

Bio

Ročník 25 • Číslo 3/2015

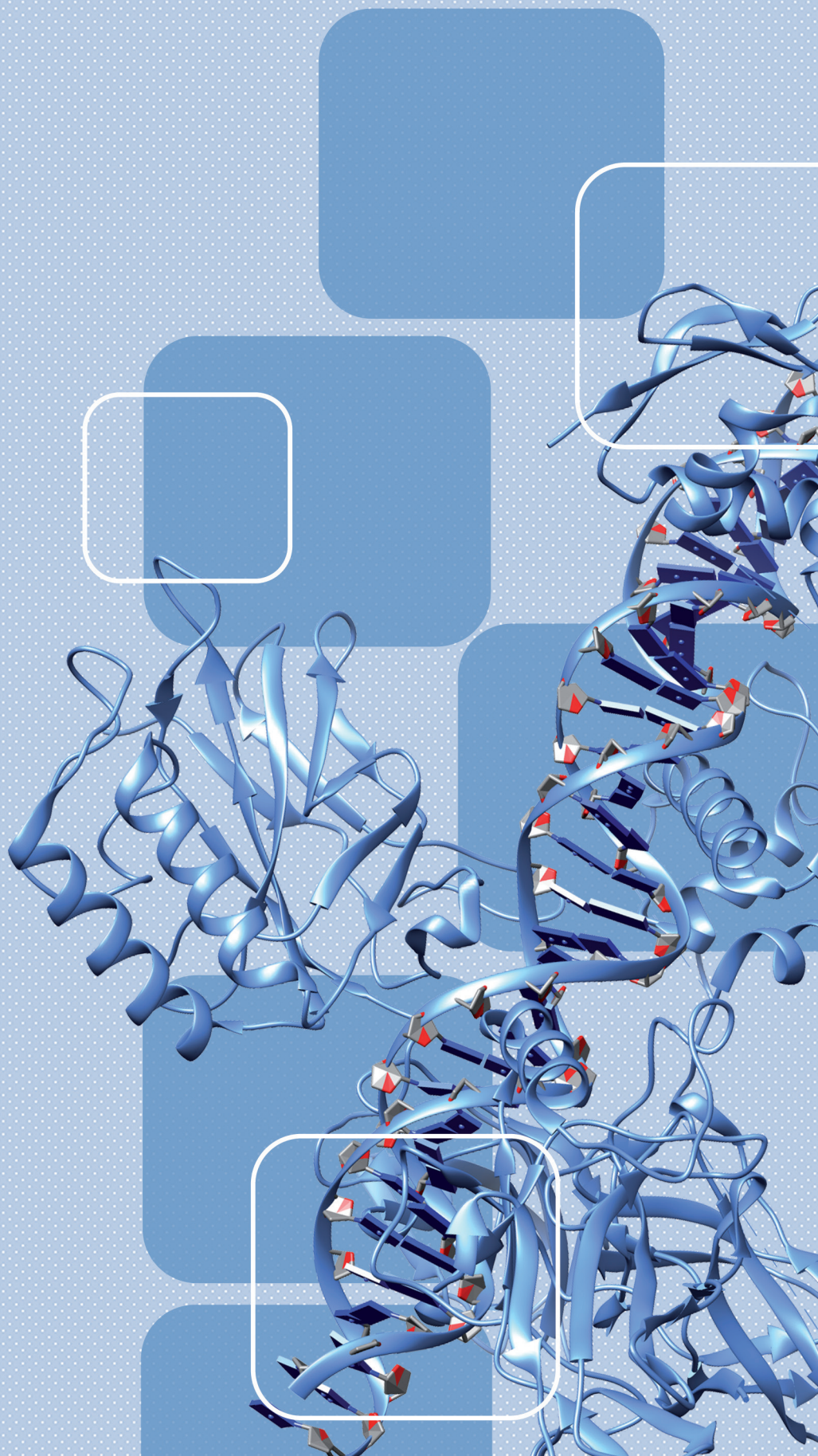
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

věříme, že jste strávili příjemnou dovolenou, odpočinuli si a máte naplánováno, co vše do konce roku stihnete, jak v profesním, tak soukromém životě. I naši Biotechnologickou společnost do konce roku čeká mnoho úkolů, se kterými se musíme vyrovnat a těšíme se, že nám s tím pomůžete. Předně do konce roku musíme zvolit novou Radu naší společnosti na další tříleté období. Dle našich stanov se volby uskuteční korespondenčním způsobem. Žádáme Vás proto, abyste laskavě nejdéle do 30. října 2015 podali návrhy na členy Rady. V zájmu naší společnosti je, aby členy Rady byli zástupci regionů, biotechnologických institucí z výroby i akademické sféry. Uvítáme návrhy na mladé aktivní členy společnosti. Volby se uskuteční ve druhé polovině listopadu a veškeré informace dostanou členové společnosti dopisem.

Jak jsme Vás již informovali, je na současné Radě, aby se vypořádala s požadavky „Nového občanského zákoníku“. Konečně také vychází speciální číslo *Biotechnology Advances* (JBA, Vol. 33, Issue 6, Part 2, pp. 993 – 1276 Elsevier), kde je publikováno 20 vybraných přehledných článků z mezinárodního symposia Biotech 2014, které všechny prošly tvrdým recenzním řízením.

Rádi bychom Vás upozornili, abyste na webových stránkách EFB (European Federation of Biotechnology) www.efb-central.org sledovali EFB Newsletter, kde získáte aktuální informace o všech aktivitách EFB, zejména o konání nejrůznějších konferencí. Chtěli bychom Vám zejména připomenout, že v době od 3. do 6. července 2016 se bude konat v polském Krakově 17th European Congress on Biotechnology (ECB 2016). Na program je 25 symposií, která prakticky pokrývají „všechny barvy biotechnologií“.

Téměř v každém našem úvodníku si také připomínáme různé zajímavosti a zejména výročí mezníků vědy. Je tomu zhruba 50 let co došlo k překvapivému objevu,

že některé choroby nervového systému jako např. „nemoc šílených krav“ a Creutzfeldt-Jakobova nemoc nejsou způsobeny bakteriemi, plísněmi, viry či parazity, ale chybným poskládáním struktury proteinů („misfolded proteins“). Názor, že důvodem těchto hrozných neléčitelných chorob („infekčním agens“) je jeden protein (prion), byl tak překvapivý, že byl dlouhou dobu obtížně přijímán. Nicméně se postupně nezvratně prokázalo, že tvorba prionové bílkoviny je skutečné důvodem těchto vzácných a smrtelných chorob, takže v r. 1997 Stanley B. Prusiner obdržel Nobelovu cenu za objev nového mechanismu infekce. V letoším roce vyšla Prusinerova kniha, která podrobně popisuje prionovou anabasi. V současné době už víme, že špatné poskládání proteinových molekul je příčinou řady dalších degenerativních nervových chorob jako jsou Alzheimerova choroba (abnormálně poskládaný amyloid β -protein a tau-protein), Parkinsonova choroba či MSA (Multiple System Atrophy).

Stoupající počet lidí nemocných diabetem a obezitou vyvolává potřebu nahradit jak cukry, tak umělá sladidla, jejichž pravidelné užívání je spojeno s některými nežádoucími problémy. Zdá se, že problém by mohly řešit sladké proteiny. V tomto ohledu vzbudili pozornost zejména dva proteiny izolované ze západoafrických rostlin, které mají být tisíckrát sladší než sacharosa. Jsou to monelin (izolovaný z plodů *Dioscoreophyllum cumminsii*) a miraculin (izolovaný z plodů *Synsepalum dulcificum*). Termální denaturace monelinu (při zahřívání nad 50°C) sice vede ke ztrátě sladkosti (ta je tedy závislá na struktuře proteinu), ale ukázalo se, že pomocí genového inženýrství lze (dokonce různými způsoby) tento nedostatek odstranit.

Přejeme Vám příjemné počení článků, které jsme pro Vás v tomto čísle vybrali.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

Literatura k problematice prionů a sladkých proteinů:

1. Stanley B. Prusiner – Nobel Lecture: „Prions“. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Sep. 15 (2015). http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1997/prusiner-lecture.html
2. Prusiner SB: Prion Biology and Diseases (Monograph) (Colonial Williamsburg Historic Trades). Sep. 1 (1999).
3. Madness and Memory: The Discovery of Prions--A New Biological Principle of Disease by Stanley B. Prusiner Apr. 29 (2014).
4. Prusiner SB, et al.: Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *PNAS*, Aug. 31 (2015).
5. Rega MF, et al.: Design of sweet protein based sweeteners: Hints from structure-function relationship. *Food Chem.* 173, 1179 (2015).

PO DVOU LETECH SE DO OLOMOUCE VRÁTILA MEZINÁRODNÍ KONFERENCE GREEN FOR GOOD

Prostor pro sdílení nových informací o biotechnologických rostlin i místo pro inspirativní diskuze, při nichž často vznikají nové nápady a navazují se konkrétní spolupráce. To vše podle organizátorů nabídla konference Green for Good III, která se minulý týden konala na přírodovědecké fakultě.

Green for Good III uspořádalo Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (CRH) ve spolupráci s Evropskou biotechnologickou federací, kterou na konferenci zastupoval její viceprezident Jeff Cole. Odborného fóra se účastnilo zhruba 130 vědeckých pracovníků a studentů biotechnologických oborů ze 14 zemí. Od pondělí do čtvrtka se věnovali například struktuře dědičné informace, biotechnologiím obilovin, nutnosti druhé zelené revoluce či reakci rostlin na stresové podněty.

Úvodní přednáška patřila hlavnímu hostovi, jímž je přední světový odborník na chemickou ekologii John Pickett z Velké Británie. Hostům konference jej představil děkan Ivo Frébort, který mu následně předal pamětní medaili. Nositel prestižní Wolfovy ceny za zemědělství svým vystoupením nasadil ostatním přednášejícím latku vysoko.

„Přednáším pravidelně a vždy si vybírám místa, která jsou pro mě zajímavá a přínosná. Česká republika si uvědomuje, jak je zemědělství důležité. Má v této oblasti dlouhou tradici. Nejde zde jen o kalorie, ale i o kvalitu potravin,“ objasnil některé z důvodů své návštěvy Pickett.

Nevyloučil ani případnou spolupráci se zdejšími vědci. „Zajímám se zejména o růstové stimulatory, které

skýtají mnoho příležitostí, jak například z obilovin získat vyšší výnosy. Pokud tyto procesy pochopíme, naučíme rostliny, aby samy zvyšovaly svoji produkci,“ doplnil vědec z Rothamsted Research v Harpendenu.

V následujících dnech prezentovalo na 30 vědců výsledky své práce v šesti sekcích – Genome structure: its evolution and function; Cereal biotechnology; Genetic modification and gene editing; Metabolic regulation and methods of analysis; Stress response and cell signaling; Plant-pathogen interactions. Každou sekci uvedl svou přednáškou jeden ze zvaných řečníků, kterými byli mimo jiné Bruno Studer (ETH Zürich, Switzerland), Setsuko Komatsu (National Institute of Crop Science, Tsukuba, Japan), Johannes van Staden (Research Centre for Plant Growth and Development, Pietermaritzburg, South Africa), Danny Vereecke (Department of Applied Biosciences, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium), či Peter Hedden (Rothamsted Research, Harpenden, UK).

V průběhu konference se však našel čas i na méně formální diskuze a navazování důležitých profesních vztahů pro případnou budoucí spolupráci v prostředí pevnosti Fort Křelov nedaleko Olomouce. Součástí odpoledního programu byla po všechny tři dny konference i posterová sekce, kde dostali příležitost prezentovat své výsledky zejména studenti a mladí vědci. Na závěr konference byly vyhlášeny tři nejlepší studentské poster, jejichž autory byli: Cintia Marchetti (CRH), Lukáš Nosek (CRH) a Tomáš Beseda (ÚEB).



UŽ JSTE VYZKOUŠELI METADYN VIEW?

Petr Hošek, Vojtěch Spiwok

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; <http://metadyn.vscht.cz>, hosekp@vscht.cz, spiwokv@vscht.cz

V naší skupině již několik let využíváme a snažíme se rozvíjet metodu molekulárního modelování zvanou metadynamika^{1,2}. Jedním z produktů tohoto snažení je i prohlížeč Metadyn View pro vizualizaci výsledků této metody. Dovolujeme si při této příležitosti laskavě požádat komunitu čtenářů Bioprojektu o otestování tohoto programu.

Metadynamika² je simulační metoda, která umožňuje studovat děje probíhající v delších časových úsecích než konvenční molekulární simulace. V principu je možné pomocí konvenční simulace molekulové dynamiky simulovat sbalování proteinů z rozbaleného stavu do nativní struktury, vazbu ligandu na protein nebo různé rozsáhlé konformační změny biomolekul. Prakticky je to často neproveditelné kvůli tomu, že tyto procesy probíhají v delších časových měřítkách, než jsou časy dosažitelné v simulacích. Atomistické simulace používají integrační krok v řádu femtosekund. To znamená, že každou jednu nebo dvě femtosekundy je vypočteno jakými silami na sebe atomy systému působí, jak tyto síly posunou atomy a jak bude systém vypadat za další jednu nebo dvě femtosekundy. Abychom mohli simulovat piko-, nano-, mikro- až milisekundy, musíme provést 10^3 , 10^6 , 10^9 respektive 10^{12} kroků. Díky této náročnosti je možné konvenčně simulovat úseky ze života proteinů v řádu jednotek nanosekund za den na jednom osobním počítači. Pro simulaci delších časů je nutné použít výkonná výpočetní centra³⁻⁵ nebo speciální hardware⁶.

Jinou možností je použít nějakou vylepšenou simulační metodu, mezi které patří i metadynamika. Přestože tato metoda byla zavedena do praxe teprve relativně nedávno (2002)² prošla od té doby intenzivním vývojem. Použití metadynamiky je vhodné pro molekulární simulace nejrozličnějších systémů, pro které platí, že: 1.) klasická simulace je zpomalena kvůli velkým energetickým bariérám mezi pro nás zajímavými stavy systému, a 2.) přechod mezi těmito stavy můžeme popsat pomocí několika vhodně zvolených strukturních parametrů. Pomocí metadynamiky byly simulovány změny krystalových struktur hornin v zemském jádře⁷, byl počítačově proveden Millerův experiment představující vznik aminokyselin v raném stadiu planety Země⁸ nebo byl určen vazebný mód protinádorové sloučeniny SSR128129E, což umožnilo její posun v rámci klinických studií⁹. V současnosti je pro metadynamiku nejčastěji využíván programový balík Plumed^{10,11}, který je možné propojit s mnoha zavedenými simulačními programy. Visualizace výstupů z programu Plumed je úkolem pro náš program Metadyn View.

Konvenční simulace jsou neefektivní kvůli tomu, že systém zůstává dlouhou dobu zachycen v různých lokálních minimech energie. Metadynamika v průběhu simulace tato minima „zaplavuje“ pomocí „zaplavovacího“ potenciálu a tak urychluje simulovaný proces. To se

může jevit jako podvod, protože je systém ovlivňován nejen silami, jimiž na sebe vzájemně působí atomy, ale také umělými silami, které dodává zaplavovací potenciál. Zaplavovací potenciál je ale navržen tak, aby na konci simulace byla všechna minima rovnoměrně zaplavena a hladina energie zarovnána. Jak bylo teoreticky i prakticky prokázáno, takto zarovnaný zaplavovací potenciál představuje „otisk“ volné (Gibbsovy nebo Helmholtzovy) energie. Výsledkem simulace je tedy (obvykle jedno- nebo dvourozměrná) plocha volné energie. Kdo se tedy chce dozvědět, jak se systém chová v delších časových měřítkách, může si z plochy zjistit rozdíl volných energií pro vybrané stavy systému a přepočítat jej na rovnovážnou konstantu. Z výšek energetických bariér zase může odhadnout, jaké jsou rychlosti přeměn.

Zaplavovací potenciál je obvykle tvořen jako součet jedno- nebo dvourozměrných Gaussovských kopců. Výstupem programu Plumed je seznam těchto kopců. Pro každý kopec je zaznamenáno kdy byl přidán, jaké jsou jeho souřadnice a jak je kopec široký a vysoký. Běžné simulace pomocí metadynamiky vygenerují desítky tisíc kopců. Pro výpočet plochy volné energie je nutné tyto kopce sečíst. Tento krok sice vyžaduje jen zlomek výpočetního času ve srovnání s vlastní metadynamikou, ale i tak je příliš pomalý pro pohodlnou a interaktivní vizualizaci a analýzu výsledků. To má změnit Metadyn View. Detaily toho, jak Metadyn View počítá kopce, budou popsány v samostatném článku. Stručně ale můžeme říci, že program nahrazuje spojitě pozice kopců nespojitými a že využívá předpočítaný kopec, čímž se předejde opakovanému volání počítačově náročné exponenciální funkce ve vzorci pro Gaussovu křivku nebo kopce.

Program Metadyn View je založen na moderních webových technologiích HTML5, Javascript a WebGL. K programu je možné přistoupit v běžném webovém prohlížeči zadáním adresy <http://metadyn.vscht.cz>. Webová stránka obsahuje vlevo menu a vpravo čtvercové plátno pro nahrání výsledků metadynamiky. Pro demonstrační účely je možné kliknutím na tlačítko **Examples** rozbalit nabídku tří modelových výsledků simulací.

První (2D AceAlaNMe) představuje výpočet plochy volné energie molekuly známé v metadynamických kruzích jako alanindipeptid. Jedná se o aminokyselinu alanin, která je na aminoskupině acetylována a karboxylová skupina je převedena na *N*-methylamid. Tím se chování takto modifikovaného alaninu podobá chování aminokyseliny v proteinu. Alanindipeptid je tak oblíbeným „pokusným králíkem“ při testování nových metod urychlených simulací. Prvním krokem použití metadynamiky je výběr jednoho nebo dvou parametrů (kolektivních souřadnic) na které působí zaplavovací potenciál. V případě alanindipeptidu jsou vhodnými kolektivními souřadnicemi Ramachandranovy torsní úhly ϕ a ψ .

Pokusnou vizualizaci můžeme začít tak, že zmáčkneme knoflík **Examples** a pak 2D AceAlaNMe. Po několika vteřinách (podle rychlosti připojení) se plátno zbarví rudě. To znamená, že data byla načtena. Pak zmáčkněte šipku vlevo dole. Tím se začne vizualizovat zaplavování plochy volné energie. Simulace začíná z konformace, která má hodnoty $\varphi = -1,3$ a $\psi = +2,6$ a odpovídá konformaci β -listu v proteinech (jako kdyby měl alanin před a za sebou řetězec proteinu tvořící β -list namísto acetylů a metylaminu). Po pár krocích je toto minimum zaplaveno a konformace se změní na $\varphi = -1,4$ a $\psi = -0,2$, což je struktura odpovídající α -helixu. Po proběhnutí asi deseti kroků dojde ke změně do konformace $\varphi = +1,0$ a $\psi = +0,5$ (levotočivý helix). Knoflíky vpravo dole umožňují provádět měření, regulovat rychlost animace, měnit rozlišení, exportovat obrázek, přepnout mezi jedním přehráním a nekonečnou smyčkou, přepínat WebGL mód a měnit velikost plátna. Po stisknutí knoflíku na měření je možné zjistit souřadnice minim a sedlových bodů a jejich volné energie tak, že na ně namíříme kurzor. Kliknutím zjistíme, kdy simulace tuto oblast navštívila (dobu přidání tří nejbližších kopců). Pokud kliknete na jedno místo, držte levé tlačítko myši a přesunete kurzor někam jinam, získáte tak rozdíl volných energií. Pokud kliknete do jednoho minima a přetáhnete kurzor do druhého minima, pak můžete podle vzorečku $\Delta G = -RT \ln(K)$ předpovědět rovnovážnou konstantu odpovídající konformační změně. Podobně, pokud potáhnete myš z minima k nejbližšímu sedlovému bodu (transitnímu stavu), je možné pomocí Eyringovy rovnice vypočítat rychlostní konstantu konformační změny.

Druhým případem je racemizace [10]helicenu (2D helicen). Heliceny jsou syntetické polyaromatické sloučeniny helikálního tvaru. Heliceny jsou chirální, protože helix může být pravo- nebo levotočivý. Toho je možné využít v nanotechnologiích nebo chirální katalýze¹². Heliceny ale mohou racemizovat. Pokud je helicen pomocí chirální synthesy nebo separace připraven jen v jedné, například levotočivé, formě, může se stát, že se bude postupně měnit na pravotočivou formu, až vznikne racemická směs. Bylo zjištěno, že racemizace helicenů není klasická chemická reakce, ale v podstatě konformační změna, při které se helicen převrátí „naruby“. První kolektivní souřadnicí pro urychlování této změny metadynamikou byl torzní úhel tvořený centrálními atomy, který má kladnou respektive zápornou hodnotu pro opačné stereoismery. Druhou byl součet skalárních součinů vektorů kolmých na jednotlivá benzenová jádra. Ten je vysoký pro obě stabilní formy, protože jsou všechna benzenová jádra podobně orientována, a snižuje se v transitním stavu. Plocha volné energie má tvar obličejce (Obr. 1), kde obě „očíčka“ představují oba stereoismery a „pusinka“ představuje transitní stav. K racemizaci dojde zhruba po první desetině simulace. Na konci simulace by díky symetrii měly mít obě minima stejnou energii, což si může každý ověřit pomocí měřicího nástroje. Experimentálně bylo zjištěno, že při teplotě 390 – 400 °C je doba nutná k racemizaci 75 min¹³. Je tedy prakticky nemyslitelné simulovat racemizaci tohoto helicenu klasickou simulací molekulové dynamiky.



Obr. 1: Plocha volné energie racemizace [10]helicenu zobrazená na obrazovce Smart TV. Struktury a šipky ukazují levotočivou (vlevo) a pravotočivou (vpravo) formu helicenu a transitní stav racemizace (dole).

Posledním příkladem je jednorozměrná plocha volné energie pro konformační změny peptidu Ace-Pro-Pro-NH₂ (1D AceProProNH2). Tento peptid obsahuje dvě peptidové vazby před prolinem, které mohou existovat v *cis* i *trans* formě. Kolektivní souřadnice je navržena tak, aby aproximovala počet *cis* vazeb¹⁴. Simulační program v každém kroku vypočte pro obě peptidové vazby hodnoty torzních úhlů ω (s hodnotou 0 pro *cis* a $\pm\pi$ pro *trans* vazbu) a pak vypočte kosiny jejich polovin a ty sečte. Výsledek ukazuje, že globálním minimem je stav s oběma vazbami v konfiguraci *trans*. Nejméně výhodné lokální minimum odpovídá stavu s oběma vazbami v konfiguraci *cis*. Je ale nutné dodat, že metadynamika v tomto případě nebyla dostatečně dlouhá na to, aby byla vypočtena dostatečně přesná plocha volné energie. Pro dosažení dostatečné přesnosti by bylo nutné simulaci několikanásobně prodloužit a zobrazovaný soubor by byl příliš velký (již nyní má víc než 11 MB).

Literatura

1. Spiwok V, Hošek P, Šučur Z: *Biotechnol. Adv.* v tisku (2015).
2. Laio A, Parrinello M: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12562 (2002).
3. <http://www.metacentrum.cz>
4. <http://www.cerit-sc.cz>
5. <http://www.it4i.cz>
6. Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO, et al.: *Science* 334, 517 (2011).
7. Oganov AR, Martonák R, Laio A, et al.: *Nature* 438, 1142 (2005).
8. Saitta AM, Saija F: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 13768 (2014).

Souhrn

Hošek P., Spiwok V.: Už jste vyzkoušeli Metadyn View?

Metadyn View je nový webový nástroj pro vizualizaci výsledků molekulárních simulací pomocí metody zvané metadynamiky. Cílem tohoto článku je stručně představit čtenářům Bioprospectu tuto metodu a nástroj Metadyn View a požádat je o jeho otestování na různých počítačových platformách.

Klíčová slova: Metadynamika, plocha volné energie, molekulární simulace, vizualizace dat

Summary

Hošek P., Spiwok V.: Have you tried Metadyn View?

Metadyn View is a new web-based tool for visualization of molecular simulation results obtained by the method called metadynamics. In this article we want to briefly introduce metadynamics method and the Metadyn View tool to readers of Bioprospect and to kindly request them to test it on different computer platforms.

Keywords: Metadynamics, Free energy surface, Molecular simulations, data visualization

Jakožto tvůrci programu Metadyn View bychom oceňili pomoc při testování programu v různých webových prohlížečích, různých operačních systémech a na různých zařízeních, jako jsou osobní počítače, tablety nebo chytré telefony. Víme například, že některé webové prohlížeče neumožňují používat technologii WebGL. Současná verze Metadyn View byla tomuto faktu přizpůsobena, ale existuje možnost, že existují další omezení. Proto bychom uvítali jakékoliv ohlasy ohledně funkčnosti programu Metadyn View. Věříme, že se pak stane rutinním nástrojem pro vědce využívající metadynamiku.

Poděkování

Rádi bychom poděkovali MŠMT ČR (akce COST GLISTEN, CM1207, LD14133) a GAČR (projekt 15-17269S).

9. Herbert C, Schieborr U, Saxena K, et al.: *Cancer Cell* 23, 489 (2013).
10. Bonomi M, Branduardi D, Bussi G, et al.: *Comput. Phys. Commun.* 180, 1961 (2009).
11. Tribello G, Bonomi M, Branduardi D, et al.: *Comput. Phys. Commun.* 185, 604 (2014).
12. Shen Y, Chen C-F: *Chem. Rev.* 112, 1463 (2012).
13. Martin RH, Libert V: *J. Chem. Res. Synop.* 4, 130 (1980).
14. Moradi M, Tajkhorshid E: *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 1882 (2013).

ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BIOFILMU

Martina Paldrychová, Eva Kvasničková

Ústav Biotechnologie, VŠCHT v Praze; paldrycm@vscht.cz

Úvod

Více než 65 % nosokomiálních infekcí je vyvoláno přítomností mikrobiálních biofilmů tvořených patogenními či oportunně patogenními mikroorganismy. Schopnost účinně potlačovat vznik a rozvoj biofilmů, případně tyto již vzniklé, často vysoce rezistentní, multicekulární struktury úspěšně narušovat, nabývá v současné době na důležitosti a je tedy předmětem zájmu mnoha vědeckých skupin. Většina běžně dostupných

antimikrobiálních látek byla vyvinuta a testována k vymýcení planktonně žijících mikroorganismů. Biofilmové populace jsou však schopné vyrovnat se s působením těchto látek i v desetinásobně až tisícinásobně vyšších koncentracích^{1,2}.

Možným řešením tohoto problému by mohla být aplikace biologicky aktivních přírodních sloučenin. Některé produkty mikroorganismů a především celá řada extraktů z rostlin obsahuje látky, které disponují anti-

mikrobiálními vlastnostmi. Příkladem těchto látek jsou alkaloidy, kumariny, saponiny, taniny, chinony a fenoly³. V neposlední řadě se nabízí možnost kombinace těchto přírodních látek a konvenčních antibiotik. V řadě experimentálních studií bylo již popsáno jejich *in vitro* synergické působení^{4,16,17,18,19}.

Biofilm

V přírodě existuje až 99 % mikroorganismů ve formě biofilmu. Donlan a Costerton (2002) definují zralý biofilm jako společenství mikroorganismů nevratně připojené k povrchu, které obsahuje exopolymerní matrix a vykazuje charakteristické fenotypové vlastnosti. Mezi nejpozoruhodnější z nich patří zejména vysoká odolnost vůči antimikrobiálním látkám⁵. Jednotlivé buňky v biofilmu jsou schopné vnímat měnící se podmínky prostředí a díky mezibuněčné komunikaci dochází ke změnám v jejich genové expresi, což vede k výraznému zvýšení životaschopnosti. Bakterie, za účelem mezibuněčné komunikace, syntetizují signální molekuly nazývané autoinduktory (oligopeptidy a N-acyl-L-homoserin laktony) a reagují na ně v procesu známém jako quorum sensing (QS). Planktonní bakterie při nízké buněčné hustotě vylučují tyto autoinduktory v koncentracích, které jsou příliš nízké, než aby indukovaly změnu v genové expresi. Jakmile dosáhne bakteriální populace kritického množství, zvýšená koncentrace autoinduktorů umožní jedné bakteriální buňce vnímat přítomnost ostatních bakteriálních buněk. Mezi fyziologické projevy, které jsou pomocí QS kontrolovány, patří přichycení (adheze) k povrchu, bioluminiscence a exprese faktorů virulence^{1,6}.

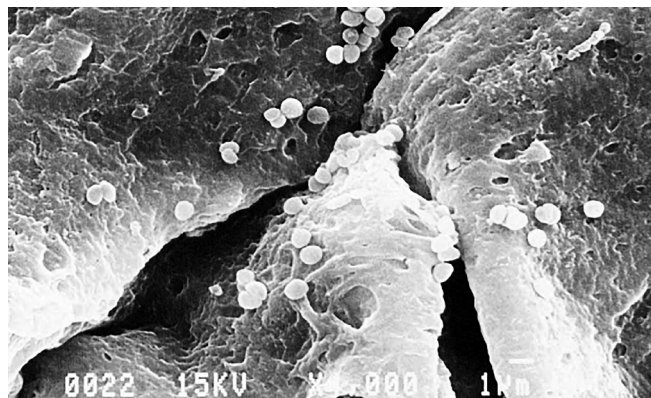
Zralý biofilm není ve většině případů homogenní jednoduchá vrstva, ale rozvinutá třidimenzionální struktura, která se vyznačuje prostorovou a časovou heterogenitou. Architektura a složení se mění podle druhu mikroorganismu i okolního prostředí. Struktura biofilmu je prostoupena kanálky, které umožňují průnik tekutin a usnadňují výměnu živin a kyslíku, jakož i odstranění toxických metabolitů. Buňky v biofilmu přednostně nevyužívají živiny k růstu, ale spíše k produkci extracelulárních polymerních struktur¹ (EPS).

Biofilmy ve zdravotnictví

Kromě kontaminace průmyslových zařízení, především v potravinářství (v mlékárnách, při zpracování ryb i drůbeže či v pivovarnictví), mikroorganismy velice často způsobují komplikace spojené s jejich přítomností ve formě biofilmů ve zdravotnictví, kde tímto způsobem vzniká celá řada chronických onemocnění. Uspořádané společenství biofilmu pro mikroorganismy představuje významný faktor virulence⁷.

Mezi velice závažná onemocnění patří biofilmové infekce vznikající v důsledku použití umělých implantátů, které jsou aplikovány do krevního řečiště (jedná se o umělé chlopně, kardiostimulační elektrody nebo různé typy katétrů či kloubních implantátů). Více než 40 % všech nosokomiálních infekcí na jednotkách intenzivní péče tvoří infekce močových cest a v 80 % z těchto případů jsou spojeny právě s kolonizací močových katétrů⁸. Mezi nejčastější bakteriální kolonizátory

těchto katétrů patří *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* (Obr. 1) a *Pseudomonas aeruginosa*⁷. Nejčastěji izolovanými kvasinkami (80 % případů) jsou *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*.



Obr. 1: *S. epidermidis* adheovaný na povrch močového katétru. Snímek SEM (skenovací elektronová mikroskopie)²¹

Dalším závažným biofilmovým onemocněním je také infekční endokarditida (IE), tedy zánět endokardu a srdečních chlopní. Výskyt IE stále roste a úmrtnost je i navzdory zlepšení diagnostiky a nástupu nové antibiotické terapie nadále vysoká (9 – 46 %). Infekční endokarditidu způsobují nejčastěji streptokoky, stafylokoky, enterokoky a méně často také některé gramnegativní bakterie a kandidy^{7,9}.

Infekce po aplikaci kloubních náhrad způsobují převážně stafylokoky (*S. aureus*, *S. epidermidis* a další). Pro prevenci kolonizace titanových náhrad je výzkum týkající se boje proti tvorbě biofilmu na biomateriálech zaměřen především na hledání nových slitin těchto materiálů a modifikaci jejich povrchů antibakteriálními látkami či nanočásticemi¹⁰.

K běžným biofilmovým infekcím dále patří, zejména u dětí se vyskytující zánět středního ucha (Otitis media)¹¹.

Bakteriální biofilm, který se tvoří na zubní sklovině (tzv. zubní plak) může vést až k chronické gingivitidě (zánětu dásní) či paradontitidě (zánětlivé onemocnění celého závěsného aparátu zubu). Ve formě biofilmu se k zubní sklovině přichycuje i nejvýznamnější původce zubního kazu *Streptococcus mutans*.

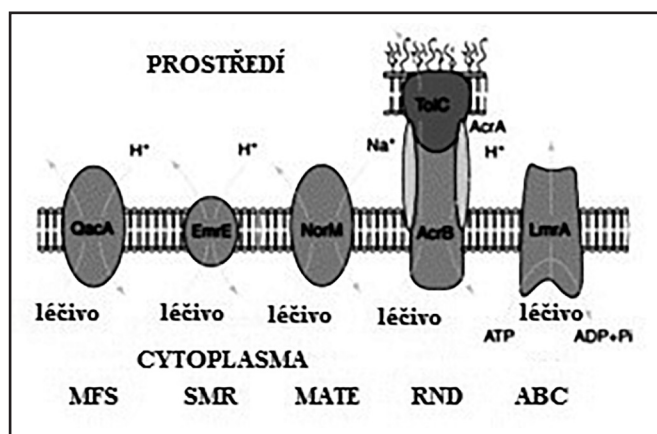
K dalším povrchům s rizikem vzniku infekce patří také kontaktní čočky, které osídlují zejména stafylokoky, rody *Proteus* a *Candida*, a dále *P. aeruginosa*⁷.

Antibiotická rezistence

Rezistenci k antimikrobiálním látkám obecně dělíme na absolutní (mikroorganismus nemá cílové struktury pro zásah danou antimikrobiální látkou) a relativní (není dosaženo potřebné koncentrace dané látky v plasmě)¹². Dále rozlišujeme rezistenci primární, která je daná genetickou výbavou mikroorganismu, a sekundární – tzv. získanou. Získaná rezistence je výsledkem mutace v chromozomu nebo získání nové genetické informace horizontálním přenosem, konjugací či transformací.

Z biochemického hlediska si mikroorganismy vyvinuly 4 následující hlavní mechanismy rezistence: modifi-

kace cílové struktury nebo syntéza zcela nové rozdílné struktury; produkce enzymu, inaktivujícího či modifikujícího antibiotikum; snížení počtu či redukce velikosti porinů, kterými některé antimikrobiální látky vstupují do buňky; a nakonec vypuzení antibiotika ven z buňky zprostředkované proteiny zakotvenými v membráně, které fungují jako efluxní pumpy (Obr. 2)¹³.



Obr. 2: Zástupci pěti základních skupin efluxních systémů souhrnně označovaných jako systémy schopné exportu léčiv z buněk (MES). Efluxní pumpy ze skupiny **RND** se vyskytují u gram-negativních bakterií a skládají se z více podjednotek – podjednotka TolC představuje kanálek ve vnější membráně, ostatní skupiny se od této skupiny odlišují nepřítomností tříšložkového membránového proteinu. Typickou skupinou vyskytující se u gram-pozitivních bakterií jsou **MFS** efluxní pumpy, zodpovědné například za export tetracyklinů. Stafylokoky disponují převážně efluxními pumpami ze skupiny **SMR**. Jako zdroj energie využívají tyto pumpy chemoosmotický tok, naproti tomu pumpy ze skupiny **MATE** využívají namísto antiportu vodíků sodík. **ABC** skupina představuje pumpu závislé na hydrolýze ATP, a vyskytuje se převážně u rodu *Campylobacter*²².

Rezistence biofilmu k antibiotikům

Snadno vznikající rezistence biofilmu k antimikrobiálním látkám není doposud zcela vysvětlena.

Biofilmy jsou obklopeny maticí složenou z polysacharidů, extracelulární DNA a proteinů, jež poskytují buňkám strukturní stabilitu a chrání je před různými činiteli, včetně antibiotik². Přesto extracelulární matrix není jedinou podporou života buněk v biofilmu. Tato ochranná vrstva tvoří jakousi počáteční bariéru, která může zpomalit penetraci antimikrobiálních látek¹⁴. K získání více informací o rezistenci biofilmu k antibiotikům je využíváno různých modelových systémů. Jedním z nich je simulace pomalého růstu buněčné populace v biofilmu. V případě, že mikroorganismy postrádají živiny, zpomalí se jejich reprodukce. Přechod z exponenciální fáze růstu do fáze stacionární je obvykle doprovázen zvýšením odolnosti k antibiotikům. V experimentálních studiích bylo touto metodou u *E. coli* a *S. epidermidis* prokázáno zvýšení citlivosti k antibiotikům tobramycinu a ciprofloxacinu, zvýšení růstové rychlosti bakteriální populace, proto lze předpokládat, že snížení růstové rychlosti naopak vede k vyšší míře rezistence biofilmu k antimikrobiálním látkám.

Pomalý růst mikroorganismů můžeme pozorovat především ve zralých biofilmech, kde jsou buňky ve stacio-

nární fázi 15x odolnější k antimikrobiálním látkám než buňky planktonní nacházející se ve stejné růstové fázi. Tohoto zpomalení není dosaženo pouze omezeným přísunem živin, ale především aktivací obecné stresové odpovědi, která vede ke změnám fyziologie buněk za účelem ochrany před nepříznivým vnějším prostředím. Centrálním regulátorem této odpovědi je σ faktor, o kterém se nejprve soudilo, že je exprimován pouze během stacionární fáze růstu. Nicméně nedávné studie ukazují, že je tvořen také při dosažení vysoké optické hustoty buněk v biofilmu¹⁴.

Biofilmy tvoří velmi složité struktury a obvykle se sestávají z heterogenních populací buněk nacházejících se v různých růstových stadiích. Metabolicky aktivní buňky na povrchu a pomalu rostoucí buňky uvnitř zralého biofilmu vykazují výrazně odlišné reakce, pokud jsou vystaveny působení antimikrobiálních látek. Například antibiotika fluorochinolony a tetracykliny jsou účinné pouze v inaktivaci metabolicky aktivních buněk, naproti tomu lipopeptid kolistin se osvědčil v případě bakterie *P. aeruginosa* i při eradikaci buněk uvnitř zralého biofilmu.

Mechanismy vzniku rezistence biofilmových struktur mohou být tedy různé a může docházet ke kombinaci více možností najednou.

Přírodní látky v kombinacích s konvenčními antibiotiky

Možnou strategií v boji proti rezistentním mikroorganismům je kombinace přírodních látek a konvenčních antibiotik. Jejich synergistické působení bylo prokázáno *in vitro* řadou experimentálních studií^{16,17,18,19}. Kombinace dvou nebo tří antimikrobiálních látek s pozitivní interakcí (kombinatorické terapie) nabývají v klinických aplikacích stále většího významu a jsou běžnou praxí v prevenci vzniku a rozvoje multirezistentních infekcí. Biologický systém je totiž jen velice omezeně schopen kompenzovat současné působení dvou nebo více látek.

Podpurný účinek pomocných látek závisí na mechanismu účinku konkrétní přírodní látky, může se jednat o doplnění účinku antibiotika, které samo o sobě narušuje tvorbu biofilmu (a tyto látky tak činí – dispergují biofilm na planktonické buňky, což má za následek zvýšení citlivosti k antibiotiku), ale také mohou disponovat vlastním biologickým účinkem stejně jako antibiotika. Tato adjuvantna můžeme označit jako sloučeniny modifikující rezistenci (resistance-modifying agents, RMAs), tj. sloučeniny, které mohou upravovat nebo inhibovat bakteriální mechanismy resistance. Do této skupiny řadíme např. inhibitory efluxních pump (EPs), které zabírají exportu antibiotika ven z buňky.

Návrat starších typů antibiotik, ke kterým jsou mikroorganismy rezistentní a musí se tudíž používat ve vyšších koncentracích, při kterých se již projevují nežádoucí účinky, by mohl být umožněn právě kombinací s RMAs. Kombinací těchto sloučenin s antibiotiky by mohlo dojít k potenciaci účinku, redukcí koncentrací antibiotik a nežádoucích účinků. Pokud by tyto látky prošly klinickým testováním, byl by umožněn návrat těchto antibiotik zpět do praxe⁴.

V poslední době řada experimentálních studií prokázala, že blokáda efluxních pump vede rovněž k narušení tvorby biofilmu prozatím neznámým mechanismem.

Genetická inaktivace jakékoli efluxní pumpy nebo její chemická inhibice má za následek zhoršení schopnosti tvořit biofilm u bakterií *Salmonella enterica*, *E. coli*, *P. aeruginosa* a *S. aureus*. Studium role efluxních systémů by mohlo vést k objevení nových možností v terapii infekcí spojených s biofilmy¹⁵.

In vitro synergistické působení přírodních látek s antibiotikem

V řadě experimentálních studií byly prokázány synergistické účinky přírodních látek a antibiotik.

Alkaloid reserpin snižuje až čtyřnásobně minimální inhibiční koncentraci (MIC) fluorochinolonů u *Staphylococcus aureus*.

Flavonoly kaempferol a quercetin v kombinaci s ciprofloxacinem působí synergicky proti mnoha gram-negativním bakteriím¹⁶. Baicalein, který má slabé antimikrobiální účinky (MIC = 100 mg/l), snižuje při koncentraci 25 mg/l MIC tetracyklinu ze 4 na 0,12 mg/l u methicilin-resistentního *S. aureus* (MRSA)¹⁷.

Rostlinné fenolické sloučeniny (např. biochain A, luteolin, verapamil, karvakol a resveratrol) působí jako inhibitory efluxních pump (EPIs), například v modelovém systému s ethidium bromidem, a tím snižují jeho MIC. Je-li biochain A, jehož MIC je 256 mg/l, aplikován při koncentraci 32 mg/l, snižuje MIC ethidium-bromidu až 32x v jeho účinku proti *Mycobacterium smegma-*

tis. Resveratrol, jehož MIC je u této bakterie 64 mg/l, snižuje při koncentraci 16 mg/l potřebnou dávku ethidium bromidu dvojnásobně¹⁸. Karvakol, jenž je hlavní složkou esenciálních olejů z *Thymus maroccanus* a *Thymus broussonetii* modifikuje rezistenci gram-negativních bakterií k ciprofloxacinu. U následujících gram-negativních bakterií *E. coli*, *Salmonella* sp., *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae* snižuje MIC ciprofloxacinu až čtyřikrát¹⁹.

Závěr

Vznikající rezistence mikroorganismů vůči komerčně používaným antibiotikům, jak v podobě suspenzních buněk, tak především ve formě biofilmu je problém, který staví lidstvo před nutnost hledání alternativních řešení. Podávání vyšších dávek antibiotik pacientům není vhodným východiskem, protože podporuje právě vznik těchto rezistencí a také zvyšuje riziko projevů vedlejších účinků.

Užívání přírodních látek buď samotných, anebo v kombinaci s antibiotiky, se zdá být možnou cestou k úspěchu. Látky, nejčastěji izolované z rostlin, bývají účinné v nízkých koncentracích a nepodporují vznik bakteriální rezistence²⁰.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/ 2015) a GAČR grantu 14-23597S.

Literatura

1. Wilkins M, Hall-Stoodley L, Allan RN, et. al.: *J. Infect.* 69, 47 (2014).
2. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, et. al.: *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 580 (2013).
3. Gyawali R, Ibrahim SA: *Food Control* 46, 412 (2014).
4. Abreu AC, Serra SC, Borges A, et. al.: *Diagn. Microbiol. Infect., DiS.* 79, 125 (2014).
5. Kumamoto CA: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 608 (2002).
6. Simões M, Simões LC, Vieira MJ: *Food Sci. Technol.* 43, 573 (2010).
7. Holá V: *Živa* 6, 271 (2012).
8. Dohnt K, Sauer M, Müller M, et. al.: *J. Microbiol. Methods* 87, 302 (2011).
9. Iversen K, Høst N, Bruun NE, et. al.: *Am. Heart J.* 165, 116 (2013).
10. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, et. al.: *Biomaterials* 33, 5967 (2012).
11. Dickson G: *Clin. Office Practic.* 41, 11 (2014).
12. Hampl F, Paleček J: *Farmakochemie (First edition)*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 293 – 340 (2002).
13. Périchon B, Courvalin P: *Enc. Microbiol. (Third Edition)*, Schaechter M, Ed. Academic Press: Oxford, 193-204 (2009).
14. Mah TFC, O'Toole GA: *Trends Microbiol.* 9, 34 (2001).
15. Sun J, Deng Z, Yan A: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 254 (2014).
16. Daglia M: *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 174 (2012).
17. Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S: *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1247 (2007).
18. Lechner D, Gibbons S, Bucar F: *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 345 (2008).
19. Fadli M, Saad A, Sayadi S, et. al.: *Phytomedicine* 19, 464 (2012).
20. Thebault P, Lequeux I, Jouenne T: *J. Wound Technol.* 21, 36 (2013).
21. Reid G, Hawthorn L, Eisen A, et al.: *Colloids Surf.* 42, 299 (1989).
22. Tegós GP, Haynes M, Strouse JJ, et. al.: *Curr. Pharm. Des.* 17, 1291 (2013).

Souhrn

Paldrychová M., Kvasničková E.: Antibiotická rezistence biofilmu

Růst oportunně patogenních či patogenních mikroorganismů ve formě biofilmu, jejich schopnost indukovat infekci, která často vede až k velice závažným chronickým onemocněním, a především jejich schopnost vzniku rezistence vůči běžně používaným antibiotikům je v současné době obrovský medicínský problém. Zvyšování podávaného množství antibiotik pacientům není řešením. Takový způsob léčby s sebou často nese projevy nebezpečných vedlejších účinků a naopak podporuje vznik rezistence u dalších druhů mikroorganismů. Navrhovanou alternativou je proto využití přírodních látek s prokazatelnou antimikrobiální či anti-biofilmovou aktivitou, a dále také jejich kombinace s konvenčními antibiotiky, která umožní snížení dávky antibiotika, nepodporuje další rozvoj rezistence a rovněž může umožnit vrátit některé starší typy antibiotik zpět do klinické praxe.

Klíčová slova: biofilm, rezistence, antibiotika, přírodní látky, synergistický efekt

Summary

Paldrychová M., Kvasničková E.: Antibiotic resistance of biofilm

The pathogenic or opportunistic pathogenic microorganisms' biofilm formation, induction of infection leading to serious chronic diseases and especially the emergence of resistance against standard used antibiotics is a huge medical problem. The use of antibiotics in higher concentrations is not a solution. Such method of treatment often causes the manifestations of dangerous side effects and supports the development of resistance in other microorganisms species. The use of natural substances with antimicrobial and anti-biofilm activity or their combination with conventional antibiotics is a proposed alternative, which enables the antibiotics dose reduction, does not support the additional resistance development and may allow return of some older antibiotics back into the clinical practice.

Keywords: biofilm, resistance, antibiotics, natural substances, synergistic effect

BIOFILMY VLÁKNITÝCH HUB

Vít Paulíček, Eva Kvasničková

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze; Vit.Paulicek@vscht.cz

Úvod

Biofilmy vláknitých eukaryot jsou oproti bakteriálním a kvasinkovým mikrobiálním společenstvím mladým tématem, které je doposud jen velmi málo prostudováno. Přestože existuje široká škála vlastností, které jsou pro tuto formu života všech mikroorganismů společné, lze u biofilmů vláknitých eukaryot nalézt mnoho významných rozdílů, které je potřeba správně definovat. Tímto způsobem je možné co nejvíce se přiblížit k nalezení řešení komplikací, jež ve spojení s tvorbou vláknitých biofilmů vznikají. Jedná se především o vážná onemocnění, která jejich výskyt a biologická aktivita provází.

Biofilm

Schopnost mikroorganismů žít a rozmnožovat se ve formě mnohobuněčného konsorcia, nazývaného biofilm, asociovaného k cizímu povrchu, se stala důležitým prvkem pro zvýšení šance na jejich přežití v nepříznivých podmínkách okolního prostředí. Můžeme tedy říci, že schopnost tvorby biofilmu se stala nástrojem přirozeného výběru. Mikrobiální biofilm lze definovat jako homogenní či heterogenní společenství mikroorganismů, tvořící trojrozměrnou strukturu, ireversibilně přichycenou k povrchu, přičemž buňky tohoto společenství jsou enkapsulovány prostřednictvím produkované extracelulární matrix (ECM). V současné době je mezi odborníky obecně uznávána skutečnost, že růst mikroorganismů na povrchu je často dominantním způsobem jejich životního stylu. Toto tvrzení doplňuje fakt, že více než 90 % mikroorganismů je schopno tvorby biofilmu¹. U většiny mikrobiálních biofilmů tvoří biomasa zhruba 10 % a extracelulární matrix 90 % hmotnosti sušiny biofilmu².

Biofilmy vláknitých eukaryot se stávají často diskutovaným tématem, především z důvodu zdravotních komplikací, které jejich výskyt a biologická aktivita provází. Jedním z hlavních znaků, ve kterých se tyto biofilmy liší od bakteriálních a kvasinkových biofilmů je jejich struktura, která je tvořena hustým propletením hyf. Biofilm vláknitých hub se nešíří jen po povrchu, ale prorůstá i do vnitřní struktury tkání či poddajných materiálů, za účelem získání živin nebo sporulace³. Další velký rozdíl spočívá v prostředí, ve kterém vláknitý biofilm roste. Bakterie a kvasinky jej tvoří ve vodném prostředí, kde jsou neustále pod vlivem střížných sil. Může se jednat o bioreaktory, průmyslové potrubí, chladicí věže,

ale i živé hostitele – zvířata a člověka. Biofilmy vláknitých hub rostou v tzv. nenasyceném prostředí, což je vzdušné prostředí s vysokým procentem vlhkosti. Spory se tedy častěji přenášejí vzduchem, než vodou³.

Společným znakem všech mikrobiálních biofilmů je zvýšená rezistence vůči mikrobicidním látkám a konvenčním terapeutickým metodám¹².

Struktura biofilmu vláknitých hub

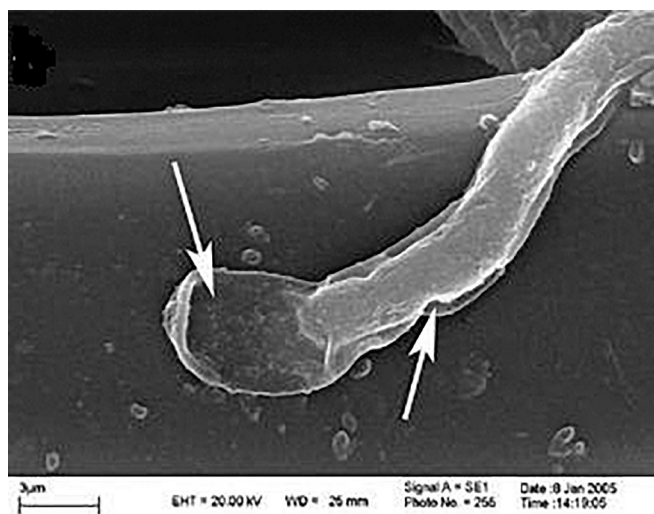
Trojrozměrná struktura biofilmu vláknitých hub je tvořena hustou spleť paralelních a křížících se hyf. Například u biofilmu *Aspergillus fumigatus* se ve struktuře vyskytuje dichotomické větvení v různém rozsahu. Dalším charakteristickým znakem pro biofilmy vláknitých eukaryot je přítomnost intersticiálních dutin a vodních kanálků, které hrají významnou roli při intenzifikaci přestupu hmoty jednak z okolí do biofilmu, ale i v opačném směru. Vznik těchto vodních kanálků je vysvětlován prostřednictvím tzv. vertikálně polarizovaného růstu a jejich množství má přímou spojitost se snížením vlivu difuze na limitaci růstu biofilmu^{1,4,5}.

U studií prováděných *in vitro* s plísní *A. fumigatus* byl prokázán významný vliv koncentrace konidií v inokulační suspenzi na strukturu a vlastnosti biofilmu. Při použití inokulační suspenze s nižší koncentrací (10^4 konidií/ml) vzniká hustý a snadno porušitelný biofilm, zatímco u vyšší koncentrace (10^6 konidií/ml) má biofilm méně rozvinutou komplexní strukturu a obsahuje méně biomasy. Filamentálně robustního a mechanicky odolného biofilmu je dosaženo při použití inokulační suspenze o koncentraci 10^5 konidií/ml⁴. Struktura fungálních biofilmů je specificky závislá na okolních podmínkách, druhu mikroorganismu a povrchu, na kterém dochází k vlastnímu formování. Strukturální vlastnosti zajišťují optimální prostorové uspořádání pro látkovou výměnu a rovněž i pro komunikaci buněk mezi sebou a s okolím⁶. Pro studium trojrozměrné struktury biofilmu se využívá sofistikovaných mikroskopických technik, jako jsou konfokální a elektronová mikroskopie¹.

Extracelulární polymerní matrix (ECM)

ECM určuje bezprostředně životní podmínky pro buňky v biofilmu, a vytváří tak mikroprostředí, které je ovlivňováno její porozitou, hustotou, obsahem

vody, nábojem, sorpčními vlastnostmi, a hydrofobitou. Z tohoto důvodu jsou mikroorganismy schopné kolonizovat i místa s nevhodnými podmínkami pro jejich růst. ECM můžeme definovat jako konglomerát rozdílných biopolymerů, které jsou produkovány a sekretovány buňkami biofilmu. Biopolymery vytvářejí základ, „lešení“, trojrozměrné struktury biofilmu^{2,7}. Tato matrix je jedním z nástrojů zvýšené rezistence biofilmu vůči mikrobicidním látkám a jiným nepříznivým podmínkám prostředí biofilmu (např. vysychání, oxidace, přítomností kovových iontů, UV záření, predátorské chování prvoků, imunitní odpovědi hostitelského organismu), a tím vytváří tzv. první obrannou linii biofilmu. Její funkce ochranného štítu je založena především na jejích fyzikálních a biologických vlastnostech. Díky její hlenovité konzistenci dochází ke snížení difuze antimikrobních látek do biofilmu. Kvalitativní a kvantitativní složení je závislé na daném mikroorganismu a na vnějších podmínkách. Obecně lze však říci, že v ECM se vyskytují polysacharidy, monosacharidy, dusíkaté deriváty sacharidů, proteiny (mnoho enzymů), sekundární metabolity a extracelulární DNA (eDNA)⁸. Například u plísňe *A. fumigatus* je hydrofobní ECM složena z galaktomananů, α -(1,3)-glukanů, galaktosaminogalaktanů, glukózy, trehalózy, manózy, galaktózy, rhamnózy, melaninu, proteinů (např. antigeny a hydrofobiny), glykoproteiny a glykolipidy^{4,7}. Na základě studií, které byly prováděny na biofilmu plísňe *Aspergillus niger*, bylo zjištěno, že je-li biofilm vystaven stresovým podmínkám (např. nízká aktivita vody) dochází k zvýšení produkce ECM⁴. Strukturální stabilita, kterou ECM poskytuje biofilmu, je způsobena hydrofobními interakcemi, zesílením zprostředkovaným více vazebnými kationty, propletením biopolymerů a přítomností eDNA⁷. Jak vyplývá z výše uvedených informací, ECM imobilizuje buňky v biofilmu (Obr. 1), které jsou vzájemně ve vhodné vzdálenosti tak, aby mohly probíhat mezibuněčné interakce (např. mezibuněčná komunikace). Tato matrix funguje také jako místo „recyklace“ komponent lyzovaných buněk, které tak jsou k dispozici živým buňkám².



Obr. 1: Terminální část hyfy plísňe *Aspergillus niger* obalená ECM⁹.

Voda

Nejvíce zastoupenou látkou v ECM je voda. Protože ECM je vysoce hydratovaným prostředím, dochází k jejímu pomalejšímu vysychání v porovnání s okolím a tvoří tak zásobu vody pro buňky biofilmu. Voda je v ECM udržována spíše entropicky než prostřednictvím jiných mechanismů².

Exopolysacharidy

Exopolysacharidy jsou hlavní složkou ECM u většiny mikrobiálních biofilmů. Nejčastěji se jedná o lineární nebo větvené molekuly s hmotností od $0,5 \times 10^6$ Da do 2×10^6 Da. Tyto polysacharidy mohou být využívány v případě, že se v prostředí nevyskytuje vhodný zdroj uhlíku, nebo že se nevyskytuje v dostatečném množství². Prostřednictvím mikroskopických technik bylo zjištěno, že některé polysacharidy tvoří vlákna spojená s povrchem buňky. Tato jednotlivá vlákna vytvářejí ve výsledku komplexní síťovitou strukturu. Většina polysacharidů patří do skupiny heteropolysacharidů, které jsou tvořeny zbytky neutrálních a nabitých cukrů. Mohou obsahovat organické nebo anorganické substituenty, které výrazně ovlivňují jejich fyzikální a biologické vlastnosti. V případech, kdy je v exopolysacharidech zastoupen alginát, xanthan a kyselina kolanová hovoříme o polyaniontových polysacharidech².

Extracelulární proteiny

U některých *in vivo* biofilmů (např. na tkáních) mohou tvořit tyto proteiny kvantitativně majoritní skupinu biopolymerů v ECM a jsou zastoupeny především enzymy a strukturálními proteiny. Kvalitativní zastoupení enzymů je velice variabilní, ale většina z nich má funkci degradace ve vodě rozpustných biopolymerů (např. některé polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny) i nerozpustných (celulóza, chitin, lipidy) a ostatních organických sloučenin. V ECM jsou zastoupeny i enzymy, které mají za úkol zajišťovat ochranu biofilmu před terapií. Hlavními zástupci strukturálních proteinů jsou periferní proteiny a glykoproteiny, které se zapojují do polysacharidické sítě, stabilizují ji a představují spojovací článek mezi buňkou a biopolymery v ECM².

Extracelulární DNA

Přesná funkce extracelulární DNA v ECM není dosud zcela objasněna. V některých případech je tato složka zastoupena ve vysokém množství. Do současné doby bylo zveřejněno několik teorií, týkajících se její funkce (např. přenašeč elektronů, komunikační prostředek, struktura pro pohyb buněk v rámci biofilmu). Lze nalézt podobnost sekvence této DNA s DNA genomovou, avšak jsou zde i výrazné rozdíly. Bylo by zcela mylné se domnívat, že veškerá eDNA, která je obsažena v ECM, pochází pouze z lyze buněk v biofilmu. Zůstává tu však otázka týkající se buněčné energetiky. Molekula DNA je z hlediska metabolické ekonomiky drahou sloučeninou a není zatím zcela objasněno, zda její sekrece dokáže přinést buňkám dostatečný užitek⁷.

V každém případě je eDNA důležitým prvkem ECM, který napomáhá zvýšit strukturální integritu biofilmu. Množství eDNA, uvolněné buněčnou lyzí, které se vy-

skytuje v ECM je přímo spojeno s úrovní resistance vůči antifungálním látkám a hraje tedy důležitou úlohu v resistenci biofilmu⁸.

Studie zaměřené na bakteriální biofilmy prokázaly, že transport eDNA z buněk je řízen prostřednictvím systému *quorum – sensing*⁷. U biofilmů vláknitých hub nebyl tento mechanismus do současné doby popsán.

Quorum – sensing

Co se týče regulačních mechanismů, bakterie a kvasinky používají právě zmíněné *quorum – sensing*. Jedná se o regulační proces, kterým buňky dokáží určit hustotu buněk v populaci a ovlivnit tak další růst a morfologii biofilmu. Při tomto procesu buňky biofilmu produkují signální molekuly, které vyvolávají specifické odezvy, jako například virulenci či bioluminiscenci. U eukaryotických organismů byl poprvé popsán u *C. albicans* a jednalo se o látku farnesol. Zatímco u bakterií a kvasinek je tento systém nedílnou součástí regulace biofilmu, u vláknitých hub jsou zatím poznatky omezené. I přes to ale plní důležité funkce, jako je inhibice klíčení spor. Jiné naopak inhibují růst mycelia a podporují tvorbu spor, nebo dokonce dokáží měnit formu růstu z pučení na vláknitý růst^{3,10}.

Tvorba biofilmu vláknitých hub

Proces formování biofilmu lze rozdělit do tří fází: 1) adheze buněk na povrch, v závislosti na charakteru dané eukaryoty (např. konidie, hyfy), 2) germinace konidií a tvorba tzv. monovrstvy, 3) zrání biofilmu, během kterého dochází k zvýšení množství biomasy a k tvorbě vodních kanálků a intersticiálních dutin¹¹.

První a druhý krok tvorby biofilmu vláknitých hub je stejný jako u bakterií – adsorpce a adheze. U třetího kroku – tvorba mikrokolonií nastává změna. Vznikají hyfy, které vyrůstají z vrstvy buněk. Dále je produkována ECM, která překrývá jak buňky, tak hyfy. Ve čtvrtém kroku vzniká kompletní biofilm, složený z buněk a hyf, který je protkaný sítí kanálků určených k dopravě živin³.

Harding a kol. (2009) uvádí ve své práci následující model formování biofilmu vláknitých eukaryot, který je odvozen z poznatků získaných ze studií bakteriálních a kvasinkových biofilmů (Obr. 2).

Adsorpce spor a vláknitých útvarů

Tato fáze je klíčová pro další formování biofilmu a její mechanismus se zde celkem výrazně liší od bakterií a kvasinek. Zatímco bakterie a kvasinky adherují na povrch přímo buněčnými strukturami, vláknité houby

začínají celý cyklus pomocí spor, sporangií nebo fragmentů hyf¹¹.

Aktivní přichycení k povrchu

K aktivnímu přichycení dochází prostřednictvím molekul, které jsou sekretovány během aktivního klíčení spor¹¹.

Obecně u plísní k adhezi spor na biotický či abiotický povrch dochází na základě mnoha komplexních fyzikálně-chemických a biologických mechanismů. Důležité jsou fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu, které ji podporují a jsou pro ni klíčové. Jsou to především hydrofobita, elektrostatický náboj a drsnost. Význam těchto vlastností byl v minulosti popsán i u tvorby bakteriálních a kvasinkových biofilmů¹¹.

Formování mikrokolonie I

Po germinaci spor nastává stádium kolonizace, kdy se hyfy rozrůstají, začíná se vytvářet monovrstva a produkuje se ECM, která umožňuje přichycení tvořící se komplexní struktury k povrchu¹¹.

Zrání biofilmu

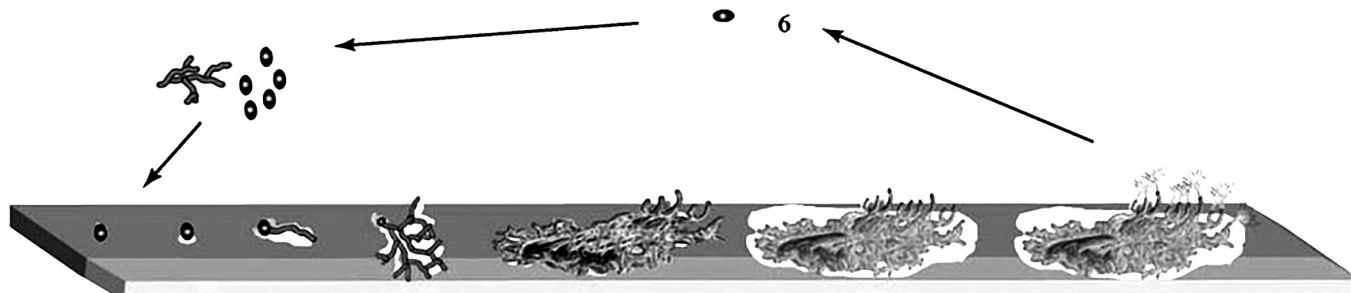
Kromě výrazného rozvoje celkové komplexnosti biofilmového systému se začínají tvořit také fruktifikační orgány. Jedním z dějů, ke kterým dochází během zrání biofilmu je snížení metabolické aktivity buněk a tvorby hydrofobinů a proteinů, které se účastní biosyntetických drah sekundárních metabolitů¹¹.

Uvolnění planktonických buněk

Poslední stádium uzavírá kruh procesu tvorby biofilmu. Planktonické buňky, ať již spory či fragmenty vláken, které opouštějí biofilm, jsou schopny za určitých podmínek vytvořit nový biofilm a začít tak celý cyklus od začátku¹¹.

Závěr

U biofilmů vláknitých eukaryot se setkáváme s určitou podobností jako s biofilmy tvořenými bakteriemi a kvasinkami (netvořícími vláknité struktury). Tento druh buněčného konsorcia vykazuje zvýšenou odolnost vůči nepříznivým vnějším podmínkám. Problematika biofilmů vláknitých eukaryot je relativně nové téma a je proto nezbytné se jí věnovat, především z hlediska vzniku zdravotních komplikací, které jsou doprovázeny činnostmi některých mikroorganismů patřící do této skupiny (např. *A. fumigatus*). V následujícím kroku pak aplikovat tyto poznatky do praxe při hledání látek, které jsou



Obr. 2: Formování biofilmu vláknitých eukaryot; 1- adsorpce spor a vláknitých fragmentů, 2 – aktivní přichycení k povrchu, 3 – formování mikrokolonie I, 4 – formování mikrokolonie II, 5 – zrání biofilmu, 6 – uvolnění planktonických buněk³.

schopny ovlivnit tyto biofilmy. Léčit onemocnění, jejichž přesný vznik a původ není zcela znám je totiž téměř nemožné a často tak dochází k vysoké mortalitě pacientů. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné studovat tyto nové mikrobiální systémy a hledat cesty k jejich lepšímu pochopení, které povede ke snazší likvidaci těchto pro člověka často velmi nebezpečných infekčních struktur.

Literatura

1. Villena GK, Fujikawa T, Tsuyumu S, et al.: *Bioresour Technol.* 101, 6 (2010).
2. Flemming HC, Wingender J: *Nat Rev Microbiol.* 8, 9 (2010).
3. Harding MW, Marques LL, Howard RJ, et al.: *Trends Microbiol.* 17,11 (2009).
4. Kaur S, Singh S: *Med. Mycol.* 52, 1 (2014).
5. Stewart PS: *J. Bacteriol.* 185, 5 (2003).
6. Rumbaugh KP, Iqbal A: Inhibition of fungal biofilms., In: *Antibiofilms Agents*, Springer, Heidelberg, 273-279 (2014).
7. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ: *J. Bacteriol.* 189, 22 (2007).

Souhrn

Paulíček V., Kvasničková E.: Biofilmy vláknitých hub

Schopnost mikroorganismů žít ve formě mnohobuněčného konsorcia, nazývaného biofilm, je jedním z rozhodujících prvků jejich přežití v nepříznivých podmínkách okolního prostředí. Biofilmy, které tvoří patogenní či oportunně patogenní zástupci vláknitých eukaryot, jsou novým a velice málo prostudovaným tématem. Tyto biofilmy jsou často velmi odolné vůči metodám konvenční terapie a jsou zdrojem řady zdravotních komplikací. Pro nalezení vhodných metod léčby je důležité rozšíření doposud jen sporadických znalostí o vlastnostech těchto biofilmů.

Klíčová slova: biofilm, biofilm vláknitých eukaryot, struktura biofilmu, tvorba biofilmu

Summary

Paulíček V., Kvasničková E.: Biofilms of filamentous fungi

The property of microorganisms to live and reproduce themselves in multicellular aggregates, called biofilm is one of the essential features of their survival abilities in unfavorable conditions. Biofilm which are formed by pathogenic or opportunistic pathogenic filamentous fungi are a new and slightly studied topic. These biofilms are often resistant to conventional therapeutic methods and they are causative agents of many medical complications. It is very important to extend the sporadic knowledge about these biofilms for finding biofilm-associated infections treatment.

Keywords: Biofilm, Filamentous fungi biofilm, Structure of biofilm, Formation of biofilm

OPORTUNNĚ PATOGENNÍ KVASINKY RODU *CANDIDA*

Dávid Kunderát, Eva Kvasničková

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze; kunderatd@vscht.cz

Úvod

Kvasinky jsou běžnou součástí každodenního života. Vyskytují se jako komenzální mikroorganismy například na lidské kůži, nebo v mikroflóře trávicího traktu. Ne vždy je však jejich působení prospěšné. Mnoho zástupců kvasinek řadíme do kategorie oportunních patogenů, jelikož za vhodných podmínek, jakými jsou například otevřené rány nebo oslabená imunita, se tyto kvasinky stávají infekčními mikroorganismy, které způsobují celou řadu závažných onemocnění. Převážnou většinu lokálních mykóz a fungemií způsobují kvasinky rodu *Candida*, především druh *Candida albicans*¹.

Největší riziko vzniku těchto onemocnění je spojeno s pobytem v nemocničních zařízeních, jako důsledek častého nedodržování správných hygienických zásad v těchto prostorech. Velikou roli zde však má i tvorba biofilmů právě zmíněnými oportunními patogeny. Tyto

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokýškolský výzkum (MŠMT č. 20/ 2015) a GAČR grantu 14-23597S.

8. Singh R, Shivaprakash MR, Chakrabarti A: *Microbiology.* 157, 9 (2011).
9. Gutiérrez-Correa M, Ludena Y, Ramage G, et al.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 5 (2012).
10. Blakeship JR, Mitchell AP: *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 6 (2006).
11. Ramage G, Rajendran R, Gutiérrez-Correa M, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 324, 2 (2011).
12. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, et al.: *Int. J. Microbiol.* DOI:10.1155/2012/528521 (2012).

strukтуры jsou vysoce rezistentní vůči běžně používaným antimikrobiálním látkám, a proto se stávají zdrojem infekcí, které lze jen velmi obtížně odstranit².

Rod *Candida*

Kvasinky, rodu *Candida*, jsou obecně malé buňky ovoidního charakteru s tenkou buněčnou stěnou¹. Vyskytují se v širokém spektru prostředí od půdy a vodních zdrojů, až po kůži a trávicí trakt zvířat a člověka. Tento rod zahrnuje velké množství druhů (přibližně 300), avšak největší pozornost je věnována oportunním patogenům, které jsou příčinou vážných onemocnění³.

Mezi tři hlavní původce houbových infekcí řadíme dva rody z oddělení askomycet, *Candida spp.* a *Aspergillus spp.* a jeden rod z oddělení basidiomycet, *Cryptococcus spp.*, přičemž rod *Candida* je zodpovědný za vznik 42 % všech houbových infekcí. Celkový podíl rodu *Candida* na nozokomiálních nákazách je 8 až 10 %⁴.

Nejlépe prostudovanými kvasinkami rodu *Candida* jsou *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a *Candida tropicalis*, z nichž největší podíl na případech kandidémie s výskytem až v 60 % ze všech případů má *C. albicans* ^{2,3}.

Candida albicans

C. albicans je jedním z nejčastěji se vyskytujících lidských patogenů, způsobující houbové infekce nejen na povrchu sliznic a kůže, ale také v krevním oběhu a v přilehlých tkáních⁵. Vzhledem k jejímu širokému výskytu je tento druh velmi pečlivě studován a je využíván jako modelový mikroorganismus při výzkumu týkajícím se kvasinek rodu *Candida*³.

Faktory, které způsobí, že se *C. albicans* projeví jako nebezpečný mikroorganismus, jsou velmi rozmanité. Může to být snížení imunity podáváním imunosupresiv nebo důsledek nemoci AIDS, avšak některé studie poukazují i na věk pacientů, jakožto determinant rizika nákazy *C. albicans*. Nemalou roli v patogenitě daného mikroorganismu hraje také genetická výbava konkrétního kmene⁶.

Candida glabrata

C. glabrata je po *C. albicans* druhou nejčastěji izolovanou kvasinkou z krevního oběhu lidí. Až donedávna byl tento druh považován za čistě saprotrófní mikroorganismus, avšak rozšířené používání imunosupresiv a širokospektrálních antimykotik způsobilo zvýšení výskytu infekcí, které má na svědomí tato kvasinka⁷.

Podstata virulence není v tomto případě dostatečně prostudována, přestože výskyt *C. glabrata* vzrůstá. Problémem je také vznikající rezistence vůči azolovým antimykotikům (flukonazol a jiné), o které se zmiňují mnohé nezávislé studie. V konečném důsledku jsou tyto zmíněné faktory příčinou vyšší úmrtnosti pacientů při infekcích způsobených *C. glabrata* v porovnání s infekcemi *C. albicans*^{7,8,9}.

Jednou z hlavních odlišností *C. glabrata* od ostatních kvasinek rodu *Candida* je její blízká příbuznost se *Saccharomyces cerevisiae* a také její haploidní genom, který je v kontrastu s diploidním genomem ostatních oportunních patogenů rodu *Candida*. I tyto rozdíly mohou být podstatou odlišného chování *C. glabrata* při infekci lidského organismu⁹.

Candida parapsilosis

Množství případů, kdy je původcem kvasinkové infekce *C. parapsilosis* je porovnatelné s výskytem *C. glabrata*. Jelikož je *C. parapsilosis* významnou součástí mikroflóry kůže a nehtů, je často izolována z tinea pedis (mykóza chodidlové části nohy), ale také z onychomikózy a otomykózy⁴¹. *C. parapsilosis* se také velmi často vyskytuje v případech, kdy je pacientem novorozeneček¹⁰. Děti po narození jsou vystaveny velkému riziku, jelikož jejich imunitní systém a pokožka ještě nejsou dostatečně vyvinuté, a proto se nedokáží účinně bránit napadení mikroorganismy a následně vznikající infekci¹¹.

Situace se ještě více komplikuje u nedostatečně vyvinutých novorozenců, kteří jsou nuceni dlouhodobě přijímat výživu parenterální cestou, například pomocí

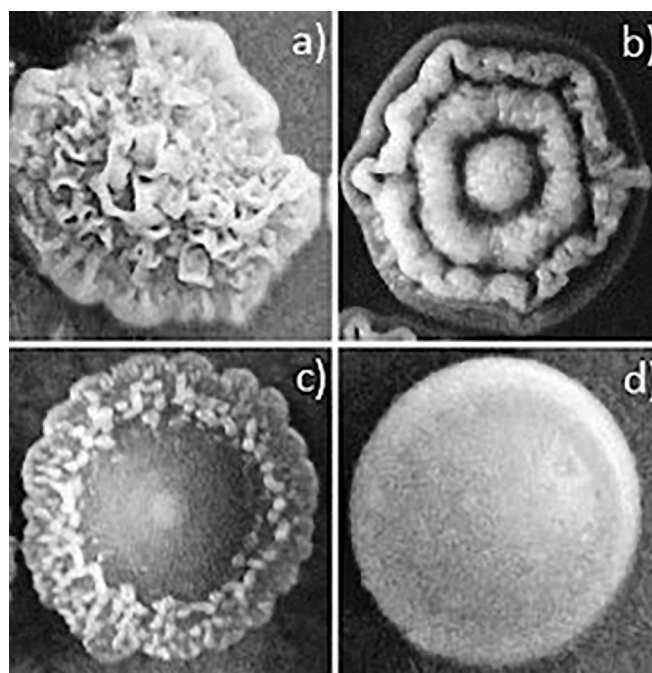
centrálního žilního katétru. Tento způsob výživy sebou přináší velké riziko vzniku infekce spojené s osídlením katétru biofilmem. Použití antibiotik v těchto případech není efektivním řešením, jelikož biofilm je vůči antibiotikům do velké míry rezistentní a tak je často jediným řešením výměna celého zařízení^{12,13}.

Fenotypová variabilita rodu *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* jsou specifické svou velkou fenotypovou variabilitou. Změny fenotypu jsou běžné i v rámci jednoho kmene, přičemž tato změna může být spontánní, avšak mnohem častěji je indukovaná konkrétním působením okolního prostředí¹⁴.

Tvar kolonií

Fenotyp je faktor, který má dopad na mnohé vlastnosti jak samotné kvasinky, tak na celou populaci kvasinek. Jedním ze znaků změny fenotypu, který je nejlépe sledovatelný, je tvar kolonií (Obr. 1). Tento makroskopický znak je velmi rozmanitý mezi jednotlivými druhy i kmeny¹⁵.



Obr. 1: Čtyři různé fenotypy *C. parapsilosis*: a) krepovitý, b) koncentrický, c) kráterovitý a d) hladký ¹⁵.

Tvorba vláknitých struktur

Různé fenotypy se liší nejen makroskopickými, ale i mikroskopickými znaky. Kvasinky mohou vytvářet kolonie typicky oválných buněk, nebo mohou tvořit vláknité struktury. Tato vlastnost se většinou vztahuje na konkrétní kmeny, které mají větší, nebo menší predispozici tvořit pseudomycelium. V přirozeném prostředí je kultura ve většině případů tvořena směsí obou typů těchto buněk¹⁶.

Různé fenotypy v případě *C. parapsilosis* ovlivňují i množství biomasy, které kvasinky vytvoří. Rozdíly mezi jednotlivými fenotypy popisují ve své studii Laffey a Butler (2005). Koncentrický fenotyp, který můžeme sledovat především u kvasinek tvořících pseudomycelium, dominuje v množství vznikající biomasy v po-

rovnání s ostatními fenotypy, avšak rychlost nárůstu kultury je největší v případě hladkého fenotypu, který je tvořen oválnými kvasinkovými buňkami¹⁵.

Patogenita

Kromě morfologických rozdílů se různé fenotypy odlišují i v patogenitě. Fenotypy tvořící pseudomycelium jsou obecně více invazivní, než fenotypy tvořené normálními buňkami. Tento trend je vysvětlován schopností pseudomycelia pronikat do tkání hostitelského organismu, zatímco běžné kvasinkové buňky touto schopností nedisponují¹⁷.

Zajímavým faktem, který je spjat s celkovou patogenitou *C. albicans*, je i hydrofobita buněk. Fenotyp tvořící pseudomycelium se vyznačuje mnohem vyšší hydrofobitou než obyčejné buňky a může tak rychleji a lépe kolonizovat pevné hydrofobní povrchy v porovnání s fenotypem, který je tvořen běžnými oválnými buňkami^{17,18}.

Mykózy

Mykóza je onemocnění způsobené plísněmi nebo kvasinkami. Obecně dělíme mykózy podle místa výskytu na lokální, které se vyskytují na kůži a sliznicích a systémové, kdy se kvasinky nebo plísně vyskytují v krevním oběhu a v tkáních orgánů¹².

Lokální mykózy

Lokální mykózy jsou způsobovány plísněmi a kvasinkami, které se vyskytují na lidské kůži jako komenzální mikroorganismy. V případě snížené imunity se mohou tyto mikroorganismy nekontrolovatelně rozmnožit a způsobit nepříjemné záněty kůže a nehtů. Původci těchto onemocnění jsou především mikrobiální rody *Candida* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp. a *Epidermophyton* spp. Tyto mikroorganismy jsou schopny využívat keratin, jako zdroj živin a proto je pro ně kůže ideálním prostředím. Záněty nejsou život ohrožující, avšak jsou velice nepříjemné, protože jsou doprovázeny intenzivním svěděním¹⁹.

C. albicans je nejčastějším původcem mykóz sliznic například v plicích, gastrointestinální soustavě či vagíně. Na rozdíl od mykóz na kůži je u tohoto druhu mykózy vyšší riziko přenosu kvasinky do krevního oběhu, jelikož sliznice jsou obecně velmi dobře prokrveny²⁰.

Systémové mykózy

Systémová mykóza, neboli fungémie je stav, kdy jsou kvasinky nebo plísně přítomny v krevním oběhu a v tkáních orgánů člověka. Fungémií mohou být postižení především lidé s oslabeným imunitním systémem, přičemž důvody oslabené imunity mohou být například dlouhodobé užívání antibiotik, steroidních léčiv, či chemoterapie. Fungémie se mohou projevit i v kombinaci s jiným onemocněním, například AIDS, jelikož jedinci postižení virem HIV ztrácí schopnost obrany vůči patogenům. Mezi obecné rizikové faktory patří také věk pacientů, kdy jsou nejvíce postiženou skupinou malé děti a staří lidé^{21,22}.

Pojmem kandidémie označujeme fungémii, která je způsobená kvasinkou rodu *Candida*. Tyto infekce jsou velmi nebezpečné z důvodu velmi rychlého šíření in-

fekce po celém těle pacienta. Kvasinky se pomocí krevního oběhu dostávají do mozku, srdce, jater a dalších důležitých orgánů těla a způsobují tak velké poškození organismu v poměrně krátkém čase²³.

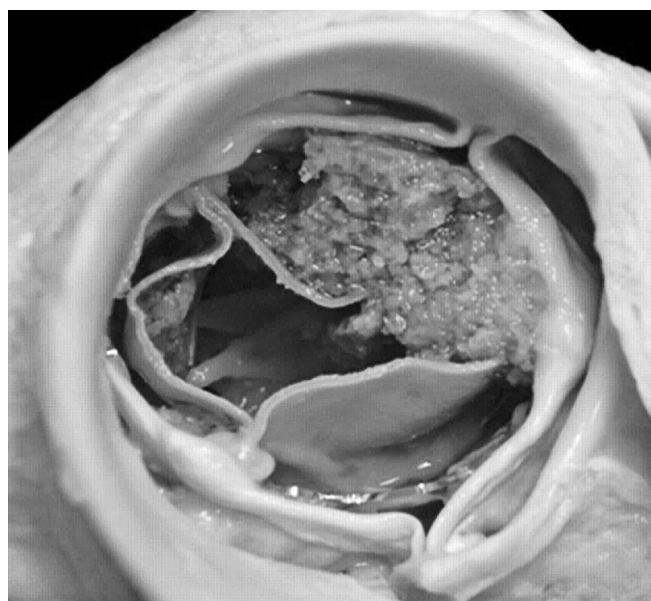
Dalším faktem, který řadí kandidémie do kategorie vážných onemocnění je vysoká mortalita pacientů trpících touto infekcí. Průměrná mortalita u infekcí způsobených *C. parapsilosis* je přibližně 29 %, zatímco mortalita pacientů postižených *C. albicans* je až 45 %¹².

V případě rozšíření kvasinky krevním řečištěm po celém těle vznikají infekce v jednotlivých orgánech těla. Mezi nejzávažnější patří endokarditida (zánět vnitřní výstelky srdce), meningitida (zánět mozkových blan), či peritonitida (zánět pobřišnice). Méně častými případy jsou záněty kloubů a oční infekce¹².

Endokarditida

Endokarditida je zánět tkáně uvnitř srdce, přičemž nejčastějším případem je zánět srdečních chlopní (Obr. 2).

Tato tkáň není aktivně prokrvena, a tudíž není přímo chráněna imunitním systémem (bílé krvinky) a je proto náchylnější na vznik infekce. Neléčená endokarditida může vést k trvalému poškození srdečních chlopní a následné smrti²⁴.



Obr. 2: Srdeční chlopeň zasažená rozsáhlou kvasinkovou infekcí²⁵.

Meningitida

Meningitida je akutní zánět mozkových blan, které pokrývají mozek a míchu. Toto onemocnění je doprovázeno mnoha symptomy, jakými jsou například bolesti hlavy, ztuhlý krk, horečka či zvracení. Meningitida je nebezpečné onemocnění především z toho důvodu, že i při včasné léčbě hrozí pacientovi vážné trvalé následky, například epilepsie, hluchota či poruchy vnímání²⁶.

Peritonitida

Pobřišnice je tenká vrstva tkáně, která obaluje orgány břišní dutiny. Zánět pobřišnice neboli peritonitida je nejčastěji způsoben rupturou dutých orgánů v břišní dutině, ale může být také výsledkem neléčené apendicitidy (zánět přívesku slepého střeva) či fungémie. Toto

onemocnění způsobuje u pacienta silné bolesti v oblasti břicha, spojené se zácpou, nevolností a horečkou. Při delším zanedbání se může rozvinout do těžké sepsy s následným selháním důležitých orgánů²⁷.

Biofilm

Sledování mikroorganismů se po velmi dlouhou dobu soustředilo na samostatné buňky a jejich vzájemná spolupráce a komunikace byla často opomíjena. V současné době se však pozornost přesouvá k biofilmům, jelikož tato forma výskytu mikroorganismů je v přírodních ekosystémech převažující. Také v případě infekcí lidského organismu se mikroorganismy často vyskytují ve formě biofilmu a zvyšují tak závažnost a často i mortalitu infekčních onemocnění. Právě z tohoto důvodu je nutné se intenzivně věnovat problematice tvorby a fungování biofilmu²⁸.

Pojmem biofilm je označována široká paleta mikrobiálních komunit, které se vyskytují především na rozhraní kapalného a pevného prostředí. Toto seskupení buněk je přichyceno na pevný povrch pomocí extracelulárních polymerních látek (EPS), které buňky obalují a také je propojují mezi sebou²⁸.

Biofilmy můžeme nalézt v přírodním prostředí, jakým jsou například řeky nebo moře a jsou také přirozenou součástí ústní a střevní mikroflóry. Mikroorganismy však nepohrdnou ani životem v prostředí, které bylo vytvořené lidmi, jakým je například vodovodní systém měst a průmyslu, nebo umělé implantáty v lidském organismu. Právě v těchto případech je přítomnost biofilmu nežádoucím faktorem²⁹.

Výhody existence buněk ve formě biofilmu

Mikroorganismy, které se v prostředí vyskytují ve formě biofilmu, jsou v porovnání se svými planktonickými protějšky ve zvýhodněném postavení. Matrix biofilmu, která buňky obaluje je tvořena sítí polysacharidů, proteinů a extracelulárních nukleových kyselin³⁰. Tato struktura poskytuje buňkám biofilmu komplexní ochranu vůči mnoha vlivům prostředí, které by jinak buňky zahubily. Mezi buňky ohrožující faktory patří například vysoká salinita, intenzivní UV záření nebo přítomnost těžkých kovů, či velké výkyvy pH a teploty³¹.

Zvýšená odolnost vůči antibiotikům

Největší pozornost je však věnována zvýšené odolnosti biofilmu vůči komerčně používaným antibiotikům. Snížená citlivost k antibiotikům není způsobena jedním specifickým činitelem, nýbrž několika samostatnými faktory. Velká diverzita mechanismů rezistence vůči antibiotikům přispívá k tomu, že je tato problematika značně složitá, jak po stránce biologické, tak po stránce chemické a fyzikální²⁸.

Jedním z hlavních principů zvýšené odolnosti biofilmu je funkce matrix biofilmu jako molekulárního síta, které mechanicky brání přístupu účinných látek k buňkám biofilmu³².

Dalším faktorem je distribuce živin v biofilmu. Ta nemusí být stejná ve všech částech biofilmu, což vede ke vzniku oblastí, ve kterých mají buňky nedostatek potřebných látek, a proto zpomalí svůj metabolismus.

Jelikož většina antibiotik má podstatně větší efektivitu při zabíjení rychle rostoucích buněk, jejich účinek je v těchto oblastech velmi malý³³.

Ve spojení s rezistencí biofilmu k antibiotikům je také věnována pozornost buňkám, které jsou nazývány „pervister cells“ (buňky přetrvávající na pevném povrchu i po léčbě pomocí antibiotik). Studie zabývající se tímto jevem říkají, že buňky v biofilmu nemusí být nevyhnutně odolnější vůči antibiotikům, ale problém tkví v tom, že biofilm se nikdy nepodaří odstranit úplně. Několik buněk, které přežijí působení antibiotik je schopných postupem času vytvořit nový, zcela vyvinutý biofilm, který se stává základem nové infekce³⁴.

Tyto přeživší buňky si navíc mohou vytvořit toleranci na dané antibiotikum a tuto informaci předat dalším generacím buněk, čímž se vytváří biofilm složený z buněk, které jsou vůči antibiotiku zcela imunní. To má za následek prodloužení léčby pacienta a také zvýšené náklady na jeho léčbu³⁴.

Specifická exprese genů v biofilmu

Tvorba biofilmu začíná ve většině případů přichycením mikroorganismu na pevný povrch, nebo na buňky hostitelského organismu. Tato interakce však neslouží jen k ukotvení buňky, ale vyvolává také změny v genové expresi, které jsou v mnoha případech esenciální pro další růst biofilmu. Mnohé studie se zabývají těmito změnami, jelikož mají vliv na důležité vlastnosti biofilmu, jakou je například i zvýšená odolnost biofilmu vůči antibiotikům³⁵.

Genovou expresí v biofilmu *C. albicans* se intenzivně zabývá několik vědeckých skupin^{36,37,38}. Geny rozdělují do několika funkčních skupin, podle jejich funkce v metabolismu a buněčném cyklu. Z těchto studií je patrné, že změna genové exprese je ve velké míře závislá na konkrétním kmenu *C. albicans*, avšak v určitých výsledcích a závěrech se shodují. Změna genové exprese se projevuje přibližně u 5 % genů z celého genomu a většinou se jedná o zvýšení exprese těchto genů^{36,37,38}.

Při studii genové exprese v biofilmu je také nutné zohlednit fakt, že proces tvorby biofilmu má několik fází, od prvotní adheze buněk, až po vytvoření zralého biofilmu. V různých fázích tvorby biofilmu se mění i genová exprese a to nám může v mnoha případech pomoci objasnit procesy spojené s vytvářením biofilmu³⁶.

Geny metabolismu

Nejvýraznější změna je zaznamenána u genů, které se podílí na metabolismu aminokyselin a proteinů. Zvýšená exprese se projevuje také u genů regulujících transkripci a translaci, které jsou úzce spojeny s metabolismem proteinů. Ke zvýšení exprese dochází také u genů, které souvisí s metabolismem lipidů, mastných kyselin a sacharidů. Všechny tyto složky jsou nedílnou součástí EPS, které tvoří základ matrix biofilmu a je proto pochopitelné, že zvýšená potřeba těchto látek při tvorbě biofilmu se projeví zvýšením exprese relevantních genů³⁸.

Geny skupiny ALS

ALS geny (agglutinin-like sequence – sekvence DNA kódující aglutinační látky) kódují objemné molekuly

glykoproteinů, které můžeme nalézt na povrchu buněk a významně se podílejí na adhezi mikroorganismů a na výstavbě matrix biofilmu. V případě rodu *Candida* se při experimentální studii exprese těchto genů v biofilmu zvýšila několikanásobně³⁹.

Geny kódující buněčné pumpy

Buněčné pumpy, které jsou nedílnou součástí cytoplazmatické membrány a přepravují látky dovnitř i ven z buňky jsou jedním z faktorů, které přispívají k odolnosti mikroorganismů vůči antibiotikům. Tyto transportéry přepravují látky na základě chemiosmotického gradientu (transportéry *MFS* – major facilitator family), nebo na přepravu využívají energii získanou z rozkladu ATP (transportéry *ABC* – ATP-binding cassette). Tyto buněčné pumpy jsou kódovány geny ze skupin *CDR* (*Candida* drug response – reakce rodu *Candida* na antibiotika) a *MDR* (multidrug resistance – rezistence vůči spektru látek) a v biofilmu je jejich exprese podstatně vyšší než u planktonických buněk. Můžeme tedy předpokládat větší množství transportéru v cytoplazmatické membráně buněk v biofilmu^{38,40}.

Tento systém zvýšené rezistence je popisován především v souvislosti s antibiotiky azolového typu, jakými jsou například flukonazol, anebo vorikonazol⁴⁰.

Geny reagující na vlivy vnějšího prostředí

Zvýšená odolnost buněk biofilmu vůči nepříznivým vlivům prostředí je připisována především matrix biofilmu, která buňky obaluje. Avšak buňky samotné také přispívají k tomuto jevu. V případě *C. albicans* je

v buňkách biofilmu detekována zvýšená exprese genů *HSP90* a *HSP104*, které kódují heat shock proteiny (proteiny, které napomáhají zvládnutí tepelného šoku). Ve zvýšené míře se exprimuje také gen *GCS1*, který kóduje enzym glukosidáza I. Tento enzym je limitujícím faktorem při syntéze důležitého antioxidantu glutathionu. Glutathion pomáhá buňkám zvládat oxidativní stres tak, že vychytává volné radikály, které se mohou vytvořit působením vnějších podmínek³⁶.

Závěr

I když nejsou oportunní kvasinky rodu *Candida* nejčastějším původcem mikrobiálních infekcí, patří bezpochyby mezi původce nejzávažnějších infekčních onemocnění. Přispívá k tomu i jejich fenotypová variabilita a schopnost vytvářet pseudomycelium. Biofilmy těchto kvasinek způsobují problémy svou značnou odolností vůči antibiotikům především při léčbě systémových infekcí. Mechanismy této rezistence jsou pořád nedostatečně vysvětleny a zůstávají předmětem dalšího výzkumu. Jako slibná alternativa, která by mohla pomoci vyřešit tento problém, se jeví například použití přírodních látek, vůči kterým nebyla doposud prokázána biofilmová rezistence.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/ 2015) a GAČR grantu 14-23597S.

Literatura

1. Cooper CR: *The Yeast: a Taxonomic Study (Fifth Edition)*, Chapter 2, 9-19 (2011).
2. Fridkin SK, Jarvis WR: *Clin Microbiol Rev.* 9, 499 (1996).
3. Lachance M-A, Boekhout T, et al.: *The Yeast: a Taxonomic Study (Fifth Edition)*, Chapter 90, 987-1278 (2011).
4. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR: *Clin. Infect., DiS.* 43, S3-S14 (2006).
5. Nett J, Andes D: *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 340 (2006).
6. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, et al.: *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 973 (2002).
7. Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, et al.: *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37, 1962 (1993).
8. Willocks L, Leen CL, et al.: *Antimicrob. Agents. Chemother.* 28, 937 (1991).
9. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD: *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 80 (1999).
10. Fernandez M, Moylett EH, et al.: *Clin. Infect., DiS.* 31, 458 (2000).
11. Bendel CM: *Semin. Perinatol.* 27, 357 (2003).
12. Khun DM, Chandra J, Mukherjee PK, et al.: *Infect. Immun.* 70, 878 (2002).
13. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD: *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 606 (2008).
14. Alby K, Bennett RJ: *Mol. Biol. Cell.* 20, 3178 (2009).
15. Laffey SF, Butler G: *Microbiology.* 151, 1073 (2005).
16. Jin Y, Samaranayake YH, et al.: *Mycopathologia.* 160, 191 (2005).
17. Sherry L, Rajendran R, Lappin DF, et al.: *BMC Microbiol.* 14, 182, doi: 10.1186/1471-2180-14-182 (2014)
18. Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, et al.: *Yeast.* 30, 331 (2013).
19. Walsh TJ, Dixon DM.: *Spectrum of Mycoses, Medical Microbiology (4th edition).* The University of Texas Medical Branch at Galveston (1996).
20. Taplin D: *J. Invest. Dermatol.* 67, 177 (1976).
21. Komshian SV, Uwaydah AK, et al.: *Rev. Infect., DiS.* 11, 379 (1989).
22. Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, et al.: *Am. J. Med.* 112, 380 (2002).
23. Field LH, Pope LM, Cole GT, et al.: *Infect. Immun.* 31, 783 (1981).
24. Seelig MS, Goldberg P, et al.: *Postgrad. Med. J.* 55, 632 (1979).
25. Santos M, Thiene G, Sievers HH, Basso C: *Eur. Heart J.* 32, 2265 (2011).
26. Gottfredsson M, Perfect JR: *Semin. Neurol.* 20, 307 (2000).
27. Prasad KN, Prasad N, Gupta A, et al.: *J. Infect.* 48, 96 (2004).
28. Ramage G, Saville SP, et al.: *Eukaryot. Cell.* 4, 633 (2005).
29. Wimpenny J: *Society for General Microbiology Symposium.* 59, 1 (2000).
30. Al-Fattani MA, Douglas LJ: *J. Med. Microbiol.* 55, 999 (2006).
31. Zhou J, Xia S, Zhang Z, et al.: *JWS.* 4, 91 (2014).

Literatura (pokračování)

32. Donlan RM, Costerton JW: *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167 (2002).
33. Douglas LJ: *Trends. Microbiol.* 11, 30 (2003).
34. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF: *Emerg. Infect., DiS.* 10, 14 (2004).
35. Nett JE, Lepak AJ, Marchillo K, Andes DR: *J. Infect., DiS.* 200, 307 (2009).
36. Yeater KM, Chandra J, Cheng G, et al.: *Microbiology.* 153, 2373 (2007).
37. Marchais V, Kempf M, Licznar P, et al.: *FEMS Microbiol Lett.* 245, 25 (2005).
38. García-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I, et al.: *Eukaryot. Cell.* 3, 536 (2004).
39. Hoyer LL: *Trends. Microbiol.* 9, 176 (2001).
40. Mukherjee PK, Chandra J: *Drug. Resist. Updat.* 7, 301 (2004).
41. Hay RJ, Baran R, Moore MK, et al.: *Br. J. Dermatol.* 118, 47 (1988).

Souhrn

Kundrát D., Kvasničková E.: Oportunně patogenní kvasinky rodu *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* jsou jedním z nejčastějších původců nosokomiálních infekcí. Tyto infekce velmi často přerůstají do závažných onemocnění, jakými jsou například endokarditida, nebo meningitida. Jedním z důvodů, které činí tyto kvasinky tak nebezpečnými oportunními patogeny je jejich schopnost tvořit biofilm. Tato komunita mikroorganismů je schopná odolávat nepříznivým podmínkám prostředí a také vysokým dávkám antimikrobiálních látek. Na těchto vlastnostech má velký podíl specifická exprese genů v biofilmu a také fenotyp kvasinek.

Klíčová slova: oportunní patogen, *Candida*, fenotyp, mykózy, biofilm

Summary

Kundrát D., Kvasničková E.: Opportunistic pathogenic yeasts of the genus *Candida*

Yeasts of the genus *Candida* are one of the most common causes of nosocomial infections. These infections can further evolve into serious conditions such as endocarditis or meningitis. One of the reasons, why these opportunistic pathogens are so dangerous is their ability to form biofilm. This community of microorganisms is able to withstand adverse effects of surrounding environment and is even immune to very high amounts of antimicrobial agents. These properties are present mainly due to specific gene expression in biofilm and phenotype of yeast.

Keywords: opportunistic pathogen, *Candida*, phenotype, mycoses, biofilm

ÚLOHA CYKLÍN-DEPENDENTNÍ KINÁZY 1 PRI MEIOTICKOM DOZRIEVANÍ OOCYTŮV

Ivana Ferencová, Petr Šolc

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., Laboratoř integrity DNA; zigova@iapg.cas.cz

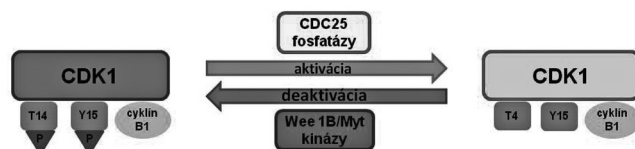
Úvod

Meióza je unikátny typ buněčného dělení uplatňující se při vzniku pohlavních buněk: oocytů a spermií. Redukce počtu chromozómů v průběhu meiózy je zabezpečena dvoma za sebou nasledujícími buněčnými děleními (meióza I a meióza II), kterým předchází jen jedna duplikace DNA. V prvním meiotickém dělení (meióza I) dochází k segregaci homologních chromozómů, tvořených dvojicí chromozómů, z kterých původně jeden pochází od otce, jeden od matky. Preto v průběhu meiózy I dochází k redukci počtu chromozómů. Počas meiózy II sú, obdobne ako v mitóze, separované chromatidy- zduplikovaný chromozóm obsahuje dve chromatidy. Meióza cicavčích oocytů je dlhý, komplexný a dvakrát dočasne prerušený proces. Začína už v průběhu fetální fáze života a je fyziologicky zastavený už v profáze meiózy I (blok v profáze I). V tomto stave oocyt zotrívá aj niekoľko rokov, kým v průběhu reprodukčního věku nedojde k znovuzahájení meiózy a oocyt pokračuje ďalej v meióze I. Po dokončení meiózy I vstupuje priamo do meiózy II, kde je jeho delenie zastavené v metafáze, pokiaľ nedojde k oplodneniu spermiiou¹. Len malá časť oocytů blokovaných v profáze I je schopná v průběhu rastu vo folikule dosiahnuť meiotickú a vývojovú kompetenciu a znovuzahájiť meiózu. Pri narodení je v tele dievčat prítomných asi 600-800 tis. oocytů zastavených v pro-

fáze I, ale menej ako 500 z nich dokáže dôjsť až do štádia oocytu znovuzahajujúceho meiózu a vyvinúť sa v plnohodnotný oocyt v metafáze II (vajíčko, pripravené na oplodnenie)².

Znovuzahájenie meiózy po bloku v profáze I

Blok v profáze I a znovuzahájenie meiózy je u oocytů riadené aktivitou cyklín dependentnej kinázy 1 (CDK1) v komplexe s cyklínom B1 (regulačná podjednotka CDK1)³. Aktivita CDK1 je regulovaná fosforyláciou na jej aminokyselinových zvyškoch: treoníne 14 (Thr14) a tyrozíne 15 (Tyr15) (Obr. 1). Počas bloku v profáze I je CDK1 inhibovaná, pretože Thr14 a Tyr15 sú fosforylované prostredníctvom Wee1B a Myt1 kinázy⁴. Naopak,



Obr. 1: Regulácia aktivity CDK1 v priebehu meiotického zrenia. Aktivita cyklín-dependentnej kinázy 1 (CDK1) počas meiotického delenia je regulovaná fosforyláciou na aminokyselinových zvyškoch: threonine 14 (Thr14) a tyrozíne 15 (Tyr15). Fosforylácia Thr14 a Tyr15 prostredníctvom Wee1B a Myt1 kináz vedie k inaktivácii CDK1. Naopak, aby bola CDK1 aktívna, Thr14 a Tyr15 musia byť defosforylované. Za to sú zodpovedné CDC25 fosfatázy.

pre znovuzahájenie meiózy je nevyhnutné, aby CDK1 bola aktívna⁵. Preto musia byť aminokyselinové zvyšky Thr14 a Tyr15 defosforylované, čo zabezpečujú duálne CDC25 (cell division cycle 25) fosfatázy^{6,7,8}. Z toho dôvodu CDC25 fosfatázy predstavujú hlavné aktivátory CDK1 v priebehu znovuzahájenia meiózy. Na udržaní bloku v profáze I prostredníctvom inhibície CDK1 sa podieľajú spoločne Wee1B a Myt1 kináza⁴.

U cicavcov sú CDC25 fosfatázy exprimované v troch izoformách: CDC25A, CDC25B a CDC25C⁹. Pre znovuzahájenie meiózy u myších oocytov je považovaná CDC25B fosfatáza za esenciálnu, pretože oocyty myši s deléciou pre CDC25B nie sú schopné znovuzahájiť meiózu z dôvodu neschopnosti aktivovať CDK1⁶. Myši deletované pre CDC25C sú životaschopné a fertílné, čo napovedá, že CDC25C nemá kľúčovú funkciu v priebehu oogenézy¹⁰. Čo sa týka CDC25A, zdá sa, že nie je absolútne nevyhnutná pre znovuzahájenie meiózy, ale spoločne s CDC25B prispieva k iniciácii a k časovo korektnému nástupu znovuzahájenia meiózy^{7,8}. Tiež sa ukazuje, že degradácia CDC25A je nutná pre správny prechod z meiózy I do meiózy II⁸.

V procese znovuzahájenia meiózy je aktivita CDK1 závislá na aktivite jej regulátorov: inhibičných kináz (Wee1B/Myt1) a aktivačných fosfatáz (CDC25). Rovnako dôležitá je aj lokalizácia týchto molekúl v rámci bunecných kompartment (translokácia medzi jadrom a cytoplazmou)⁴. Blok v profáze I je udržiavaný vysokou koncentráciou cAMP¹¹, ktorá vedie k aktivácii proteín kinázy A (PKA). PKA inhibuje aktiváciu CDK1, čo zabezpečuje nepriamo prostredníctvom regulácie aktivity CD-

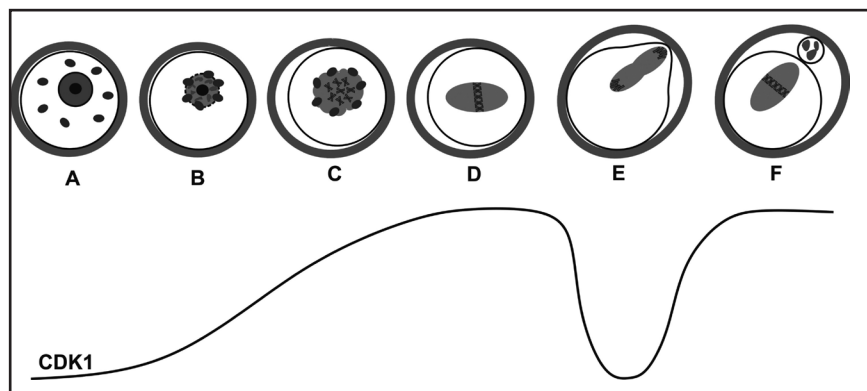
C25B a Wee1B. Fosforylácia CDC25B prostredníctvom PKA, vedie k vytvoreniu väzbových miest pre 14-3-3β protein. Ten bráni translokácii CDC25B z cytoplazmy do jadra, kde musí dôjsť k aktivácii CDK1 pre úspešné znovuzahájenie meiózy, a teda aj rozpad jadrovej membrány^{12,13}. Zároveň PKA prostredníctvom fosforylácie aktivuje Wee1B kinázu, ktorá fosforyluje CDK1 na Tyr15 a tým udržiava CDK1 v inhibovanom stave¹⁴.

Počas bloku v profáze I je Wee1B výhradne lokalizovaná v jadre, zatiaľ čo CDC25B je v cytoplazme. Tesne pred znovuzahájením meiózy je väčšina CDC25B translokovaná do jadra a naopak majoritná časť Wee1B do cytoplazmy⁴. Pokles cAMP pri znovuzahájení meiózy vedie k poklesu aktivity PKA, k defosforylácii a aktivácii CDC25B, a zároveň k odhalienu jeho aminokyselinovej sekvencie pre transport CDC25B do jadra. CDC25B následne translokuje do jadra, kde aktivuje malú frakciu CDK1. Jednou z hypotéz je, že takto aktivovaná malá časť CDK1 potom fosforyluje a inaktivuje Wee1B, ktorá je následne aktívnym transportom exportovaná z jadra. Tým sa znižuje koncentrácia inhibičnej molekuly Wee1B v jadre, čo so súčasným importom aktívnej CDC25B do jadra vedie k narastajúcej aktivácii CDK1. Po dosiahnutí určitej hladiny aktivácie CDK1, dochádza k znovuzahájeniu meiózy.

Meiotická maturácia riadená CDK1

Pre oocyty blokované v profáze I je charakteristické veľké jadro s neporušenou jadrovou membránou. Po aktivácii reguluje CDK1 prostredníctvom fosforylácie lamínov rozpad jadrovej membrány⁵, čo je prvým viditeľným znakom znovuzahájenia meiózy. Tá môže nastať len u zreých oocytov, v *in vivo* podmienkach pod vplyvom luteinizačného hormónu alebo v *in vitro* podmienkach po mechanickom uvoľnení oocytov z folikul a ich následnej kultivácii vo vhodnom médiu^{15,16}. Aktivovaná CDK1 ďalej prostredníctvom fosforylácie histonu 1 iniciuje kondenzáciu chromatinu¹⁷. V oocyte sa následne začne vytvárať deliace vretienko. Jeho úlohou je väzba na chromozómy a ich rovnomerné rozdelenie v anafáze I. Polovica chromozómov je vydelená v prvom pólovom teliesku a druhá polovica zostáva v oocyte.

Deliace vretienko u myších oocytov vzniká z mnohonásobných mikrotubul organizujúcich centier (microtubule organizing center-MTOC), ktoré funkčne nahrádzajú centrozóm. MTOC predstavujú nukleárne miesta, z ktorých polymerizujú mikrotubuly. V oocyte sa najskôr vytvorí multipolárne deliace vretienko, z ktorého následným predĺžovaním a bipolarizáciou vzniká bipolárne deliace vretienko (Obr. 2) To je zodpovedné za rozdelenie chromozómov v anafáze I¹⁸. Aktivita CDK1



Obr. 2: Meiotické zrenie myších oocytov a aktivita CDK1. A. Blok v profáze I. Oocyt má neporušenú jadrovú membránu, dekonzenzovaný chromatin a v cytoplazme sa začínajú vytvárať MTOC (microtubule organizing center). B. Znovuzahájenie meiózy. Prvým vizuálnym znakom je rozpad jadrovej membrány a kondenzácia chromatinu, ktoré sú nasledované tvorbou deliaceho vretienka C. Tvorba multipolárneho deliaceho vretienka. Mikrotubuly polymerizujú z MTOC D. Bipolárne deliace vretienko vzniká po elongácii a bipolarizácii multipolárneho deliaceho vretienka. Chromozómy sa usporiadávajú do ekvatoriálnej roviny deliaceho vretienka E. Anafáza I. Vydelenie prvého pólového telieska s polovičnou sadou chromozómov. F. Metafáza II. Po ukončení prvého meiotického delenia oocyt vstupuje priamo do druhého meiotického delenia (meióza II), kde je jeho delenie zastavené v metafáze, kým nedôjde k oplodeniu spermou.

Znovuzahájenie meiózy a prechod prvým meiotickým delením je u myších oocytov kontrolované cyklín-dependentnou kinázou 1 (CDK1). Počas profázy je CDK1 inaktívna. Pre znovuzahájenie meiózy musí byť CDK1 aktivovaná. Jej aktivita v priebehu prvého meiotického delenia narastá pomaly postupne. Aby mohlo dôjsť k vydeleniu prvého pólového telieska, aktivita CDK1 musí klesnúť. Pri vstupe do meiózy II aktivita CDK1 narastá a riadi prechod meiózou II.

narastá v priebehu meiózy I postupne pomaly (Obr. 2). Práve tento postupný pomalý nárast CDK1 aktivity je zodpovedný za korektné a stabilné napojenie chromozómov na deliace vretienko a rovnomerné rozdelenie chromozómov medzi prvým pólovým telieskom a oocytom¹⁸. Homológne chromozómy sú ku vláknám deliaceho vretienka napájané najskôr laterálne, k vytvoreniu štandardného mikrotubul-kinetochor spojenia dochádza až v anafáze. V prípade, že nie je chromozóm pripojený na deliace vretienko správne, preorganizuje sa jeho pripojenie. Výsledkom je správne načasovanie anafázy a rovnomerné rozdelenie chromozómov, ktoré boli stabilne napojené na deliace vretienko¹⁹. Naopak rýchla aktivácia CDK1 vedie k predčasnej anafáze a k segregácii chromozómov, ktoré nie sú stabilne pripojené na deliace vretienko a k nerovnomernému rozdeleniu chromozómov počas anafázy I¹⁹. Na konci metafázy I dochádza k poklesu aktivity CDK1, ktorý je nevyhnutný pre vstup do anafázy I a následné vydelenie prvého pólového telieska. Po úspešnom vydelení prvého pólového telieska aktivita CDK1 výrazne stúpne, riadi vstup oocytu do metafázy II³.

Literatúra

1. Egel R, Lankenau DH: *Springer Science & Business Media* (2008).
2. Adhikari D, Liu K: *Endocrine Rev.* 30, 438 (2009).
3. Brunet S, Maro B: *Reproduction* 130, 801 (2005).
4. Oh JS, Han SJ, Conti M: *J. Cell Biol.* 188, 199 (2010).
5. Adhikari D, Zheng W, et al.: *Human Mol. Gen.* 21, 2476 (2012).
6. Lincoln AJ, Wickramasinghe D, et al.: *Nat. Gen.* 30, 446 (2002).
7. Li M, Yin S, et al.: *Cell Cycle* 7, 1301 (2008).
8. Solc P, Saskova A, et al.: *Development. Biol.* 317, 260 (2008).
9. Rudolph J: *Biochem.* 46, 3595 (2007).
10. Chen MS, Hurov J, et al.: *Mol. Cell. Biol.* 21, 3853 (2001).
11. Masciarelli S, Horner K, et al.: *J. Clin. Inv.* 114, 196 (2004).

Súhrn

Ferencová I., Šolc P.: Úloha cyklín-dependentej kinázy 1 v meiotickom dozrievaní oocytov

Meiotické delenie cicavčích oocytov je fyziologicky zastavené v profáze prvého meiotického delenia (blok v profáze I). Návrat do meiózy sa nazýva znovuzahájenie meiózy. U oocytov je kontrolované cyklín-dependentnou kinázou 1 (CDK1). Aktivita CDK1 je negatívne regulovaná fosforyláciou na treoníne 14 a tyrozíne 15. Počas bloku v profáze I je CDK1 inaktivovaná, pretože tieto aminokyselinové zvyšky sú fosforylované prostredníctvom Wee1B/Myt1 kináz. Pre znovuzahájenie meiózy musí byť CDK1 aktivovaná a aminokyselinové zvyšky defosforylované pomocou CDC25 fosfatáz. Aktivácia/inaktivácia CDK1 závisí na aktivite regulačných kináz a fosfatáz a rovnako aj ich lokalizácii v oocyte.

Kľúčové slová: cyklín dependentná kináza 1 (CDK1), znovuzahájenie meiózy, CDC25 fosfatázy, Myt kinázy

Summary

Ferencová I., Šolc P.: The role of cyclin-dependent kinase 1 in meiotic maturation of oocytes

Meiotic division in mammalian oocytes is physiologically arrested in prophase of the first meiotic division (prophase I arrest). The re-activation of meiosis is called meiosis resumption. In oocytes it is controlled by cyclin-dependent kinase 1 (CDK1). Activity of CDK1 is negatively regulated by phosphorylation on threonine 14 and tyrosine 15. During prophase I arrest CDK1 is inactivated, because these amino residues are phosphorylated by Wee1B/Myt1 kinases. For meiosis resumption CDK1 has to be activated and amino residues dephosphorylated by the activation of CDC25 phosphatases. Activation/deactivation of CDK1 depends on activity as well as localization of these regulating kinases and phosphatases in oocytes.

Keywords: cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), meiosis resumption, CDC25 phosphatase, Myt kinases

Záver

Meiotické delenie cicavčích oocytov je jedinečný proces. Predovšetkým z hľadiska schopnosti oocytov znovuzahájiť meiózu po dlhodobom zotrvaní v bloku v profáze I a po úspešnom dokončení meiózy tak dať vznik plnohodnotnému oocytu. Ten po oplodnení spermou vedie k vzniku nového jedinca. Napriek tomu, že znovuzahájenie meiózy je intenzívne skúmanou problematikou, dodnes nie je dostatočne objasnená úloha jedných z hlavných regulátorov CDK1, CDC25 fosfatáz. Poznanie regulačných partnerov CDK1 by prispelo k objasneniu molekulárneho mechanizmu, ktorým CDK1 riadi prechod meiózou I u myších oocytov.

Podakovanie

Poskytovateľovi (MŠMT) v rámci inštitucionálnej podpory výskumu a vývoja č. MSMT-28477/2014, a projektu ExAM (CZ.1.05/2. 1. 00/03.0124).

12. Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ: *Cell Cycle* 8, 665 (2009).
13. Zhang Y, Zhang Z, et al.: *Develop. Dynamics* 237, 3777 (2008).
14. Han SJ, Conti M: *Cell Cycle* 5, 227 (2006).
15. Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS: *Mol. Cell. Endocrinol.* 356, 65 (2012).
16. Jones KT: *Mol. Human Reproduc.* 10, 1 (2004).
17. Eppig JJ, Viveiros MM, Bivens, CM and De La Fuente R: Regulation of mammalian oocyte maturation. In Peter, C.K.L. and Eli, Y.A. (eds), *The Ovary*. Elsevier Academic Press, San Diego. Vol. 2, pp. 113 (2004).
18. Schuh M, Ellenberg J: *Cell* 130, 484 (2007)
19. Davydenko O, Schultz RM, Lampson MA: *J. Cell Biol.* 202, 221 (2013).

O B S A H

Úvod	49
Zpráva z konference „Green for Good“	50
Hošek P, Spiwok V.: Už jste vyzkoušeli Metadyn View?	51
Paldrychová M., Kvasničková E.: Antibiotická rezistence biofilmu	53
Paulíček V., Kvasničková E.: Biofilmy vláknitých hub	57
Kundrát D., Kvasničková E.: Oportunně patogenní kvasinky rodu <i>Candida</i>	60
Ferencová I., Šolc P.: Úloha cyklín-dependentej kinázy 1 v meiotickom dozrievaní oocytov	65

C O N T E N T S

Editorial	49
Report from the conference „Green and Good“	50
Hošek P, Spiwok V.: Have you tried Metadyn View?	51
Paldrychová M., Kvasničková E.: Antibiotic resistance of biofilm	53
Paulíček V., Kvasničková E.: Biofilms of filamentous fungi	57
Kundrát D., Kvasničková E.: Opportunistic pathogenic yeasts of the genus <i>Candida</i>	60
Ferencová I., Šolc P.: The role of cyclin-dependent kinase 1 in meiotic maturation of oocytes	65

REDAKČNÍ RADA

Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
Doc. RNDr. Marek Petřivalský, PhD., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albrechtův 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i. Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novák Z.: Disertační práce. VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).