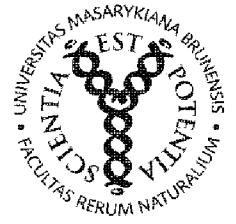




**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE**

---



**PROBIOTICKÝ ÚČINEK KOLICINU**  
**F<sub>Y</sub> BĚHEM EXPERIMENTÁLNÍ**  
**INFEKCE MYŠÍ BAKTERIÍ**  
***YERSINIA ENTEROCOLITICA***

Diplomová práce

**Katarína Pomorská**

Vedoucí práce: prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

Brno 2016

## Bibliografický záznam

**Autor:** Bc. Katarína Pomorská  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

**Název práce:** Probiotický účinek kolicinu F<sub>Y</sub> během experimentální infekce myši bakterií *Yersinia enterocolitica*

**Studijní program:** Experimentální biologie

**Studijní obor:** Speciální biologie

**Vedoucí práce:** prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

**Akademický rok:** 2015/2016

**Počet stran:** 84

**Klíčová slova:** kolicin F<sub>Y</sub>; probiotikum; *in vivo*; *Yersinia enterocolitica*; yersinióza

## Bibliografický záznam

**Autor:** Bc. Katarína Pomorská  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentálne biológie

**Názov práce:** Probiotický účinok kolicínu F<sub>Y</sub> počets experimentálnej infekce myši baktériou *Yersinia enterocolitica*

**Študijný program:** Experimentálna biológia

**Študijný obor:** Špeciálna biológia

**Vedúci práce:** prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

**Akademický rok:** 2015/2016

**Počet strán:** 84

**Kľúčové slová:** kolicín F<sub>Y</sub>; probiotikum; *in vivo*; *Yersinia enterocolitica*; yersinióza

## Bibliographic Entry

**Author** Bc. Katarína Pomorská  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of Thesis:** The probiotic effect of colicin F<sub>Y</sub> during the experimental infection of mice by *Yersinia enterocolitica*

**Degree programme:** Experimental biology

**Field of Study:** Special biology

**Supervisor:** prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

**Academic Year:** 2015/2016

**Number of Pages:** 84

**Keywords:** colicin F<sub>Y</sub>; probiotics; *in vivo*; *Yersinia enterocolitica*; yersiniosis

## Abstrakt

Yersinióza je třetím nejčastějším zoonotickým onemocněním v rámci Evropské unie. Projevuje se zvýšenou teplotou, průjmem a záněty intestinálního traktu. Gastrointestinální problémy lehkého průběhu jsou většinou léčeny symptomaticky a podáním probiotik. Colicin F<sub>Y</sub> je proteinem antimikrobiálního charakteru, produkovaným nepatogenním kmenem *Yersinia frederiksenii*. Má cytotoxický účinek vůči zástupcům rodu *Yersinia*, zejména vůči patogenním kmenům *Yersinia enterocolitica*. Tento jedinečný inhibiční efekt poskytuje nové možnosti v léčbě yersinióz způsobených bakterií *Yersinia enterocolitica*. Cílem této diplomové práce bylo experimentálně infikovat myši kmenem *Yersinia enterocolitica* a ověřit terapeutický potenciál kolicinu F<sub>Y</sub> produkovaného rekombinantním probiotickým kmenem.

## Abstrakt

Yersinióza je tretím najčastejším zoonotickým ochorením v rámci Európskej únie. Prejavuje sa zvýšenou teplotou, hnačkou a zápalmi intestinálneho traktu. Takéto gastrointestinálne problémy ľahkého priebehu sa väčšinou liečia symptomaticky a podaním probiotík. Kolicín F<sub>Y</sub> je proteínom antimikrobiálneho charakteru produkovaným nepatogénnym kmeňom *Yersinia frederiksenii*. Má cytotoxický účinok voči zástupcom rodu *Yersinia*, najmä voči patogénnym kmeňom *Yersinia enterocolitica*. Tento jedinečný inhibičný efekt poskytuje nové možnosti v liečbe yersinióz spôsobených baktériou *Yersinia enterocolitica*. Cieľom tejto diplomovej práce bolo experimentálne infikovať myši kmeňom *Yersinia enterocolitica* a overiť terapeutický potenciál kolicinu F<sub>Y</sub> produkovaného rekombinantným probiotickým kmeňom.

## Abstract

Yersiniosis is the third most common zoonotic disease in the European union. It is manifested by increased temperature, diarrhoea and inflammation of the intestinal tract. Gastrointestinal problems with such a light duration are usually treated symptomatically and by administration of probiotics. Colicin F<sub>Y</sub> is an antimicrobial protein produced by non-pathogenic strain of *Yersinia frederiksenii*. It has a cytotoxic activity against representatives of the genus *Yersinia*, particularly against pathogenic *Yersinia enterocolitica*. This unique inhibitory effect provides new possibilities in the treatment of yersiniosis caused by *Yersinia enterocolitica*. The aim of this diploma thesis was to experimentally infect mice with *Yersinia enterocolitica* strain and test the therapeutic potential of colicin F<sub>Y</sub> produced by the recombinant probiotic strain.



**Vysoká škola:** Masarykova univerzita

**Fakulta:** přírodovědecká

**Pracoviště:** Ústav experimentální biologie

**Akademický rok:** 2014/2015



# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

**Magisterský studijní program:** Experimentální biologie

**Studijní obor:** SPBI, Speciální biologie

**Student(ka):** Bc. Katarína Pomorská

Vedoucí diplomové práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., čl. o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto diplomovou práci:

**Název tématu:** Probiotický účinek kolicinu F<sub>Y</sub> během experimentální infekce myši bakterií *Yersinia enterocolitica*

**Název tématu anglicky:** The probiotic effect of colicin F<sub>Y</sub> during the experimental infection of mice by *Yersinia enterocolitica*

**Vedoucí diplomové práce:** prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

## Zásady pro vypracování

**Anotace:** Yersiniózy způsobené bakterií *Y. enterocolitica* jsou třetí nejčastější alimentární infekcí člověka v EU. Typickým příznakem jsou mírné enteritidy či pseudoapendicitidy, které se ve většině případů léčí pouze probiotiky. Kolicin F<sub>Y</sub> je antimikrobiální látka, která v podmínkách *in vitro* inhibuje růst všech kmenů *Y. enterocolitica*, přičemž bakterie střevní mikroflóry nejsou inhibovány. Produkce kolicinu F<sub>Y</sub> probiotickým kmenem se tak jeví jako vhodná vlastnost při léčbě mírných yersinióz. Cílem této diplomové práce bude navození experimentální infekce myši patogenní yersinií a následné ověření terapeutického potenciálu kolicinu F<sub>Y</sub> produkovaného rekombinantním probiotikem v systému *in vivo*.

### Časový harmonogram řešení (postup):

2014: studium publikací a příprava na experiment

2015: provedení experimentu

2016: analýza dat, vyhodnocení výsledku a sepsání diplomové práce

**Rozsah diplomové práce:** nejméně 50 stran

**Rozsah grafických příloh:** bez omezení

**Jazyk práce:** slovenský


### Doporučená literatura:


1. Die-Gonzales, S. (2007): Applications of bacteriocins in livestock. Curr. Issues Intest. Microbiol. 8:15-24.
2. Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2013): Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. Nat. Rev. Micro. 11: 95-105.
3. Nigam, A., Gupta, D., Sharma, A. (2014): Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. Microbiol. Res. 169: 643-651.
4. Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A. (2008): The dual role of bacteriocins as an anti- and probiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81: 591-606.

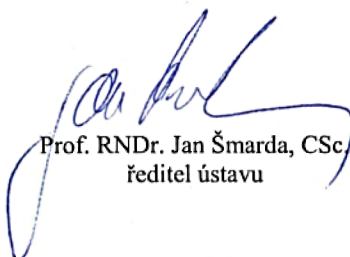
**Datum zadání diplomové práce:** 24. 10. 2014

**Termín odevzdání diplomové práce:** dle harmonogramu příslušného akademického roku.

V Brně dne: 24. 10. 2014

  
Bc. Katarína Pomorská  
podpis studenta

  
Prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.  
podpis vedoucího diplomové práce

  
Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel ústavu

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som chcela pod'akovať vedúcemu mojej diplomovej práce, prof. MUDr. Davidovi Šmajsovi, Ph.D. za ochotu, odborné konzultácie a cenné pripomienky. Rovnako chcem pod'akovať Mgr. Jurajovi Bosákovi, Ph.D. za trpezlivosť, rady, ochotu a spoluprácu pri experimentoch. Ďalej ďakujem celému Biologickému ústavu Lekárskej fakulty za vytvorenie príjemného pracovného prostredia. Vďaka patrí i mojej rodine za podporu počas celého štúdia.

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som svoju diplomovú prácu vypracovala samostatne s využitím informačných zdrojov, ktoré sú v práci citované.

Brno 1. 5. 2016

.....  
Katarína Pomorská



# OBSAH

1	ÚVOD .....	11
2	TEORETICKÝ ÚVOD .....	12
2.1	Patogénna baktéria <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	12
2.1.1	Charakteristika baktérie <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	12
2.1.2	Patogenéza infekcií <i>Y. enterocolitica</i> .....	12
2.1.3	Virulencia a invazivita.....	14
2.2	Bakteriocíny .....	15
2.2.1	Charakteristika bakteriocínov .....	15
2.2.2	Bakteriocíny grampozitívnych baktérií.....	15
2.2.3	Bakteriocíny gramnegatívnych baktérií.....	16
2.2.4	Bakteriocíny rodu <i>Yersinia</i> .....	19
2.2.5	Probiotický potenciál bakteriocínov.....	21
3	CIEĽ PRÁCE .....	23
	NEZVEREJNENÉ KAPITOLY .....	24-84

## Zoznam skratiek

Amp <sup>R</sup>	ampicilinová rezistencia
Cam <sup>R</sup>	chloramfenikolová rezistencia
Kan <sup>R</sup>	kanamycínová rezistencia
CFU	jednotky formujúce kolónie (colony forming units)
CLB	lyzačný pufer (cell lysis buffer)
CSB	suspenný pufer (cell suspension buffer)
D <sub>„x“</sub>	deň „x“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etiléndiamíntetraoctová
EtBr	etídium bromid
OD	optická denzita
PBS	fosfátový pufer (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
PFGE	pulzná gélová elektroforéza (pulse field gel electrophoresis)
SDS	sódium dodecyl sulfát (sodium dodecyl sulphate)
SEM	štandardná chyba priemeru (standard error of mean)
<i>ssp.</i>	poddruh ( <i>subspecies</i> )
<i>sv.</i>	sérovar
TY	trypton yeast
VRE	vankomycín rezistentné enterokoky
YE	<i>Yersinia enterocolitica</i>
YKR	<i>Yersinia kristensenii</i>

# 1 ÚVOD

Bakteriocíny sú antimikrobiálne ribozomálne syntetizované proteíny. Na rozdiel od antibiotík majú úzke spektrum účinku, s cytotoxickým efektom voči baktériám blízko príbuzným produkčnému kmeňu. Bakteriocíny produkované zástupcami čeľade *Enterobacteriaceae* sú nazývané kolicínmi. Celkom nedávno bol objavený nový kolicín rodu *Yersinia*. Kolicín F<sub>Y</sub> je produkovaný nepatogénnou *Yersinia frederiksenii* a má cytotoxický efekt voči baktérii *Yersinia enterocolitica*.

*Yersinia enterocolitica* je zoonotickým patogénom spôsobujúcim ochorenie gastrointestinálneho traktu. Yersinióza je radená na tretie miesto v početnosti zoonóz Európskej únie. Prejavuje sa zvýšenou teplotou, hnačkou a zápalmi čriev. Pokiaľ stav pacienta nie je závažný, je liečená symptomaticky, prípadne podaním probiotických preparátov. Vďaka spektru inhibičného účinku má kolicín F<sub>Y</sub> jedinečný potenciál pri liečbe yersinióz spôsobených *Y. enterocolitica*.

Výskumy posledných desaťročí sa intenzívne zaoberajú testovaním terapeutického potenciálu bakteriocínov voči rôznym patogénom, ako *in vitro*, tak *in vivo*. V rámci *in vivo* experimentov sú bakteriocíny podávané modelovým organizmom buď ako vypurifikované terapeutikum, alebo sú produkované probiotickými kmeňmi. Pri liečbe yersinióz by bolo vhodné využiť probiotický kmeň produkujúci kolicín F<sub>Y</sub>, ktorý bol otestovaný *in vitro*. Pred prípadným zavedením do praxe je potrebné otestovať jeho terapeutický efekt *in vivo*. Cieľom diplomovej práce je otestovať terapeutický potenciál kolicínu F<sub>Y</sub> voči *Y. enterocolitica* v myšom modeli za využitia rekombinantných kmeňov *E. coli*.

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Patogénna baktéria *Yersinia enterocolitica*

#### 2.1.1 Charakteristika baktérie *Yersinia enterocolitica*

Gramnegatívna baktéria *Yersinia enterocolitica* je dôležitým gastrointestinálnym zoonotickým patogénom izolovaným z rôznych zdrojov z prostredia. Spolu s ďalšími dvoma patogénnymi druhmi *Y. pseudotuberculosis* a *Y. pestis* ju zaraďujeme do čeľade *Enterobacteriaceae*. Tento mikroorganizmus je fakultatívne anaeróbný a chemoorganotrofný, majúci ako respiratórny, tak aj fermentatívny typ metabolizmu (Sedláček 2007). Optimálna teplota rastu je 28-30 °C, avšak rastie aj pri chladničkových teplotách. Prirodzeným rezervoárom tejto baktérie je divé a domáce prasa, ktoré ako asymptomatický prenášač predstavuje neustále ohrozenie v prenose ochorenia na človeka (Frederiksson-Ahomaa a kol. 2011).

Na základe rozdielov v metabolizme je možné jednotlivé kmene *Y. enterocolitica* rozdeliť do 6 biotypov (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) a na 60 sérotypov, spomedzi ktorých je pre človeka nebezpečných 11 (najčastejšie izolovanými sú O:3, O:9, O:5 a O:8) (Valentin-Weigand a kol. 2014; Bockemühl a Roggentin 2004; Bottone 1999). Sérotyp O:3 (*Yersinia enterocolitica* subsp. *palaearctica*) patrí medzi najčastejšie izolované kmene v Európe, najmä v Nemecku (až 90 % zo všetkých izolovaných *Y. enterocolitica*) (Rosner a kol. 2010). V USA je to sérotyp O:8 (*Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*) (Bottone 1997). Najvyššia incidencia yersiniózy je u detí, ktoré ešte nedosiahli piaty rok života (Rosner a kol. 2010). Podľa európskeho centra pre prevenciu a kontrolu ochorení bolo v roku 2014 nahlásených skoro 7000 prípadov, čo stavia túto chorobu na 3. miesto v najčastejšie nahlásených zoonotických chorobách v EU, pričom fatálnych bolo 0,13 % prípadov (European Centre for Disease Prevention and Control 2015).

#### 2.1.2 Patogenéza infekcií *Y. enterocolitica*

Infekcia baktériou *Yersinia enterocolitica* nastáva po požití potravy kontaminovanej týmto patogénom (Black a kol. 1978). Najčastejšie je to zle tepelne upravené bravčové mäso (European Centre for Disease Prevention and Control 2015; Rosner a kol. 2010). Následne tieto baktérie prejdú tráviacim systémom až do *illea*, kde kolonizujú M bunky Peyerových plakov (Bottone 1997). Po 4-7 dňoch nastupujú prvé

klinické symptómy (Valentin-Weigand a kol. 2014), akými sú napríklad teplota, hnačka, či akútna enteritída. Častým klinickým symptómom je bolesť podobná apendicitíde, ktorú má na svedomí akútna terminálna ileitída a mezenterická lymfadenitída (Chandler a Parisi 1994; Bottone 1997). Môže dochádzať k extraintestinálnemu rozvoju. U ľudí trpiacich krvotvornými poruchami či u pacientov s vysokým príjmom železa môže dôjsť k septickým stavom (Bergmann a kol. 2001). Prehľad klinického spektra infekcií *Y. enterocolitica* je uvedený v Tab. 1.

**Tab 1. Klinické spektrum infekcií *Yersinia enterocolitica*.** Upravené. Prevzaté od Bottone 1997.

Charakteristika ochorenia	Ochorenie
Gastrointestinálne prejavy	enterokolitída
	syndróm pseudoapendicitídy
	akútna mezenterická lymfadenitída
	terminálna ileitída
Septikémia	systémová infekcia
Metastázy a infekcie nasledujúce po septikémii	abscesy pečene, obličiek, sleziny a pľúc
	postihnutie kože vrátane celulitídy, pustul a bulózne lézie
	pneumónia
	meningitída
	panoftalmitída
	endokarditída
	osteomyelitída
faringitída	
Postinfekčné následky	artritída
	myokarditída
	glomerulonefritída
	<i>erythema nodosum</i>

### 2.1.3 Virulencia a invazivita

Pre virulentné kmene *Y. enterocolitica* sú dôležité určité teplotne riadené atribúty, ktoré im umožňujú prechod z vonkajšieho prostredia na hostiteľa a jeho následné kolonizovanie intestinálneho traktu. *Yersinia enterocolitica* využíva na započatie kolonizácie proteíny kódované na chromozóme, ktoré sú exprimované za nižších teplôt ako je teplota ľudského tela. Následne, po aklimatizácii na hostiteľskú teplotu, sú exprimované proteíny kódované na plazmidoch, vďaka ktorým sa patogén vyrovnáva s hostiteľskými obrannými mechanizmami (Bottone 1997).

Čo sa týka invazivity a adhérencie baktérie *Y. enterocolitica* k ľudským bunkám, najvýznamnejšie sú dva chromozomálne lokusy označované ako *inv* a *ail* (Isberg a Falkow 1985; Miller a Falkow 1988). To, že *inv* je dôležitý pre invazivitu buniek dokazuje experiment, kedy po jeho naklonovaní do neinvazívneho kmeňa rekombinant získal schopnosť invadovať HEP-2 bunky (Isberg a Falkow 1985). *Inv* kóduje proteín vonkajšej membrány, invasin, ktorý priamo interaguje s B1 integrínmi apikálneho povrchu M buniek, čo má za následok penetráciu z lumenu čreva do buniek hostiteľa (Isberg a Leong 1990; Isberg 1996). Lokus *ail* je podobne ako *inv* zodpovedný za invazivitu (Miller a Falkow 1988), no navyše zabezpečuje rezistenciu k ľudskému séru (Pierson a Falkow 1993). Pre invazivitu *Y. enterocolitica* je dôležitá i teplota. Kmene *Y. enterocolitica* kultivované pri 25 °C adherujú a invadujú bunky cicavcov efektívnejšie ako kmene kultivované pri 37 °C. Po adaptácii na teplotu tela hostiteľa dochádza k vysokej expresii *ail* na povrchu yersinií (Bottone 1997).

Pre infekciu *Y. enterocolitica* je dôležitý virulenčný plazmid (pYV) o veľkosti 64-75 kb, ktorého proteíny sú exprimované len pri teplote ľudského tela (Portnoy a kol. 1981). Gemski a kol. (1980) dokázali, že tento genetický element chýba u avirulentných kmeňov a je podstatný pre kontrolu invazivity. Virulentné, plazmid nesúce yersinie, adherujú k mucínu vo väčšej miere ako ich izogénne avirulentné kmene, čo naznačuje, že aj tu hrá tento mobilný genetický element dôležitú úlohu (Mantle a Husar 1993; Mantle a kol. 1989; Paerregaard a kol. 1991). Po prekonaní mukózne bariéry, ktorá obklopuje membrány buniek, *Y. enterocolitica* kolonizuje terminálne *illeum* a proximálny *colon* (Bottone 1997). V kolonizácii tejto časti tráviaceho systému hrá dôležitú úlohu proteín vonkajšej membrány YadA (YopI), ktorý je kódovaný na plazmide pYV. Je exprimovaný pri 37 °C (Bottone 1997). Je zodpovedný za adhérenciu k bunkám a rezistenciu k fagocytóze HEP-2 bunkami (Heesemann a Gräter 1987).

Balligand a kol. (1985) dokázali, že YadA má podobnú funkciu ako Ail, kedy mutant *Y. enterocolitica* O:9 bez tohto proteínu vonkajšej membrány stratil rezistenciu k ľudskému séru. Ďalším dôležitým proteínom tejto skupiny je YopH, ktorý špecificky defosforyluje proteín tyrozín kinázu makrofága, čo má antifagocytárny efekt (Bliska a kol. 1992). YopB potlačuje produkciu cytokínu, TNF- $\alpha$ , produkovaného makrofágmi, čo hrá centrálnu rolu v regulácii imunitnej odozvy na infekciu (Beuscher a kol. 1995). Yops sú všetkými tromi patogénnymi druhmi rodu *Yersinia* exportované von z bunky pomocou sekrečného systému typu III, ktorý je tiež plazmidovo kódovaný (Vibound a Bliska 2005).

## **2.2 Bakteriocíny**

### **2.2.1 Charakteristika bakteriocínov**

Bakteriocíny boli prvýkrát popísane pred 90 rokmi, kedy Gratia spozoroval antagonizmus medzi kmeňmi *E. coli* spôsobený tepelne labilným produktom (Gratia 1925).

Bakteriocíny sú antimikrobiálne ribozomálne syntetizované peptidy/proteíny produkované mikroorganizmami (Cotter a kol. 2005, Yang a kol. 2014). V porovnaní s antibiotikami majú relatívne úzke spektrum účinku. Producenti sú imúnni voči vlastným bakteriocínom, pričom imunitu sprostredkováva špecifický imunitný proteín (Cotter a kol. 2005).

V literatúre sa uvádza, že 99 % všetkých baktérií produkuje aspoň jednu túto antimikrobiálnu látku (Klaenhammer 1988). Bakteriocíny sú dôležité vo vzájomnej interakcii medzi mikroorganizmami, či už v rámci druhu, alebo na medzidruhovej úrovni. Sú významné v udržiavaní mikrobiálnej diverzity (Czárán a kol. 2002).

Jedno zo základných členení bakteriocínov je na základe taxonomického zaradenia produkčnej baktérie. A to na bakteriocíny grampozitívnych baktérií a bakteriocíny gramnegatívnych baktérií.

### **2.2.2 Bakteriocíny grampozitívnych baktérií**

U grampozitívnych baktérií sú intenzívne študované najmä bakteriocíny baktérií mliečneho kvasenia. Bakteriocíny sú klasifikované do troch hlavných skupín:

bakteriocíny obsahujúce lantionín (lantibiotiká, I. trieda), bakteriocíny neobsahujúce lantionín (II. trieda) a bakteriolyzíny (pôvodne III. trieda) (Cotter a kol. 2005).

#### **2.2.2.1 I. trieda: lantibiotiká**

Lantibiotiká sú malé peptidy o dĺžke 19-38 aminokyselín (Cotter a kol. 2005). Ich mechanizmom účinku je narušenie membránového potenciálu pomocou tvorby pórov v cytoplazmatickej membráne (napr. nisín), či enzymatická inhibícia (mersacidín) (Jung 1991).

#### **2.2.2.2 II. trieda: bakteriocíny neobsahujúce lantionín**

Tieto bakteriocíny sú malé, tepelne stabilné peptidy a na rozdiel od lantibiotík nepodliehajú extenzívnej posttranslačnej modifikácii. Ich aktivita spočíva v permeabilizácii cytoplazmatickej membrány (Cotter et. al 2005). Delia sa na štyri podskupiny: i) peptidy odvodené od pediocínu, ktoré sú aktívne voči patogénu *Listeria monocytogenes* (Hécharad a Sahl 2002), ii) dvojpeptidové bakteriocíny (Garneau a kol. 2002), iii) bakteriocíny s cyklickou štruktúrou (Kawai a kol. 2004). Do štvrtej podskupiny (iv) patria zvyšné nezaradené peptidy (Cotter a kol. 2005).

#### **2.2.2.3 III. trieda: bakteriolyzíny**

Bakteriolyzíny sú pomerne veľké, tepelne labilné proteíny. Ich mechanizmus účinku spočíva v katalýze hydrolýzy bunkovej steny, čo vedie k lýze senzitívnej bunky. Na rozdiel od väčšiny bakteriocínov sa na ich plazmidoch nenachádza gén kódujúci imunitný proteín (Cotter a kol. 2005).

### **2.2.3 Bakteriocíny gramnegatívnych baktérií**

Bakteriocíny gramnegatívnych baktérií sa rozdeľujú do dvoch hlavných skupín: mikrocíny, peptidy o veľkosti menšej ako 10 kDa a kolicíny, proteíny o veľkosti 25 - 80 kDa (Dirix a kol. 2004).

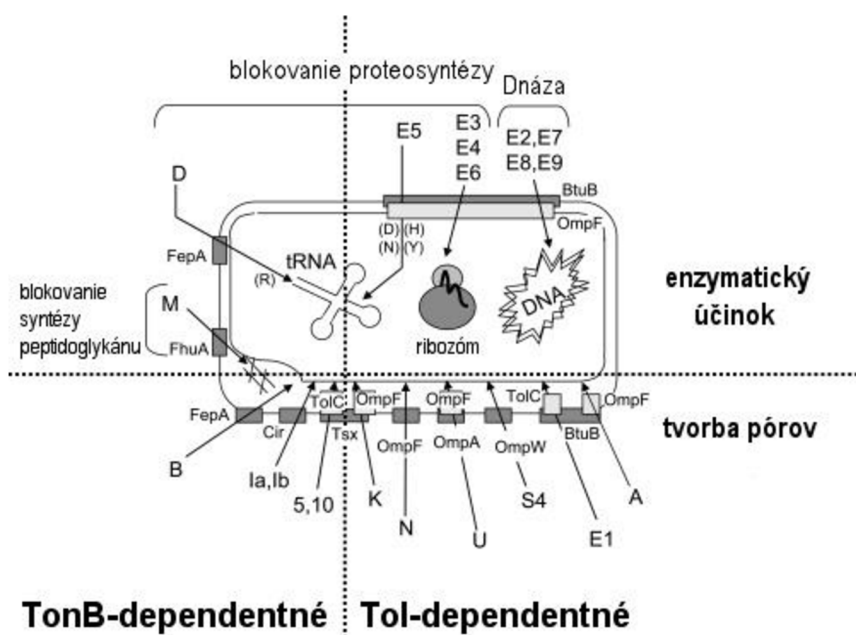


### 2.2.3.1 Mikrocíny

Mikrocíny zdieľajú s bakteriocínmi grampozitívnych baktérií s nízkou molekulárnou hmotnosťou niekoľko charakteristík, medzi ktoré patrí termostabilita, rezistencia k niektorým proteázam a extrémnemu pH a relatívna hydrofobicita. Tieto antimikrobiálne látky sa delia na dve skupiny. Do prvej patria peptidy podliehajúce posttranslačnej modifikácii, s molekulovou hmotnosťou menšou ako 5 kDa. Ich cieľom sú vnútrobunecné štruktúry buniek. Mikrocíny druhej skupiny sú väčšie (7-10 kDa), bez posttranslačnej modifikácie, pričom niektoré z nich majú za cieľ membránu baktérií (Pons a kol. 2002).

### 2.2.3.2 Kolicíny

Kolicíny sú toxické exoproteíny produkované kolicinogénnymi kmeňmi baktérie *E. coli*, poprípade inými druhmi čeľade *Enterobacteriaceae* (Šmarda a Šmajš 1998). Podľa originálnej klasifikácie, ktorú navrhol Fredericq v roku 1946, sa kolicíny rozdeľujú do skupín podľa špecificity receptora (Šmarda a Šmajš 1998). Najčastejšie sa však delia podľa translokačného systému, ktorý využívajú na prechod bunkovou stenou hostiteľských baktérií. Známe sú dva typy: Tol systém, ktorý využívajú kolicíny skupiny A (A, E1 - E9, K, L, N, S4, U, Y) a TonB systém, ktorý je využívaný kolicínmi skupiny B (B, D, F<sub>Y</sub>, Ia, Ib, M, 5, 10,) (Davies a Reeves 1975a; Davies a Reeves 1975b; Cascales a kol. 2007; Bosák a kol. 2012). Oba tieto systémy poskytujú energiu pre vstup kolicínu do bunky (Kleanthous 2010). Ďalší možný spôsob rozdelenia kolicínov je na základe ich cytotoxického účinku. Môžu vytvárať póry v cytoplazmatickej membráne, čo má za následok jej depolarizáciu, pôsobiť ako endonukleázy DNA, alebo RNA, poprípade inhibovať syntézu mureínu (Cascales a kol. 2007). Klasifikácia kolicínov je znázornená na Obr. 1.



**Obr. 1: Rozdelenie kolicínov podľa mechanizmu účinku a translokačného systému.** Upravené. Prevzaté od Cascales a kol. 2007.

Kolicíny sú kódované na kolicinogénnych plazmidoch (pCol), výnimku tvorí baktériocín *Serratia marcescens* kódovaný chromozomálne (Guasch a kol. 1995). pCol sa rozdeľujú na dva typy. Typ I zahŕňa multikópiové plazmidy o veľkosti 6-10 kb obsahujúce kolicínový operón a mobilizačný faktor. Kódujú prevažne kolicíny A skupiny. K typu II patria veľké (40 kb) monokópiové plazmidy kódujúce okrem kolicínu i rôzne gény. Zaraďujeme sem plazmidy kolicínov typu B (Hardy a kol. 1973; Cascales a kol. 2007).

Kolicínový operón sa skladá typicky z dvoch až troch génov, pričom prvým je gén zodpovedný za aktivitu kolicínu *cx*a (pre kolicín „x“). Druhý, štruktúrny gén imunitného proteínu *cx*i, sa v prípade kolicínov s nukleázovou aktivitou nachádza na rovnakom operóne s *cx*a. V prípade kolicínov vytvárajúcich póry v cytoplazmatickej membráne sa nachádza na špecifickom operóne, ktorý je lokalizovaný na opačnom DNA vlákne. Tretím je gén kódujúci lyzačný proteín, *cx*l, ktorého produkt umožní uvoľnenie kolicínu do média (Dogan a kol. 1978; Cascales a kol. 2007) a je typický pre malé pCol plazmidy (typ I) (Šmarda a Šmajš 1998).

Aktivita kolicínu má tri fázy. Najskôr sa kolicín naviaže pomocou centrálnej domény na špecifický receptor vonkajšej membrány citlivých baktérií. Následne dochádza k translokácii kolicínu bunkovým povrchom, za čo zodpovedá N-terminálna

doména. Nakoniec cytotoxický efekt vykoná C-doména (Ohno-Iwashita a Imahori 1980; Ohno-Iwashita a Imahori 1982).

## 2.2.4 Bakteriocíny rodu *Yersinia*

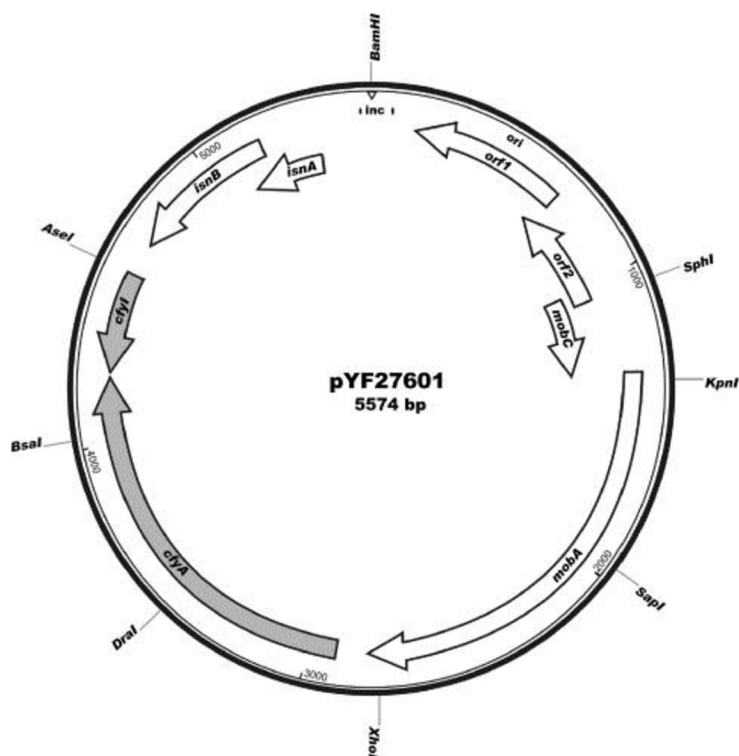
To, že zástupcovia rodu *Yersinia* produkujú bakteriocíny si všimli už roku 1958 Ben-Gurion a Hertman, keď 23 z 24 kmeňov *Pasteurella pestis* (dnes *Yersinia pestis*) produkovalo za určitých podmienok antimikrobiálne látky podobné vtedy známym kolicínom. Produkované antimikrobiálne proteíny, ktoré vykazovali inhibičnú aktivitu voči rastu *Pasteurella pseudotuberculosis* (dnes *Yersinia pseudotuberculosis*) nazvali pesticínmi (Ben-Gurion a Hertman 1958). Druhým, pesticín pozitívnym zástupcom tohto rodu je *Pasteurella pseudotuberculosis* (dnes už *Yersinia pseudotuberculosis*) (Brubaker a Surgalla 1961). Ďalšie bakteriocíny boli identifikované u *Y. intermedia* (Bottone a kol. 1979) a *Y. kristensenii* (Toora 1995).

Celkom nedávno bol u baktérie *Yersinia frederiksenii* Y27601 objavený nový typ bakteriocínu, pomenovaný ako kolicín F<sub>Y</sub>. Na základe podobnosti dostal meno kolicín, písmeno F nebolo v rámci nomenklatúry kolicínov doposiaľ použité, index <sub>Y</sub> označuje rod *Yersinia*, ktorý ho produkuje. Podobne ako ostatné kolicíny, tento proteínový toxín má úzke spektrum účinku. Inhibuje rast v rámci rovnakého rodu, aký ho produkuje (Bosák a kol. 2012).

### 2.2.4.1 Kolicín F<sub>Y</sub>

#### Plazmid kódujúci kolicín F<sub>Y</sub>

Ako bolo už spomenuté vyššie, kolicín F<sub>Y</sub> je produkovaný kmeňom *Y. frederiksenii*. Je kódovaný na kolicinogénnom plazmide pYF27601 o veľkosti 5574 bp (Obr. 2). Tento plazmid obsahuje dva gény inzerčných sekvencií (*isnA*, *isnB*), dva gény zodpovedné za mobilizáciu plazmidu (*mobA* a *mobC*) a nakoniec dva gény produkcie kolicínu (*cfyA* a *cfyI*). Gén *cfyA* kóduje kolicín F<sub>Y</sub>. Gén *cfyI*, ktorý kóduje imunitný proteín je v opačnej orientácii k *cfyA*. Kolicín F<sub>Y</sub> vykazuje podobnosť z už známymi kolicínmi, pričom najviac podobný je s kolicínom Ib formujúcim póry. Zatiaľ čo C-doména vykazuje 69 % identitu, receptorová doména je úplne neznáma (Bosák a kol. 2012).



**Obr. 2.: Mapa plazmidu YF27601** znázorňujúca začiatok replikácie, gény kódujúce kolicín  $F_Y$  a imunitný proteín sú vyznačené sivou farbou. Na schéme sú znázornené i špecifické restričné miesta. Prevzaté od Bosák a kol. 2012.

### Receptor kolicínu $F_Y$

Kolicín  $F_Y$  rozpoznáva u citlivých bakteriálnych kmeňov proteín vonkajšej membrány špecifický pre yersinie (YiuR). YiuR patrí do skupiny TonB-dependentných proteínov. Jeho fyziologická aktivita zatiaľ nie je známa. Kolicín  $F_Y$  potrebuje okrem receptoru YiuR i yersiniový TonB. Pre nadobudnutie senzitivity *E. coli* ku kolicínu  $F_Y$  musel byť do nej natransformovaný plazmid s génmi *yiur* a *tonB* z *Y. kristensenii*, keďže *tonB* *E. coli* DH10B a *Y. kristensenii* sú identické len zo 46 % (Bosák a kol. 2012).

### Inhibičné spektrum kolicínu $F_Y$

Pri testovaní inhibičného účinku kolicínu  $F_Y$  sa zistilo, že táto antimikrobiálna látka zamedzuje rastu piatich z ôsmich testovaných druhov yersinií (Tab. 2). Patria medzi ne *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae* a patogén *Y. enterocolitica*, u ktorého bol zaznamenaný najvyšší počet senzitívnych kmeňov (až 96,77 %). *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei* a *Y. ruckeri* v tomto experimente nevykazovali žiadnu citlivosť (Bosák a kol. 2012). V nadväzujúcej štúdií bolo na

citlivosť voči kolicínu F<sub>Y</sub> testovaných 110 izolátov *Y. enterocolitica*. Tieto izoláty sa medzi sebou líšili biotypmi, sérotypmi, pulzotypmi i geografickým pôvodom. Všetkých 110 testovaných kmeňov vykazovalo inhibíciu rastu kolicínom F<sub>Y</sub>. Tento inhibičný účinok spočíva v tvorení pórov v cytoplazmatickej membráne senzitivných baktérií (Bosák a kol. 2013).

**Tab. 2.:** Inhibičné spektrum kolicínu F<sub>Y</sub> voči zástupcom rodu *Yersinia*. Prevzaté od Bosák a kol. 2012.

Druh <i>Yersinia</i>	Počet kmeňov citlivých ku kolicínu F <sub>Y</sub> / celkový počet testovaných kmeňov (%)
<i>Y. frederiksenii</i>	3/13 (23,08)
<i>Y. intermedia</i>	2/9 (22,22)
<i>Y. kristensenii</i>	5/15 (33,33)
<i>Y. aldovae</i>	4/6 (66,67)
<i>Y. enterocolitica</i>	30/31 (96,77)
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0/15 (0,00)
<i>Y. rohdei</i>	0/4 (0,00)
<i>Y. ruckeri</i>	0/6 (0,00)

## 2.2.5 Probiotický potenciál bakteriocínov

Medzi najčastejšie testované bakteriocíny na probiotický potenciál v podmienkach *in vivo* patria bakteriocíny grampozitívnych baktérií. Napríklad probiotický kmeň *Lactobacillus salivarius* produkujúci bakteriocín Abp118 mal signifikantný probiotický efekt u myši infikovanými patogénom *Listeria monocytogenes* v porovnaní s izogénnym kmeňom probiotika bez génu pre produkciu bakteriocínu. Z toho vyplýva, že probiotický efekt bol dosiahnutý vďaka kolicínu, nie vďaka samotnému probiotickému kmeňu (Corr a kol. 2007). V ďalšom experimente s myšami Millette a kol. (2008) preukázali, že ľudské kmene *Pediococcus acidilactici* a *Lactococcus lactis* vďaka bakteriocínom (pediocín a nisín) dokázali po šiestich dňoch infekcie vytlačiť vankomycín rezistentné enterokoky (VRE) až na úroveň, kedy neboli detekovateľné. Navyše inhibičné spektrum nisínu je širšie, keďže po intranasálnej aplikácii tento bakteriocín dokázal zabrániť pneumónii vyvolanej *Staphylococcus*

*aureus* u laboratórných potkanov (De Kwaadstenia a kol. 2009). Nisín podaný myšiam intravenózne účinkoval voči infekcii *Streptococcus pneumoniae* lepšie ako vankomycín (Goldstein a kol. 1998).

*In vivo* štúdie sa často zaoberajú bakteriocínmi gramnegatívnych baktérií a ich schopnosťou eliminovať patogény spôsobujúce hnačkovité ochorenia (napríklad Cutler a kol. 2007). Väčšina týchto ochorení je liečená iba symptomaticky a yersinióza nie je výnimkou. Antibiotiká pri yersinióze vyvolanej *Y. enterocolitica*, ako napríklad ciprofloxacín, či doxycyklín, sú podávané iba vo výnimočných, závažných stavoch (Lübbert 2016). Klinické príznaky tohto ochorenia však výrazne limitujú život pacienta, navyše symptomatická liečba neskracuje priebeh gastrointestinálneho problému (Vandenplas 2016). Štúdie dokazujú, že niektoré probiotiká sú schopné sa s hnačkovitými ochoreniami vysporiadať za 24 h (Vandenplas 2016). 100% citlivosť izolátov *Y. enterocolitica* ku kolicínu F<sub>Y</sub> v podmienkach *in vitro* (Bosák a kol. 2013) naznačuje potenciál k jeho probiotickému využitiu pri hnačkovitých ochoreniach spôsobených enteropatogénom *Y. enterocolitica*. Jednou z možných aplikácií kolicínu F<sub>Y</sub> je využitie rekombinantných probiotických kmeňov, napríklad *E. coli*.

Kmene *E. coli* sú pomerne bežne využívané ako probiotiká (Cursino a kol. 2006). Napríklad komenzálny, nepatogénny kmeň *E. coli* Nissle 1917 bol úspešne aplikovaný u 81 % pacientov z celkového súboru 3807 jedincov trpiacich gastrointestinálnymi problémami (Krammer a kol. 2006). Taktiež bol úspešný v liečení hnačiek u dojčiat (Henker a kol. 2007). U prasiat sa ukázal byť vhodný v prevencii salmonelózy (Altenhoefer a kol. 2004). Ďalším príkladom probiotika je *E. coli* H22, ktoré je podobne ako Nissle1917 ľudským izolátom (Nascimento a kol. 1999). V *in vitro* systéme inhibuje rast viacerých baktérií, napríklad *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* či *Salmonella enterica*. *In vivo* experiment ukázal na jeho inhibičný účinok voči *Shigella flexneri* u gnotobiotických myší. Probiotický efekt je pravdepodobne spôsobený bakteriocínmi, ktoré produkuje (Cursino a kol. 2006). Ich produkcia môže byť vhodnou alternatívou k antibiotickej liečbe, čo môže vyriešiť problém s liečením ochorení spôsobenými baktériami s antibioticou rezistenciou. Výskumy posledných desaťročí sa intenzívne zaoberajú ich terapeutickému účinku v *in vivo* systéme.

### 3 CIEĽ PRÁCE

Táto diplomová práca nadväzuje na predchádzajúci výskum kolicínu F<sub>Y</sub> v Laboratóriu bakteriálnej genetiky a genomiky Lekárskej fakulty Masarykovej univerzity. Unikátne inhibičné spektrum kolicínu F<sub>Y</sub> voči patogénnym izolátom *Yersinia enterocolitica in vitro* naznačuje možnosť využitia kolicínu F<sub>Y</sub> pri probiotickej liečbe yersinióz.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo experimentálne infikovať myši patogénnym kmeňom *Yersinia entecorolitica* a následne overiť terapeutický potenciál kolicínu F<sub>Y</sub> produkovaným rekombinantným probiotikom v *in vivo* systéme.

## **NEZVEREJNENÉ KAPITOLY**