticky využívána (Katz a Baltz, 2016). Nejčastěji se využívají při léčbě nemocí, které způsobují mikrobiální patogeny. Například využití tetracyklinových antibiotik.

Sekundární metabolity *Streptomyces* našly uplatnění také při léčbě nádorových onemocnění. Často bývají součástí chemoterapií. Například daunorubicin, antibiotikum ze skupiny antracyklinů, je běžně užíván při léčbě některých forem akutní leukémie (Fassas a Anagnostopoulos, 2005). Další metabolity s protinádorovou aktivitou jsou například aktinomycin, aktinomycin D, staurosporin a další. Nežádoucím účinkem při nedodržení dávkování těchto léčiv je však silná toxicita pro ostatní buňky těla.

Dále třeba rapamycin nebo takrolimus, které mohou být nápomocné při potlačování imunitního systému člověka, který je po transplantaci orgánu. Předepisují se samostatně, v kombinaci obou anebo s dalšími imunosupresivy, především s jim příbuzným cyklosporinem (McAlister et al., 2000).

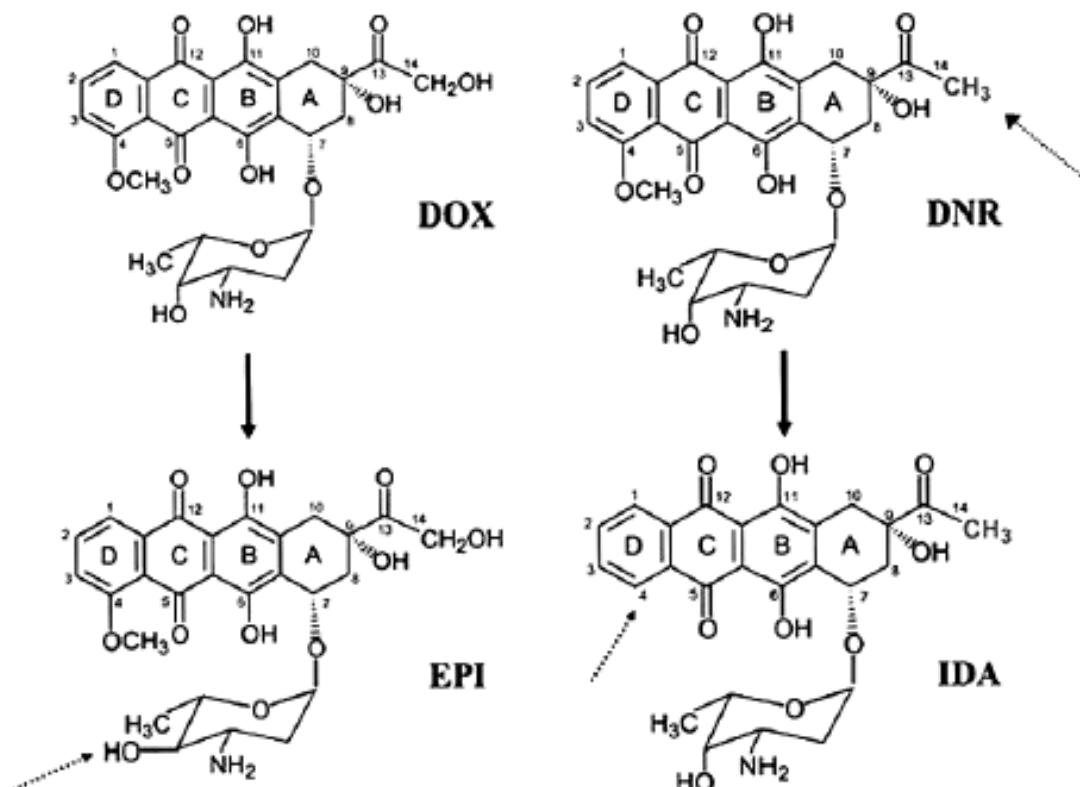
2.1.2 Antracykliny

Antracykliny jsou skupinou protinádorových antibiotik, která se získávají z bakterií rodu *Streptomyces*. I když jsou antracyklinová antibiotika známá už od počátku 50. let (Brockmann a Bauer, 1950), počátek většího zájmu o ně sahá až do objevení daunomycinu (Dubost et al., 1963; DiMarco et al., 1964). Jak je zmíněno výše, užívají se k léčbě různých nádorových onemocnění. Principem jejich účinku je snížení aktivity enzymu topoizomerázy, to způsobí zástavu replikace a dělení buněk (Puma et al., 2008). Mohou působit též interkalačně, tedy tak, že způsobí změny DNA, váže se na oba řetězce současně, což brání dělení buněk a blokuje tvorbu bílkovin.

Antibiotika se podávají pouze intravenózně, jsou metabolizována játry a vylučována žlučí a částečně močí (Puma et al., 2008). Antracyklinová antibiotika mají však i značné nevýhody. Jednou z nich je toxický účinek na srdeční sval, tzv. kardiotoxicita, což může být často limitujícím faktorem v užívání těchto antibiotik. Musí být brát ohled především na věk pacienta, genetické dispozice, již existující rizikové faktory (hypertenze), další terapie (ozařování) (Puchnerová et al., 2016).

Poněkud úspěšného snižování kardiotoxicity následkem užívání antracyklinových antibiotik se dosahuje podáním tzv. lipozomálního antracyklinu. Tedy molekuly léčiva jsou uzavřeny v uměle vytvořeném lipozomálním obalu, který zajišťuje delší poločas léku v krvi, dále umožňuje proniknutí molekuly antracyklinu skrze propustnější kapiláry nádoru, kde léčivá látka zůstane v extracelulární tekutině, a naopak snižuje průnik molekul léku skrze srdeční buňky (Sieswerda et al., 2011).

Mezi nejznámější antracykliny patří doxorubicin, izolovaný ve druhé polovině 20. století z bakterie *Streptomyces peuceuti*. Dále daunorubicin, epirubicin, idarubicin a další.



Obrázek 2.1.2.1 Chemická struktura antracyklinů: DOX-doxorubicin, DNR-daunorubicin, EPI-epirubicin, IDA-idarubicin (Shevchuk O., 2012)

2.2 Enzymy produkované bakteriemi rodu *Streptomyces*

Bakterie rodu *Streptomyces* vynikají nejen schopností produkovat antibiotika, ale také produkcí řady významných enzymů (Sathya a Ushadevi, 2014). Jejich potenciál produkovat velké množství extracelulárních enzymů byl však do značné míry opomíjen (Morosoli et al., 1997). Tyto enzymy jsou ve své podstatě bílkoviny, které hrají významnou roli jako metabolické katalyzátory. Ty díky absenci vnější membrány uvolňují ihned do kultivačního media (Hamed et al., 2018), čímž je také značně usnadněna jejich izolace. Enzymy produkované *Streptomyces* jsou uvedeny v tabulce 2.2.1.

Enzym	funkce
Amylázy	štěpí škrob na jednodušší cukry
Proteázy	patří mezi hydrolázy, štěpí bílkoviny hydrolýzou peptidické vazby
Lipázy a esterázy	skupina enzymů, které katalyzují hydrolýzu esterových vazeb v triacylglyceridech na glycerol a mastné kyseliny (Sharma et al., 2001)
Želatináza	získala si pozornost při vývoji léků, díky prospektivní funkci při degradaci pojivové tkáně spojené s metastázami tumoru (Stevenson et al., 1993)

Tabulka 2.2.1 Enzymy produkované bakteriemi r. *Streptomyces* a jejich funkce (autor)

2.3 Úloha železa v sekundárním metabolismu bakterií r. *Streptomyces* a jeho vliv na produkci antracyklinů

Železo je známé jako „klíčový“ kov pro produkci sekundárních metabolitů v bakteriích, včetně aktinomycet. Působí jako kofaktor mnoha enzymů (Andrews et al., 2003). U *Streptomyces spp.* je železo požadavkem na syntézu antibiotik aktinomycinu, neomycinu, streptomycinu, chloramfenikolu a dalších (Weinberg, 1970). To znamená, že přítomnost železa v definovaném mediu na začátku kultivace může mít zásadní význam pro optimální produkci antibiotik (Pan et al., 1975). V minulosti bylo provedeno mnoho studií o požadavcích bakterií na kovy jako je železo (Fe), hořčík (Mg), zinek (Zn), měď (Cu), mangan (Mn).

Například dle výsledků studie, které uvádí Majumdar a Majumdar (1965), kde se hodnotil efekt přidání prvků Fe, Cu, Mn a Zn do kultivačního media *Streptomyces fradiae* a produkci neomycinu. Zatímco Mn a Cu nemají žádný vliv na produkci neomycinu, přídavek Fe byl úspěšnější. Při koncentraci 10 µg/ml media byla produkce 3.den kultivace 8 µg/ml a 5.den se produkce neomycinu téměř zdvojnásobila na 14,9 µg/ml. Další studie prováděná na kmeni *Streptomyces coelicolor* ukázala, že železo ovlivňuje expresi vývojových genů a jeho nedostatek vedl ke zhoršení diferenciaci a snížení produkce sekundárních metabolitů (Tierrafría et al., 2011). U *Streptomyces hygroscopicus* byla produkce rapamycinu podpořena přítomností Fe o koncentraci vyšší, než je nutná pro růst (Cheng et al., 1995).

Železo jako prvek však není pro mikroorganismy v nekyselém aerobním prostředí snadno dostupný (Crichton, 2001). Na straně jedné je Fe³⁺ nerozpustný a na straně druhé je Fe²⁺ toxický pro bakteriální buňky. V důsledku toho je příjem železa regulován transkripční regulací (Andrews et al., 2003). U několika bakterií, také u rodu *Streptomyces*, se asimilace železa provádí pomocí molekul chelatujících železo, které se nazývají siderofory, což jsou velké proteinové molekuly, které jsou schopné extrahovat železo jednoduše a rovnovážným posunem (Wandersman a Delepelaire, 2004).

Streptomyceta jsou známá pro svou schopnost produkovat širokou škálu sideroforů (Barona-Gomez et al., 2004), které často obsahují hydroxamáty a ketocheláty (Wang et al., 2014). Při nedostatku železa v mediu je produkce a/nebo absorpce sideroforů snížena nebo dokonce zrušena, což vede v důsledku ke zhoršené diferenciaci, a tedy ke snížené produkci sekundárních metabolitů (Yamanaka et al.,

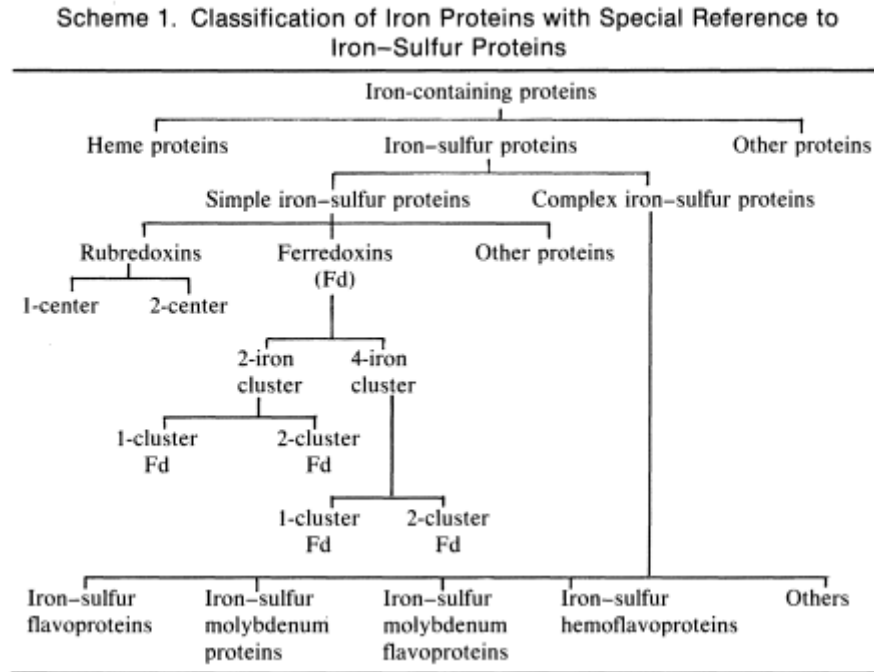
2005). Z toho vyplývá, že siderofory hrají důležitou roli v růstu bakterií a jejich biosyntéza je tedy závislá na dostupnosti železa v mediu.

2.4 Úloha železa v syntéze proteinů bakterií r. *Streptomyces*

Železo je základní živina, která je vyžadována pro mnoho klíčových metabolických procesů v mikroorganismech, jako je transport elektronů, metabolismus energie a syntéza DNA (Hantke, 2001). Vazba a transport železa pomocí sideroforů hraje důležitou roli v dostupnosti železa v buňce (Crosa, 1997). Koncentrace volného železa v buňkách však musí být přísně regulována. U G- bakterií je metabolismus železa řízen globálním regulačním proteinem Fur (Escolar et al., 1999), u G+ bakterií, kterými jsou i bakterie rodu *Streptomyces*, je metabolismus železa regulován hlavně skupinou regulačních proteinů DmdR, které jsou závislé na dvojmocných kovech, u *Streptomyces spp.* jsou to proteiny DmdR1 a DmdR2 (Flores et al., 2005). Po interakci s Fe²⁺ nebo i jinými dvojmocnými kovy působí tyto proteiny jako transkripční regulátory, obvykle jako represory genů, které se podílí na metabolismu železa. V některých případech mohou tyto regulátory železa fungovat také jako transkripční aktivátory (Rodriguez a Smith, 2003).

Pro příklad *Streptomyces coelicolor*, jedna z nejznámějších aktinomycet (ale i další *Streptomyces spp.*) je schopna syntetizovat několik typů sekundárních metabolitů, obsahuje dvě kopie genu pro regulaci železa, a to DmdR1 a Dmdr2. Narušení DmdR1 mělo za následek významné změny v proteomu *Streptomyces coelicolor*, a to zejména v enzymech souvisejících právě s metabolismem železa (Flores et al., 2005).

Existuje velké množství proteinů, jejichž hlavní funkcí je přenos elektronů mezi metabolickými enzymech. Mnoho těchto proteinů využívá právě železo jako protetickou skupinu v přenosu elektronů. Tyto proteiny mohou být rozděleny do skupin – hemové a nehemové typy (Lovenberg, 1973). Mezi tzv. nehemové typy patří také Fe-S klastry, shluky, které se vyskytují téměř ve všech živých organismech, v bakteriích nevyjímaje. Jedná se o jedny z nejstarších a nejvšestranějších anorganických kofaktorů. Jsou tvořeny ionty železa, buď ve formě Fe²⁺ nebo Fe³⁺ a anorganickým sulfidem (Beinert, 2000).



Obrázek 2.4.1 Klasifikace proteinů obsahujících železo (Bezkorovainy, A., 1980)

Právě do skupiny Fe-S klastru patří i proteiny Wbl, které se vyskytují výhradně u aktinomycet, včetně rodu *Streptomyces*, kde hrají klíčovou roli při sporulaci (Molle et al., 2000), při regulaci produkce antibiotik a rezistenci (Morris et al., 2005).

3 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je detekovat proteiny, které jsou indukovány přidáním železa ve formě FeSO_4 do kultivačního media a vliv železa na produkci antracyklinů v submerzní kultuře *Streptomyces coeruleorubidus*.

Hlavní cíle:

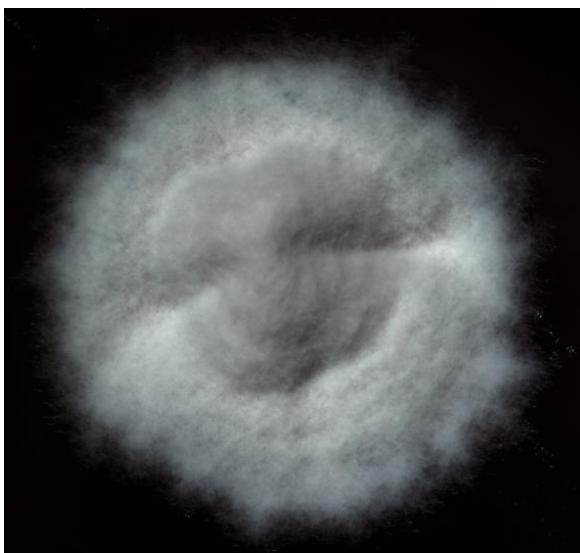
- hodnocení vlivu přídavku železa do kultivačního media na produkci antracyklinů
- detekce proteinů indukovaných přidáním železa do kultivačního media

4 Metodika

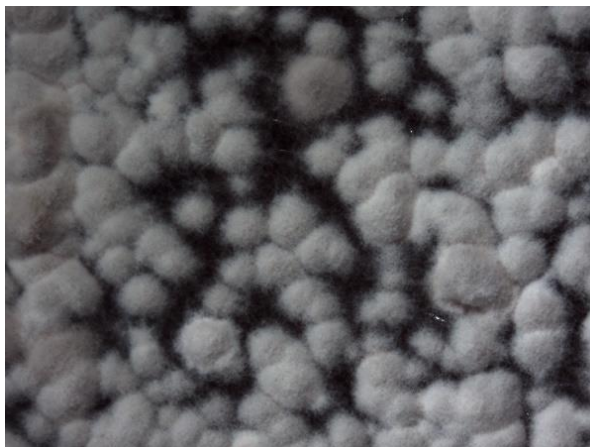
4.1 Popis kmene *Streptomyces coeruleorubidus*

Streptomyces coeruleorubidus je vláknitá, gram pozitivní, aerobní bakterie z rodu *Streptomyces*, která byla původně izolována z mořského sedimentu (Pridham et al., 1958). Tak jako ostatní bakterie rodu *Streptomyces* připomíná svou strukturou houby. Tvoří vzdušné i substrátové mycelium. Substrátové hyfy jsou rozvětvené, ale nenesou žádné spory, vzdušné mycelium v dospělosti tvoří spirálový typ sporových řetězců (Siva Kumar et al., 2012).

Při kultivaci kmene, použitého pro praktickou část bakalářské práce, na PDA (Potato Dextrose Agar, VWR) s pH 5,6 v termostatu při 28 °C byly tvořeny kolonie, které měly bílé až světle šedé vzdušné mycelium, při kultivaci déle než 14 dní až tmavě šedé. Zbarvení substrátového mycelia se liší dle délky kultivace. Po třech dnech je lehce žluté, po pěti dnech oranžové, po sedmi dnech červené.



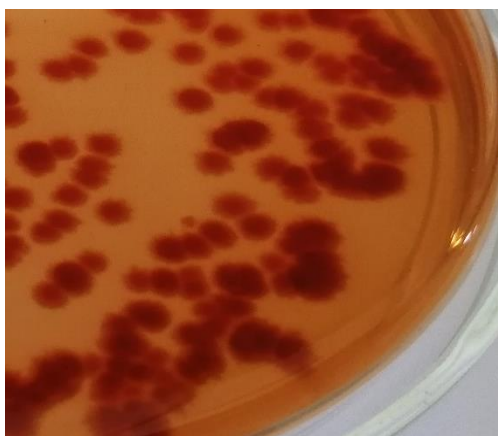
Obrázek 4.1.1 *Streptomyces coeruleorubidus* (autor)



Obrázek 4.1.2 *Streptomyces coeruleorubidus*, kolonie na PDA (autor)



Obrázek 4.1.3 *Streptomyces coeruleorubidus*, vzdušné mycelium (autor)



Obrázek 4.1.4 *Streptomyces coeruleorubidus*, zbarvení agaru po 7 dnech kultivace (autor)

Jako i jiné kmeny bakterií z rodu *Streptomyces*, tak i *Streptomyces coeruleorubidus* produkuje sekundární metabolity, kterými jsou antracyklinová a antrachinonová antibiotika, účinná proti Gram+ bakteriím a nádorovým onemocněním, jakými jsou daunomycin, duborimycin, rubomycin M, baumycin A1 (Pridham et al., 1958). V současné době existuje mnoho dříve či nově izolovaných mutantních kmenů *Streptomyces coeruleorubidus*, které také produkují antracykliny, mohou se však lišit barvou vzdušného či substrátového mycelia. Pro příklad *Streptomyces coeruleorubidus* NRRL 18370 produkující pacidamyciny (Fronko et al., 2000) nebo *Streptomyces coeruleorubidus* ME130-A4 produkující antracyklinové feudomyciny A a B (Oki et al., 1981).

Streptomyces coeruleorubidus produkuje také enzym, kterým je složená $\alpha + \beta$ hydroláza. $\alpha + \beta$ hydroláza je nadčeď hydrolytických enzymů, které mají široce odlišný fylogenetický původ a katalytické funkce. Jádrem každého enzymu je alfa/beta

list, obsahující 8 beta řetězců spojených šesti helixy (Ollis et al., 1992). $\alpha + \beta$ hydroláza obsahuje proteázy, lipázy, peroxidázy, esterázy, epoxidové hydrolázy a dehalogenázy (Nardini a Dijkstra, 1999).

Kmen *Streptomyces coeruleorubidus* obsahuje také několik regulátorů, které jsou závislé na přítomnosti intra nebo extracelulárního železa, jako je IdeR, DtxR či IRPs (promotory) a také shluky Fe-S proteinů. Kromě těchto regulátorů obsahuje tento kmen s největší pravděpodobností také proteiny Wbl, které také patří do Fe-S klastrů. Jsou popsány například u *Streptomyces venezueale* či *Streptomyces coelicolor* (Stewart et al., 2020).

Bohužel u kmene *Streptomyces coeruleorubidus* prozatím proteiny Wbl nebyly oficiálně uvedeny, však tento kmen je morfologicky i kultivačními podmínkami velmi podobný právě kmenu *Streptomyces coelicolor*, proto lze předpokládat, že i zde tyto proteiny mají tutéž funkci, možná jen na jiném C-konci.

Následující pasáž „Příprava kultivačních medií“ o rozsahu 1 strana je vypuštěna z důvodu budoucího podání patentové přihlášky a je obsažena pouze v plné verzi práce, která je uložena na Zemědělské fakultě JU.

4.1.1 Inokulace, kultivace vegetativního media

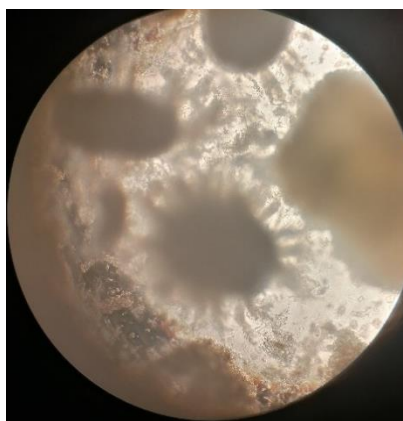
Vegetativní medium bylo inokulováno z pevného media.



Obrázek 4.1.5.1 Narostlé kolonie použité pro inokulaci do VM (autor)

Biomasa byla odebrána sterilně, očkovací kličkou do homogonizátoru (Potter-Elvehjem) se 3 ml fyziologického roztoku a byla zhomogenizována. Poté bylo nainokulováno 2,5 ml tohoto homogenizátu do VM pomocí pipety.

Vegetativní medium bylo kultivováno v orbitální třepačce s RPM 220, výkyvem 30 mm, při 30 °C po dobu 38 – 42 hodin. Po 38 hodinách bylo sterilně odebráno 10 μ l na sklíčko pod mikroskop, pro kontrolu ideální fáze růstu pro inokulaci produkčního media.



Obrázek 4.1.1.6 Připraveno pro inokulaci do PM, foto z mikroskopu (autor)

4.1.2 Inokulace, kultivace produkčního media

Produkční medium bylo sterilně inokulováno 2,5 ml vegetativního media. Bylo kultivováno v orbitální třepačce s RPM 220, výkyvem 30 mm, při 30 °C po dobu 7 dní.

Po sedmi dnech byly z produkčních medií nesterilně odebrány 2 ml, které byly použity na přípravu vzorků pro elektroforézu a zvláště 1 ml, který byl extrahován pro kapalinovou chromatografii – HPLC.

4.2 HPLC analýza

Z 1 ml vzorku, který byl promíchán na vortexu, bylo odebráno 400 µl do čisté jedno mililitrové uzavíratelné zkumavky, bylo přidáno 180 µl 1M kyseliny šřavelové, promícháno na vortexu. Poté bylo přidáno 1,2 ml acetonu, promícháno na vortexu a přidáno 300 µl destilované vody. Opět promícháno na vortexu a stočeno v centrifuze při 14 000 g po dobu 5 minut. Poté bylo odebráno 400 µl supernatantu do skleněné vialky a měřeno na kapalinovém chromatografu.

Stroj	Shimadzu Nexera
Kolona	C18 150x4,6 mm, 5 µm DP
Mobilní fáze	MP A – H ₃ PO ₄ pH 2,7 + SDS 1 g/l MP B – Acetonitril poměr A:B = 50:50
Vlnová délka	254 nm
Detektor	UV/VIS
Průtok	1 ml/min
Celkový čas analýzy	25 minut
Retenční čas	7 minut
Velikost nápichu	10 µl
Podmínky se během analýzy nemění – izokratická reakce	

Tabulka 4.3.1 Podmínky HPLC analýzy (autor)

Výsledkem byla odečtená plocha peaku, která byla pomocí vzorce

$$\frac{\text{plocha čistého media} \cdot 0,1}{\text{plocha standardu}} \quad [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$$

Rovnice 4.2.1

kde plocha čistého media byla vypočtena ze vzorce

$$\frac{\text{plocha peaku vzorku} \cdot 2,08}{0,4}$$

Rovnice 4.2.2

a plocha standardu je 2 531 584, přepočtena na jednotky mg/l, tedy produkci daunomycinu v miligramech na jeden litr vzorku. Odpovídá koncentraci daunomycinu na úrovni 100 mg/l.

4.3 Analýza proteinů

4.3.1 Vertikální polyakrylamidová elektroforéza

Elektroforéza patří do skupiny elektromigračních separačních metod. Principem je migrace elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto pole se vytváří vložím stejnosměrného napětí mezi elektrody (Klouda, 1996).

Rychlost pohybu částic je přímo úměrná aplikovanému napětí a náboji částic a nepřímo úměrná velikosti částic. Důležitou roli hraje také velikost gelových pórů, tedy jak hustý gel je. Čím hustší gel, tím více působí jako molekulární síto a molekuly se oddělují hlavně podle své velikosti. Elektroforézou lze oddělit malé kationty a anionty, organické kyseliny, amino kyseliny, peptidy, lipidy, sacharidy, proteiny, nukleotidy, nukleové kyseliny, dokonce i subcelulární částice či celé buňky. V praxi se však jedná především o separaci proteinů a nukleových kyselin (Pláteník, 2008).

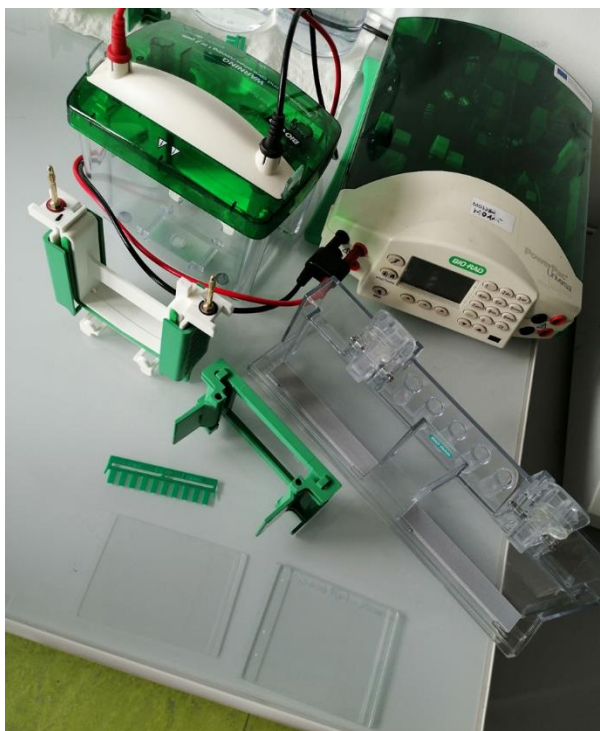
Rozlišují se dva typy PAGE. První je SDS PAGE, kde polyakrylamidový gel i pufr obsahují SDS (dodecylsulfát sodný), který je schopen denaturovat bílkoviny. V důsledku toho gelem migrují proteiny a oddělují se přesně podle velikosti polypeptidu a pro detekci je tedy postačující pouze malé množství proteinu.

Druhým typem je nativní PAGE, která byla použita v experimentální části této práce. Tento gel ani pufr neobsahují žádné detergenty. Na nativním gelu se od sebe proteiny oddělují podle jejich čistého náboje, velikosti a tvaru jejich nativní struktury.

V současné době je více používána metoda pomocí dodecylsulfátu sodného, tedy SDS PAGE.

4.3.2 Příprava polyakrylamidového gelu

Přístrojové vybavení



Obrázek 4.3.2.1 Souprava pro vertikální elektroforézu Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Systém (autor)

Použité chemikálie a roztoky

- destilovaná voda
- Acrylamide-Solution (30%), Mix 37,5:1 (PanReac AppliChem)
- pufr A

na 100 ml pufru - 7,27 g Tris (VWR), 48 ml 1M HCl, pH 7,5 a dolít destilovanou vodou do 100 ml

- pufr B

na 100 ml pufru – 6 g Tris (VWR), 48 ml 1M HCl, pH 8,8 a dolít destilovanou vodou do 100 ml

- siřičitan sodný – Na_2SO_3 – nasycený vodný roztok
- persíran amonný (APS), VWR

10% roztok – 100 mg APS, 900 μl destilované vody

- TEMED – Tetramethylethyldiamine (PanReac AppliChem)
- elektroodový pufr

na 1000 ml pufru – 14,4 g glycinu (VWR), 3 g Tris (VWR), rozmíchat v 600 ml destilované vody, srovnat pH na 8,3 pomocí HCl a dolít destilovanou vodou do 1000 ml

Elektrodový pufr před použitím ředit 10x.

Příprava gelů:

Jeden finální gel je asi 6 x 8 cm velký a 1 mm silný.

Destilovaná voda	6,25 ml
30% roztok akrylamidu	2,5 ml
Pufr A	1,75 ml
Sířičitan sodný	25 µl
Persíran amonný (APS)	50 µl
TEMED	5 µl
Celkový objem 10,58 ml – pro dva gely	

Tabulka 4.3.2.1 7,5% dělicí gel (autor)

Destilovaná voda	3,125 ml
30% roztok akrylamidu	1,25 ml
Pufr B	1,75 ml
Sířičitan sodný	12,5 µl
Persíran amonný (APS)	37,5 µl
TEMED	5 µl
Celkový objem 6,18 ml – pro dva gely	

Tabulka 4.3.2.2 3,75% zaostřovací gel (autor)

Postup:

- 1) Sestavit čisté a suché gelové kazety
- 2) Připravit 7,5% dělicí gel – do suché čisté kádiny přidávat jednotlivé chemikálie tak, jak jdou za sebou dle tabulky č.3, polymerace začne přidáním APS a TEMEDu
- 3) Po přidání všech chemikálií promíchat a pomocí pipety nalít mezi skla tak, aby se netvořily vzduchové bubliny, kazety naplnit 2-2,5 cm pod horní okraj (prostor pro zaostřovací gel) a nechat 1,5 hodiny polymerovat
- 4) Po ukončení polymerace přelít pomocí pipety 3,75% zaostřovacím gelem, připraveným dle tabulky č. 4 – tento gel polymeruje rychle, tudíž připravit až těsně před naléváním
- 5) Ihned vložit hřeben pro tvorbu jamek a nechat 15 minut polymerovat
- 6) Před samotnou elektroforézou hřeben vyjmout a jamky 2-3x promýt stříčkou s destilovanou vodou

-
- 7) Po promytí skla s gely vložit do stojanu do elektroforetické vany a ihned přelít 10x ředěným elektrodoým pufrém tak, aby byly jamky zcela pod hladinou

4.3.3 Příprava vzorků, nanesení vzorků, vlastní elektroforéza

Použité chemikálie a roztoky

- laboratorní písek
- 3M NaCl

na 100 ml roztoku o koncentraci 3 mol/l – 17,53 g NaCl rozmíchat v destilované vodě a doplnit objem do 100 ml

- Triton® X-100, VWR
- Lysozyme, egg white, VWR
- extrakční pufr

na 100 ml roztoku – 1,211 g TRIS (VWR) rozmíchat v 60 ml destilované vody, srovnat pH na 7 pomocí HCl a dolít destilovanou vodou do 100 ml

- vzorkový pufr Next gel® Sample Loading Buffer 4x

Příprava vzorků:

Vzorky jsou ze 7.dne kultivace z produkčního media, ze kterého byly odebrány 2 ml do uzavíratelné plastové zkumavky. Ty byly stočeny v centrifuze při 14 000 g po dobu 5 minut. Po stočení byl supernatant odebrán a vyhozen, dále byl zpracován pouze sediment. Ten byl převeden do vychlazené třecí misky, přidáno 100 µl 3M roztoku NaCl a špetka laboratorního písku. Vzorek byl třen v misce 3 minuty a poté byl převeden zpět do zkumavky. K utřenému vzorku bylo přidáno 25 µl tritonu a 75 µl extrakčního pufru, promícháno na vortexu 2 minuty, následovalo 5 minut vložení do sonikátoru, což způsobilo destrukci buněčných stěn za pomoci ultrazvukových vln o vysoké frekvenci.

Po sonikaci bylo přidáno 100 mg lysozymu, opět promíchání na vortexu do úplného rozmíchání lysozymu – asi 10 minut. Poté proběhla inkubace při 37 °C 30 minut, v polovině času byl vzorek promíchán 2 minuty na vortexu. Po inkubaci opět promíchání a stočení vzorku v centrifuze při 14 000 g 5 minut. Po tomto stočení byl supernatant odebrán do čisté zkumavky.

Z tohoto supernatantu bylo odebráno 37,5 μ l do nové čisté zkumavky, bylo přidáno 12,5 μ l vzorkového pufru a takto připravený vzorek byl použit na elektroforézu.

Nanesení vzorků, vlastní elektroforéza:

Pomocí automatické pipety bylo do vzorkovacích jamek naneseno 10 μ l a 20 μ l připraveného vzorku s a bez obsahu železa.

Po nanesení vzorků byla foretická vana přiklopena víkem a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza proběhla při 150 V po dobu 20 minut – než vzorky prošly ze zaostřovacího gelu do dělicího. Poté probíhala při 250 V po dobu téměř 2 hodin.

4.3.4 Barvení, odbarvení gelu

Použité chemikálie a roztoky

- barvicí roztok $\alpha + \beta$

α – 1-Naphthyl acetate 99%, Alfa Aesar

β – 2-Naphthyl acetate 99%, Alfa Aesar

Fast Blue RR, SIGMA

N – Dimethylformamide, VWR

0,1M Tris HCl 100 ml – navážit 1,211 g Tris, zalít 95 ml destilované vody, pomocí 17,5% HCl srovnat pH na 7,3 a dolít destilovanou vodou do 100 ml

Navážit 20 mg α , 20 mg β a 40 mg Fast Blue RR, přelít 1 ml dimethylformamidu, před použitím zalít 100 ml 0,1M Tris HCl

- uchovávací roztok

na 1000 ml roztoku – do 500 ml destilované vody přilít 70 ml 60% kyseliny octové (VWR) a dolít destilovanou vodou do 1000 ml

Po ukončení elektroforézy byla skla opatrně vyndána z vany a oddělena od sebe. Byl odříznut zaostřovací gel a dělicí gel byl vložen do plastové vaničky s barvicím roztokem. Vanička s barveným gelem byla ponechána na horizontální stolní třepačce při 50 RPM na 20 minut, ve tmě.

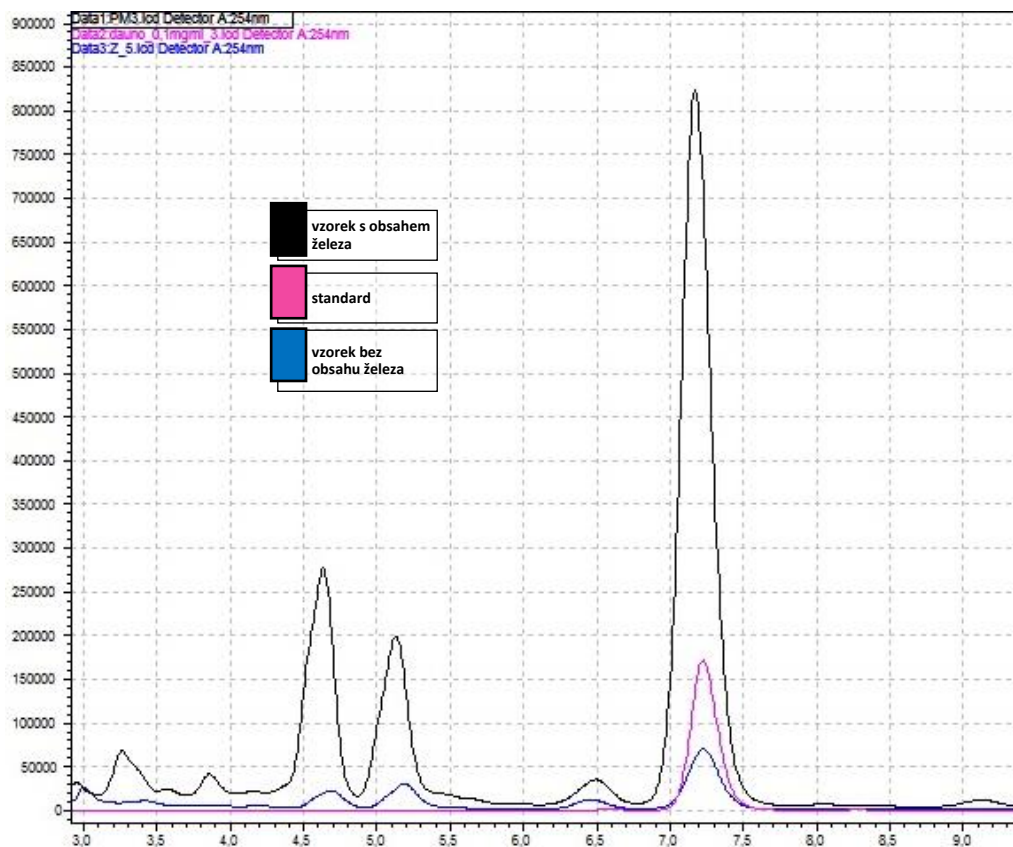
Po uplynutí času byl barvicí roztok slit. Gel byl dvakrát promytý destilovanou vodou.

Po promytí byl ponořen do uchovávacího roztoku.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Produkce sekundárních metabolitů (daunomycinu) v různých kultivačních mediích

Produkce daunomycinu byla měřena pomocí HPLC analýzy.



Obrázek 5.1.1 Demonstrační obrázek peaků z jednoho měření na HPLC, porovnání se standardem (autor)

Výpočet produkce daunomycinu ze vzorků z obrázku 5.1.1 byl proveden dle rovnic v kapitole 4.3, kde plocha peaku vzorku s obsahem železa byla 12 151 684. Po dosazení do vzorce byla výsledná produkce daunomycinu 2496 mg/l. Plocha peaku vzorku bez železa byla 1 073 976. Po dosazení do vzorce byla výsledná produkce daunomycinu 220,6 mg/l.

Kultivační media byla připravena celkem ve 20 opakováních, z toho 10 byla media s obsahem FeSO_4 a 10 media bez FeSO_4 . Výsledné hodnoty ploch peaků a z nich vypočtených produkcí daunomycinu v mg/l jsou uvedeny v tabulce 5.1.1. V tabulce 5.1.2 jsou uvedeny průměrné hodnoty, směrodatná odchylka, minima a maxima produkce daunomycinu ve vzorcích s a bez obsahu železa.

vzorek	s FeSO ₄		bez FeSO ₄	
	plocha peaku	produkce v mg/l	plocha peaku	produkce v mg/l
1	9 253 816	1900	67 416	140
2	12 151 684	2496	1 073 976	221
3	8 693 256	1786	118 371	240
4	10 362 887	2128	155 473	320
5	11 991 853	2463	579 087	119
6	10 125 633	2079	189 021	380
7	9 257 338	1901	1 548 557	318
8	9 897 956	2033	83 501	171
9	11 653 281	2393	164 371	337
10	10 003 564	2054	848 426	174

Tabulka 5.1.1 Výsledné plochy peaků a přepočty na produkci daunomycinu v mg/l (autor)

Medium	N (počet)	\bar{x} (průměr)	Sx(sm.odchylka)	Minimum	Maximum
s FeSO ₄	10	2123,3	235,6	1786	2496
bez FeSO ₄	10	990,5	100,4	140	318

Tabulka 5.1.2 Přehledová tabulka s produkcí daunomycinu (mg/l) (autor)

Z výsledků uvedených v tabulce 5.1.1 a tabulce 5.1.2 vyplývá, že přidáním železa do kultivačního media se zvyšuje produkci daunomycinu, a to v průměru 21,5x.

V absolutních hodnotách to pak znamená, že produkce daunomycinu ve skupině medií bez přídavku FeSO₄ byla v průměru 990,5 mg/l, zatímco s přídavkem FeSO₄ byla 2123,3 mg/l. Minimální produkce dosažená u produkčního media bez FeSO₄ byla 140 mg/l a maximální pak 318 mg/l, což činí rozdíl 178 mg/l (resp. 217 %). Minimální produkce dosažená u produkčního media s přídavkem FeSO₄ byla 1786 mg/l a maximální 2496 mg/l. Rozdíl v minimální a maximální produkci byl 710 mg/l (resp. 140 %).

Z dostupných makroživin je u *Streptomyces* železo vyzdvihováno jako jeden z nejdůležitějších kovových prvků k tomu, aby bylo možné indukovat produkci sekundárních metabolitů (Andrews et al., 2003). Jak uvádí studie z roku 1964, prováděná s kmenem *Streptomyces fradie*, měla přítomnost Fe²⁺ v mediu vliv na produkci neomycinu, kdy 3.den byla produkce 8 µg/ml a již 5.den 14,9 µg/ml (Majumdar a Majumdar, 1964). Fe²⁺ spolu s Zn²⁺ a Mn²⁺ hraje důležitou roli také v produkci kandacidinu, který je produkován *Streptomyces griseus* (Liu et al., 1975).

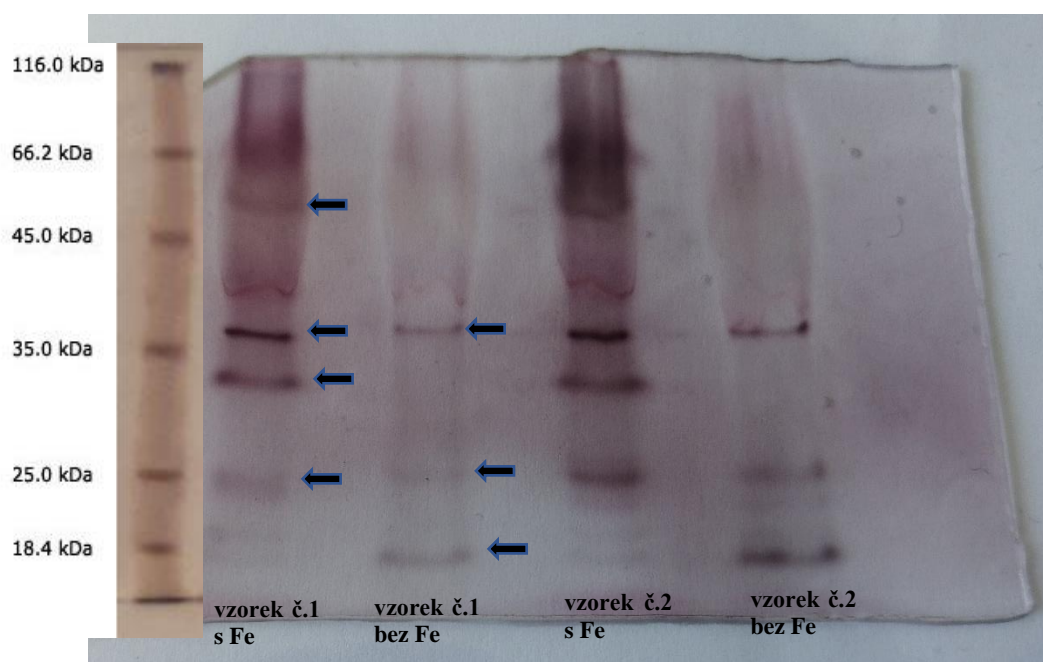
Produkce antracyklinů souvisí také se schopností bakterií produkovat chelátory železa, tzv. siderofory, které jsou závislé na přítomnosti Fe²⁺ či Fe³⁺ iontů v mediu.

Siderofory také zvyšují schopnost produkovat sekundární metabolity (Wandersman a Delepelaire, 2004), kterými jsou antracykliny, v tomto případě daunomycin.

Jak uvádí ve své studii z roku 2020 Lee et al., i nedostatek železa může vést k aktivaci produkce sekundárního metabolitu actinorhodinu u *Streptomyces coelicolor*, však bez inhibice růstu. Kromě Fe^{2+} byly testovány také další kationty dvojmocných kovů, jako Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} a Co^{2+} a z výsledků bylo zřejmé, že železo bylo jediným kovem, který při vysokých koncentracích snižoval produkci actinorhodinu (Lee et al., 2020). Další kmen *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, který byl kultivovaný v submerzích, produkoval značné množství tetracyklinu pouze v mediu, které bylo zcela bez obsahu železa. Avšak při statické kultivaci na mediu, které obsahovalo železo, došlo k diferenciaci a sporulaci buněk a tedy k produkci tetracyklinu (Bechet a Blondeau, 1998).

Jak je zmíněno výše, tak i další dvojmocné kovy mají vliv na produkci antracyklinů. Například studie z roku 1987 naznačuje, že doxorubicin a 4'-epidoxorubicin tvoří chelátové komplexy s Cu^{2+} . S ohledem na výše popsané antracykliny (obrázek 2.1.2.1.) lze tento efekt předpokládat i u dalších molekul s podobnou strukturou, jako je mimo jiné i daunomycin (Malatesta et al., 1987). Nebo u *Streptomyces rishiriensis* vzrostl přírůstek produkce kumermycinu po přidání Co^{2+} do kultivačního media o více než 93 % (Claridge et al., 1966).

5.2 Detekce proteinů indukovaných železem dodaným do kultivačního media



Obrázek 5.2.1 Obarvený gel se vzorky č.1 a č.2 z tabulky 5.1.1 (autor)

Obrázek 5.2.2 Marker pro detekci proteinů na nativní PAGE použitý z jiné analýzy na nativní PAGE, doplněný o hodnoty (autor)

Použitá metoda barvení proteinů zachycených na nativním gelu je určena pro detekci enzymů – esteráz. Výsledné bandy mají také barvu charakteristickou právě pro dané barvení, tmavě fialovou, protože hydrolyzují oba substráty (α a β naftyl-acetát) nejednou (Carvalho et al., 2003). Na obrázku 5.1.1 je porovnání vzorků kultivovaných se síranem železnatým a bez něj. Dle přiloženého markeru pro detekci proteinů na nativní PAGE je patrné, že ve vzorcích došlo k indukci proteinů v celkovém rozmezí cca 18,4 kDa až 52 kDa. Ve vzorcích se síranem železnatým došlo k indukci proteinů o velikostech cca 25 kDa, 33 kDa, 40 kDa a 52 kDa. Ve vzorcích bez síranu železnatého se indukovaly proteiny o velikostech 25 kDa a 40 kDa – tedy stejné jako ve vzorcích se síranem železnatým, však proteiny o velikostech 33kDa a 52 kDa chybí, a navíc byl protein o velikosti přibližně 18,4 kDa.

Vzhledem k použitému barvení pomocí α a β naftyl-acetátu je velmi pravděpodobné, že se jedná právě o esterázy ze skupiny α -esteráz a β -esteráz. Jsou to esterázy, které specificky hydrolyzují alfa a/nebo beta naftyl-acetát a jsou obecně značeny Est α a Est β (dříve EstA a EstB) a následně číslem, které označuje pořadí polohy jednotlivých alel na elektroforéze za nedenačních podmínek (Hemingway a Karunaratne, 1998). Dle dostupných klasifikací esteráz, patří α a β esterázy do

skupiny α/β hydroláz, konkrétně tzv. karboxylesteráz (CE). CE jsou známé jako „pravé“ esterázy a svým účinkem jsou nespecifické (Xie et al., 2008).

Některé zdroje uvádějí, že tyto esterázy hydrolyzují OP (organofosfátové) sloučeniny. Že esteráza B je inhibována právě OP a důležitou roli v aktivním místě enzymu hraje serinový zbytek. A enzymy definované jako esterázy A hydrolyzují OP a mají specifitu právě v tom, že potřebují ionty dvojmocných kovů, jako je v tomto případě Fe^{2+} a dále cysteinový zbytek místo serinu (Satoh et al., 2002).

6 Závěr

Práce byla rozdělena na dvě části. V první části bylo cílem zhodnotit vliv přidání železa do submerzní kultury *Streptomyces coeruleorubidus* na produkci antracyklinu – daunomycinu. Z dosažených výsledků vyplývá, že přidáním FeSO_4 do kultivačního media se zvedá produkce daunomycinu, průměrně 21,5x.

Přestože některé literární zdroje zmiňují zvyšování produkce sekundárních metabolitů za přítomnosti dvojmocných kovů v kultivačním mediu, někteří autoři popisují úplný opak a jejich negativní působení na produkci antracyklinů. I přesto, že se jedná z ekonomického hlediska při výrobě farmaceuticky využitelných látek o cenné informace, v současnosti je o této problematice publikováno malé množství prací a studie se zaměřují spíše na objevování nových účinných látek.

V tomto případě však má přídavek železa do kultivačního media bakteriálního kmene *Streptomyces coeruleorubidus* prokazatelně pozitivní vliv na produkci daunomycinu.

Ve druhé části práce bylo cílem detekovat proteiny, které se indukují právě přidáním FeSO_4 do kultivačního media kmene *Streptomyces coeruleorubidus*. Provedená nativní PAGE prokázala indukci proteinů o velikostech přibližně 33 kDa a 52 kDa. Dle použitého barvení lze říct, že se nejspíše jedná o proteiny ze skupiny enzymů – esteráz.

Konkrétně by se mohlo jednat o esterázy ze skupiny α a β esteráz. Je tedy jisté, že i v tomto případě má přídavek FeSO_4 do kultivačního media značný vliv na indukci proteinů. Komplexní metabolismus železa a jeho působení na produkci sekundárních metabolitů či právě na indukci proteinů však stále není zcela pochopen.

7 Seznam citované literatury

- Ambarwati, A. et al. 2012.** Antibiotic produced by Streptomyces associated with rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia. *African journal of microbiology research*. 2012, 6(1), 52-57.
- Andrews, S. C. et al. 2003.** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Review*. 2003, 27, 215-237.
- Barona-Gomez, F. et al. 2004.** Identification of a cluster of genes that direct desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of the American Chemical Society*. 2004, 126(50), 16282-16283.
- Bechet, M. a Blondeau, R. 1998.** Iron deficiency-induced tetracycline production in submerged cultures by *Streptomyces aureofaciens*. *Journal of applied microbiology*. 1998, 84(5), 889-894.
- Beinert, H. 2000.** Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *Journal of biological inorganic chemistry*. 5, 2-15.
- Bibb, M. 2005.** Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. *Current Opinion in Microbiology*. 2005, 8, 208-215.
- Brockmann, H. a Bauer, K. 1950.** Rhodomycin, ein rotes antibiotikum aus Actinomyceten. *Naturwissenschaften*. 1950, 37, 492-493.
- Carvalho, de V. M. et al. 2003.** Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg (Apocynaceae). *Genetics and molecular biology*. 2003, 26(2), 195-198.
- Claridge, C. A. et al. 1966.** Influence of cobalt of fermentative methylation. *Journal of applied mikrobiology*. 1966, 14(2), 280-283.
- Crichton, R. 2001.** *Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular mechanism to clinical consequences*. John Wiley and Sons, 2001. ISBN-13 978-0471492238.
- Crosa, J. H. 1997.** Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1997, 61(3), 319-336.
- Cummins, C. a Harris, H. 1958.** Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. *Journal of General Microbiology*. 1958, 18, 173-189.

-
- DiMarco, A. et al. 1964.** Daunomycin, a new antibiotic of the rhodomycin group. *Nature*. 1964, 201.
- Dubost, M. et al. 1963.** Un nouvel antibiotique a propriétés antitumorales. *Comptes Rendus*. 1963, 257.
- Escolar, L. et al. 1999.** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology*. 1999, 181(20), 6223-6229.
- Fassas, A. a Anagnostopoulos, A. 2005.** The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2005, 46(6), 795-802.
- Fatope, M. et al. 2000.** Research trends: Natural products as pest, microbial disease and tumor control agents. *Science Technology*. 2000, 55-71.
- Flårdh, K. a Buttner, M. 2009.** Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Review*. 2009, 7, 36-49.
- Flores, F. J. et al. 2005.** Functional analysis of two divalent metal – dependent regulatōry genes dmdR1 and dmdR2 in Streptomyces coelicolor and proteome changes in deletion mutants. *FEBS Journal*. 2005, 272(3), 725-735.
- Fronko, R. M. et al. 2000.** New pacidamycins produced by Streptomyces coeruleorubidus, NRRL 18370. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 2000, 53(12), 1405-10.
- Hamed, M. et al. 2018.** Streptomyces protein secretion and its applocation in biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*. 2018.
- Hantke, K. 2001.** Iron and metal regulation in bacteria. *Current opinion in Microbiology*. 2001, 4(2), 172-177.
- Harir, M. et al. 2018.** Streptomyces secondary metabolites. Shymaa Enany. *Basic biology and applications of actinobacteria*. IntechOpen, 2018.
- Hemingway J, Karunaratne, S.H. 1998.** Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and veterinary entomology*, 1998. 12, 1-12.
- Hong, K., et al. 2009.** Actinomycetes for marine drug discovery isolation from Mangrove soils and plants in china microbiological research. *Marine drugs*. 2009, 7(1), 24-44.
- Cheng, Y. R. et al. 1995.** Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by Streptomyces hygrosopicus. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, 43, 1096-1098.

-
- Jüttner, F. a Watson, S. 2007.** Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied and environmental microbiology*. 2007, 73(14), 4395-4406.
- Kalhotka, L. a Tesařová, M. 2014.** *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu*. Brno : Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-015-7.
- Katz, L. a Baltz, R. 2016.** Natural product discovery: past, present and future. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 2016.
- Keulen, G. van a Dyson, P. 2014.** Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Advanced in Applied Microbiology*. 2014, 89, 217-266.
- Klouda, P. 1996.** *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Ostrava : Klouda P., 1996. ISBN 80-902155-0-5.
- Korn-Wendish, F. a Kutzner, H. 1992.** The family Streptomycetaceae. [autor knihy] A. et al. Balows. *The prokaryotes (2 Edn)*. New York : Springer-Verlag, 1992, 923-995.
- Lee, M. a Demain, A. 1997.** Effect of nitrogen source on production of antibiotics. *Journal of Microbiology*. 1997, 412-422.
- Lee, N. et al. 2020.** Iron competition triggers antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* during coculture with *Myxococcus xanthus*. *ISME Journal*. 2020, 14, 1111-1124.
- Liu, C. M. et al. 1975.** Factors affecting the production of candicidin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1975. 7, 196-202.
- Locci, R. 1989.** *Streptomyces and related genera*. [autor knihy] D. H. a Williams, S. T. Bergey. *Bergeys manual of systematic bacteriology*. Baltimore : Williams and Wilkns Company, 1989, 2344-2508.
- Lovenberg, W. 1973.** *Iron-sulfur proteins*. Vol. I. New York. Academic Press. 1973, 387s. ISBN 978-0124560017.
- Majumdar, M. K. a Majumdar, S. K. 1965.** Effects of minerals on neomycin production by *Streptomyces fradiae*. *Applied microbiology*. 1965, 13(2), 190-3.
- Malatesta, V. et al. 1987.** Chelation of copper (II) ions by doxorubicin and 4'-epidoxorubicin: ESR evidence for a new complex at high anthracycline/copper molar ratios. *Inorganica chimica acta*. 1987, 136(2), 81-85. ISSN 0020-1693.

-
- Masák, J. 2014.** *Biochemie sekundárních metabolitů - sylabus předmětu*. Praha : VŠCHT, 2014.
- McAlister, V. C. et al. 2000.** Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet*. 2000, 355(9201), 376-377.
- Molle, V. et al. 2000.** WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 2000, 182(10671449), 1286-1295.
- Morris, R. P. et al. 2005.** Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National academy of sciences, USA*. 2005,102(16103351), 12200-12205.
- Morosoli, R. et al. 1997.** Protein secretion in Streptomyces. *FEMS Microbiology Letters*. 1997, 146(2), 167-174.
- Nardini, M. a Dijkstra, B. W. 1999.** Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*. 1999, 9(6), 732-737.
- Oki, T. et al. 1981.** New anthracyclines, feodomycins, produced by the mutant from *Streptomyces coeruleorubidus* ME130-A4. *Journal of Antibiotics*. 1981, 34(7), 783-90.
- Ollis, D. L. et al. 1992.** The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering, design and selection*. 1992, 5(3), 197-211.
- Pan, C. H. et al. 1975.** The effect of iron on a high-yielding industrial strain of *Penicillium chrysogenum* and production levels of penicillin G. *Journal of Fermentation Technology*. 1975, 53, 854-861.
- Pláteník, J. 2008/2009.** *Electrophoresis in biochemistry*. First fakulty of Medicine. Charles University in Prague. 2008/2009.
- Pridham et al. 1958.** *Streptomyces coeruleorubidus* (Preobrazhenskaya 1957), Approved list 1980. Cependium of actinobacteria from Dr. Joachim M. Wink, University of Braunschweig. *International journal of systematic bacteriology*. 30, 378
- Puchnerová, V. et al. 2016.** *Intervenční a akutní kardiologie*. Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno, 2016, 15(2), 102-105.
- Puma, N. et al. 2008.** Anthracycline-related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers. *Signa vitae*. 2008, 3(1), 30-34.
- Rodriguez, G. M. a Smith, I. 2003.** Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Molecular mikrobiology*. 2003, 47(6), 1485-1494.

-
- Rugthaworn, P. 2007.** A search and improvement of actinomycete strains for biological control of plant pathogens. *Kasetsart Journal*. 2007, 41, 248-254.
- Sathya, R. a Ushadevi, T. 2014.** Industrially important enzymes producing *Streptomyces* species from mangrove sediments. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014, 6(10).
- Satoh, T. et al. 2002.** Current progress on esterases: from molecular struktura to function. *Drug metabolism and disposition*. 2002, 30, 488-493.
- Seipke, R. F. et al. 2012.** *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology reviews*. 2012, 36(4), 862-876.
- Sharma, R. et al. 2001.** Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 2001, 19(8), 627-62.
- Sieswerda, E. et al. 2011.** The use of liposomal anthracycline analogues for childhood malignancies: A systematic review. *European Journal of Cancer*. 2011, 47(13), 2000-2008.
- Siva Kumar, K. et al. 2012.** Taxonomy and antimicrobial activity of *Streptomyces coeruleorubidus* sp. isolated from marine sediment. *Research Journal of Mivrobiology*. 2012, 7, 171-181.
- Smaoui, S. et al. 2011.** Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in soil from an Oasis in Tunis. *Archives of Biological Science*. 2011, 64(4), 1047-1056.
- Stevenson, S. et al. 1993.** Tumor cells interaction with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1993, 9, 541-73.
- Stewart, M. et al. 2020.** Interaction of the *Streptomyces* Wbl protein WhiD with the principal sigma factor σ HrdB depends on the WhiD [4Fe-4S] cluster. *Journal of biological chemistry*. 2020. 295
- Subbarao, N. 1999.** Soil microbiology, 4th edition. *Science publishers*. 1999, 279-283.
- Tierrafria, V. H. et al. 2011.** Disruption of the siderophore-binding desE receptor gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in impaired growth in spite of multiple iron-siderophore transport systems. *Microbial Biotechnology*. 2011, 4(2), 275-285.
- Wandersman, C. a Delepelaire, P. 2004.** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*. 2004, 58, 611-647.

Wang, W. et al. 2014. Siderophore production by actinobacteria. *BioMetals*. 2014, 27(4), 623-631.

Weinberg, E. D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites: role of trace metals. *Advances in Microbial Physiology*. 1970, 4, 1-44.

Willemse, J. et al. 2011. Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces* Genes and Dev. 2011, 25, 89-99.

Xie, G. et al., 2008. Esterase SeE of *Streptococcus equi* ssp. *equi* is a novel nonspecific carboxylic ester hydrolase. *FEMS microbiology letters*. 2008, 289, 181-186.

Yamanaka, K. et al. 2005. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology*. 2005, 151(9), 2899-2905.

Zitouni, A. 2005. Taxonomic study and antagonistic properties of *Nocardiosis* and *Saccharothrix* isolated from Saharan soil and production of new antibiotics by *Saccharothrix* sp. 103 p. *PhD Thesis, specialty: Microbiology*. Tizi Ouzou : University Mouloud Mammeri, 2005.

Osobní sdělení:

Ing. Karel Beneš, PhD.

doc. Ing. Vladimír Mat'ha, DrSc.

8 Seznam obrázků

Obrázek 2.1.1 Životní cyklus bakterií rodu <i>Streptomyces</i> (Mohammadipanah a Dehhaghi, 2017).....	8
Obrázek 2.1.2.1 Chemická struktura antracyklinů: DOX-doxorubicin, DNR-daunorubicin, EPI-epirubicin, IDA-idarubicin (Shevchuk O., 2012)	12
Obrázek 2.4.1 Klasifikace proteinů obsahujících železo (Bezkorovainy, A., 1980) ..	15
Obrázek 4.1.1 <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> (autor).....	17
Obrázek 4.1.2 <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> , kolonie na PDA (autor)	17
Obrázek 4.1.3 <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> , vzdušné mycelium (autor).....	18
Obrázek 4.1.4 <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> , zbarvení agaru po 7 dnech kultivace (autor).....	18
Obrázek 4.2.1.1 Narostlé kolonie použité pro inokulaci do VM (autor)	21
Obrázek 4.2.1.2 Připraveno pro inokulaci do PM, foto z mikroskopu (autor)	21
Obrázek 4.4.2.1 Souprava pro vertikální elektroforézu Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Systém (autor).....	24
Obrázek 5.1.1 Demonstrační obrázek peaků z jednoho měření na HPLC, porovnání se standardem (autor)	28
Obrázek 5.2.1 Marker pro detekci proteinů na nativní PAGE použitý z jiné analýzy na nativní PAGE, doplněný o hodnoty (autor)	31
Obrázek 5.2.2 Obarvený gel se vzorky č.1 a č.2 z tabulky 5.1.1 (autor).....	31

9 Seznam tabulek

Tabulka 2.2.1 Enzymy produkované bakteriemi r. Streptomyces a jejich funkce (autor)	12
Tabulka 4.2.1 Chemikálie a navážky pro VM (autor) Chyba! Záložka není definována.	
Tabulka 4.2.2 Chemikálie a navážky pro PM (autor) Chyba! Záložka není definována.	
Tabulka 4.3.1 Podmínky HPLC analýzy (autor).....	22
Tabulka 4.4.2.1 7,5% dělicí gel (autor).....	25
Tabulka 4.4.2.2 3,75% zaostřovací gel (autor)	25
Tabulka 5.1.1 Výsledné plochy peaků a přepočty na produkci daunomycinu v mg/l (autor).....	29
Tabulka 5.1.2 Přehledová tabulka s produkcí daunomycinu (mg/l) (autor)	29