

Bio

Ročník 27 • Číslo 3/2017

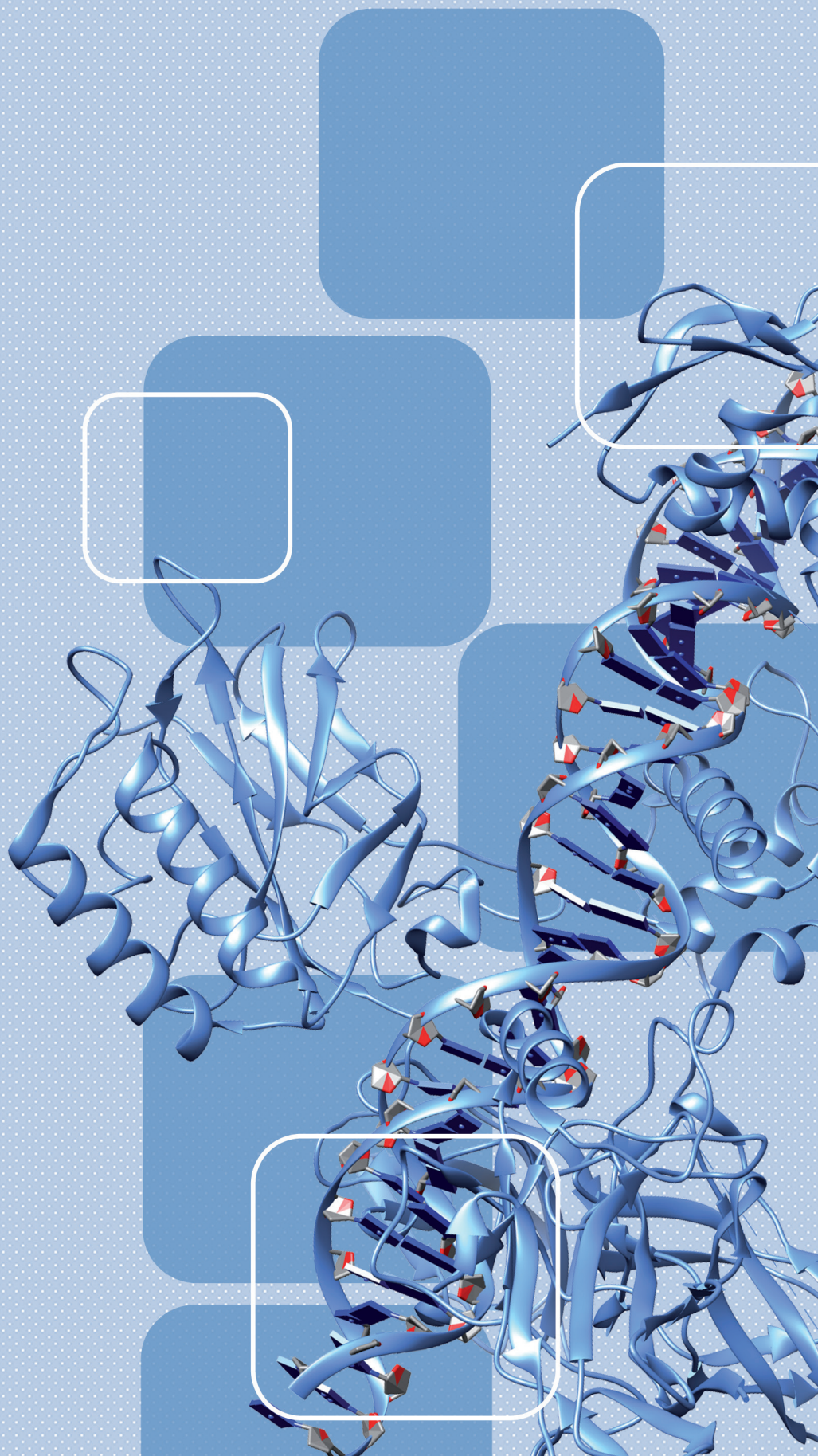
prospect

**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

Vážení přátelé,

jak všichni víte, v období 13. až 17. června proběhla úspěšně nejdůležitější událost naší společnosti v tomto roce – mezinárodní biotechnologické symposium Biotech 2017, spojené s tradičním již 7. česko-švýcarským symposiem, potvrzujícím dlouholetou česko-švýcarskou spolupráci v oblasti biotechnologií. Česko-švýcarská spolupráce v chemii a biochemii však nezačala až po politických změnách organizací prvního česko-švýcarského symposia na VŠCHT v roce 1999, ale má mnohem hlubší kořeny. Velké zásluhy na rozvíjení česko-švýcarské spolupráce má jistě profesor Leopold Růžička (ETH Zurich), v jehož laboratoři pracovalo na stážích mnoho českých chemiků z nynější VŠCHT a současného ÚOCHB. Po něm převzal štafetu vzájemné spolupráce absolvent VŠCHT (student profesorů Votočka a Lukeše) a pozdější nositel Nobelovy ceny profesor Prelog, který vedl laboratoř po profesorovi Růžičkovi v ETH Zurich. Věříme, že sedm společných akcí českých a švýcarských chemiků a biotechnologů je potvrzením permanentní spolupráce jak na akademickém, tak i industriálním poli a zárukou pokračování do budoucna. Pro další číslo Bioprospectu připravujeme i projev Ulfa Grawundera (NBE therapeutics), prezidenta Swiss Biotech Association, který jsme pro pozdní doručení nemohli zařadit do tištěné formy Book of Abstract našeho symposia. Symposium si můžete připomenout prohlédnutím fotogalerie na webové stránce www.biotech2017.cz. Mezi významné dozvuky této mezinárodní konference patří příprava zvláštního čísla prestižního biotechnologického časopisu *Biotechnology Advances* a zvláštního čísla *Bioprospectu* v anglickém jazyce, které oba vyjdou začátkem příštího roku.

Mezi další velmi významné aktivity letošního roku patří mezinárodní symposium *Green for Food IV* (19.–22. 6. 2017), pořádané našimi kolegyněmi a kolegy v Olomouci a Českého centra EFB v Olomouci. O těchto aktivitách se dočtete ve zvláštní zprávě publikované v tomto čísle *Bioprospectu*.

6. září uspořádala naše společnost ve spolupráci s FPBT VŠCHT v Praze seminář na téma aktuálního evropského projektu „*Biometal Demonstration Plants for the Biological Rehabilitation of Metallized Industrial Wastewaters*“. Znečištění vod těžkými kovy z nejrůznějších zdrojů je velmi závažný problém nejen v celé Evropě, ale i jinde ve světě. EU tedy podporuje projekt

zabývající se novými biotechnologiemi, umožňujícími čistit odpadní vody od těžkých kovů. V projektu byly navrženy dvě technologie, a to pro čištění kontaminované vody po těžbě kovů a odpadní vody z továrny zabývající se pokovováním. Informaci o projektu přednesl profesor Manuel Garcia Roig ze španělské univerzity v Salamance.

Odborná skupina Kaly a odpady pořádala v Hradci Králové ve dnech 7. a 8. 9. 2017 seminář *Anaerobie v ČR* – od počátků po současnost, kde mimo jiné přednesli klíčové referáty prof. Ing. Michal Dohányos, CSc. a prof. Ing. Jana Zábranská, CSc. Přítomní vyjádřili oběma hlavním řečníkům díky za jejich významný příspěvek do problematiky anaerobní biotechnologie v ochraně prostředí a popřáli jim k významným životním jubileům. Seminář byl zakončen exkurzemi do ČOV Danisco Smiřice a ČOV Hradec Králové.

Všechny vědecké objevy mají vždy mnoho kořenů a je velmi obtížné zjistit, kdy k objevu skutečně došlo. Přesto se rádi vždy o to pokoušíme. Tak např. neznámějším lékem vůbec, který zná snad každý, je relativně jednoduchá sloučenina kyselina acetylsalicylová, obecně známá jako aspirin. Její skutečně čistou formu syntetizoval Dr. Felix Hoffman 10. srpna 1897, tedy před 120 lety (viz laboratorní záznam publikovaný v knize *Acetylsalicylic Acid*, Karste Schor, Wiley-Blackwell, str. 9, ISBN 978-3-527-32109-4). „Aspirin“ v méně čisté formě byl však klinicky využíván již dříve a postupně se objevovalo jeho mnohostranné klinické využití. V současnosti je jednou z jeho nejrozšířenějších aplikací ovlivnění (snížení) srážlivosti krve, lidově označované jako „ředění krve“.

Výzkum struktury DNA a naše poznatky v tomto oboru přinášejí stále nové možnosti uplatnění nových výsledků. Jedním z výrazných úspěchů bylo zřejmě i jejich využití v kriminalistice. Letos si také můžeme připomenout významný mezník ve forenzní analýze – 30 let, kdy byl na základě analýzy DNA usvědčen první vrah Pitchfork (Celia Henry Arnaud in *C & EN*, No.37, p. 20-26 z 18. 9. 2017).

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

Se srdečnými pozdravy
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

VZPOMÍNKA NA PANÍ Prof. RNDr. MARII TICHOU, CSc.

(*18. 4. 1938, † 12. 3. 2017)



Je pro nás smutnou zprávou, že dlouholetá členka katedry biochemie na Přírodovědecké fakultě UK – profesorka RNDr. Marie Tichá, CSc. – nás ve věku svých nedožitých 79let opustila dne 12. března 2017. Paní profesorka, známá pro své přátele pod jménem „Inena“, se narodila 18. dubna 1938 v Praze. Po ukončení jednáctileté střední školy nastoupila na Přírodovědeckou fakultu UK v roce 1956. Obor biochemie na této fakultě UK ukončila Marie Tichá v roce 1961 (diplomová práce na téma „Studium některých sirných derivátů D-glukosy“). Od roku 1964 krátce pracovala jako odborný pracovník Výzkumného ústavu přírodních léčiv po úspěšné obhajobě kandidátské práce (téma: „Přeměna exogenních cukrů ve vyšších rostlinách“). Od roku 1965 patřila mezi členy katedry biochemie, kde ve své vědecké dráze pokračovala spoluprací se svým učitelem, profesorem RNDr. PhMr. Janem Kocourkem, CSc., ve studiu lektinů, interakcí proteinů se sacharidy a výzkumu funkce sacharidových částí glykoproteinů v rozpoznávacích procesech. Právě v této oblasti na pomezí základního biochemického výzkumu a biotechnologických a metodických aplikací dosáhla významných vědeckých výsledků. Je zcela evidentní, že paní profesorka svými výsledky významně přispěla, společně s profesorem Kocourkem a dlouholetým spolupracovníkem, prof. RNDr. Gustavem Entlicherem, CSc., k věhlasu české lektinářské

školy v mezinárodním měřítku. V letech 1968 – 69 pobývala na zahraničním pracovišti: Department of Biochemistry, Medical School, University of Oregon, US. Problematice studia lektinů zůstala profesorka Tichá věrná, ačkoliv se její vědecký zájem rozšířil i na studium dalších biochemicky zajímavých glykoproteinů, jejich funkce v řadě fyziologických dějů (např. proces fertilisace), a objasňování využití nabytých znalostí jak v aplikovaném, biotechnologickém a také klinickém výzkumu (např. metoda nativní afinitní elektroforesy). Z výsledků této studované tematiky úspěšně obhájila nejen habilitační práci (Lektiny – izolace a studium vlastností), ale byla i v roce 1995 jmenována profesorkou biochemie (Metody studia interakcí proteinů s ligandy). Je obdivuhodné, jak své nadšení a entusiasmus dokázala předávat svým studentům a kolegům, a jak jí touha po odhalování nových strukturních a funkčních vlastností těchto biomolekul vydržela až do nedávné minulosti. Ještě v době svých sedmdesátin publikovala ve vědeckých časopisech a rozšiřovala plejádu aspirantů, doktorandů, diplomantů a bakalářů, které vychovala. Profesorka Tichá se zapsala do historie katedry biochemie Přírodovědecké fakulty UK i svojí organizační činností, od roku 1967 byla tajemníkem katedry, dále zastávala po několik let pozici zástupce vedoucího katedry a v letech 1994 – 97 byla vedoucí katedry biochemie. Nezapomenutelným osobním zážitkem byla zkušenost, kdy si jako vedoucí katedry bez jediného mrknutí oka, vzala plášť a šla jako pedagogický dozor do základních praktik z biochemie. Stejně tak i její angažovanost a radost z přednáškové činnosti, kdy ještě před dvěma roky, dokud ji to umožňovalo zdraví, participovala na výběrové přednášce z biochemie proteinů. Kromě práce pro katedru biochemie byla aktivní v Československé společnosti biochemické a následně ČSBMB, zapojila se do Pracovní skupiny pro biospecifické interakce (v rámci ČSBMB) a v mezinárodním měřítku spolupracovala v International Interest Group in Biorecognition Technology.

K tomuto výčtu odborných, pedagogických a organizačních aktivit paní profesorky může jistě každý z nás přidat mnoho osobních vzpomínek a pohledů. Profesorka Tichá byla osobností nejen s širokým vědeckým rozhledem a odbornými znalostmi, ale byla i člověkem se silným smyslem pro spravedlnost, pravdu a pomoc ostatním. Přesto byla člověkem tichým a skromným, který svým životem inspiroval řadu z nás – Ineno, děkujeme Ti, byla jsi a stále zůstaneš mezi námi, v našich vzpomínkách.

Za pracovníky katedry biochemie,
Marie Stiborová, Petr Hodek, Miroslav Šulc

ÚSPĚŠNÁ KONFERENCE V OLOMOUCI I PŘÍPRAVA 18. EVROPSKÉHO BIOTECHNOLOGICKÉHO KONGRESU ANEB ČESKÁ POBOČKA EVROPSKÉ BIOTECHNOLOGICKÉ FEDERACE MÁ LETOS NAPILNO

Martina Šaradinová

Univerzita Palackého v Olomouci; martina.saradinova@upol.cz

Česká pobočka Evropské biotechnologické federace (EFB), která působí v Centru regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum v Olomouci, má za sebou vrcholnou událost letošního roku. Byla jí mezinárodní konference *Biotechnology of Plant Products – Green for Good IV*, která se uskutečnila od 19. do 22. června na půdě Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého. Současně se ale česká pobočka podílí na přípravě 18. Evropského biotechnologického kongresu. Na počátku července se proto její zástupci zúčastnili jednání výkonného výboru EFB v Ženevě. Právě tam se totiž Evropský biotechnologický kongres příští rok v červenci uskuteční.



Na konferenci *Green for Good IV* odkazovala mobilní laboratoř v centru Olomouce.

Konference *Biotechnology of Plant Products – Green for Good* se koná jednou za dva roky a v celoročním kalendáři Evropské biotechnologické federace je nejvýznamnější akcí v sekci rostlinných biotechnologií. Letos se kromě EFB a Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (CRH) jeho spolupořadatelem stala rovněž Evropská fytochemická společnost. O nových trendech v rostlinných biotechnologiích, genomech hospodářsky významných plodin nebo například o možnostech, jak využít biologicky aktivní látky z rostlin v medicíně, farmaceutickém průmyslu či zemědělství, hovořilo na 170 výzkumníků z více než 20 zemí.

Spojené státy podpořily účast hlavních hostů

K nejvýznamnějším hostům patřil Patrick Schnable z Iowa State University a Clint Chapple z Purdue University v USA. Rostlinný genetik Schnable měl zásadní podíl na rozluštění genomu kukuřice a v současné době se snaží propojit znalosti o genomech rostlin s poznatky získanými při zemědělské praxi prostřednictvím robotického snímání. „Rád jezdím do Evropy na konference. Zjišťuji, jaká věda se zde dělá a zda existuje nějaký průnik mezi výzkumem v Evropě a USA. V přednášce jsem chtěl zdůraznit, že je nutné vyvinout nové technologie pro pěstování hospodářských plodin, aby odolaly výkyvům počasí. Důležité je rovněž investovat do lidí, hledat talentované vědce a rozvíjet multidisciplinární spolupráci,“ uvedl po svém vystoupení Schnable.

Biochemik Chapple se zabývá biosyntézou ligninu, který je důležitou stavební složkou dřevin, ale současně omezuje jejich průmyslové využití. Ve svém výzkumu se snaží modifikovat strukturu ligninu tak, aby bylo možné z rostlinného materiálu snáze připravit základní látky pro průmyslovou výrobu a nahradit tak fosilní zdroje. Účast obou excelentních vědců finančně podpořilo americké ministerstvo zahraničí. Již podruhé do Olomouce přijel i přední světový odborník na chemickou ekologii a nositel prestižní Wolfovy ceny za zemědělství John Pickett z Velké Británie, který byl hlavním hostem předchozí konference.

Jak zabránit potravinové krizi?

Vědci se mimo jiné zaměřili na to, jak zajistit rostoucí lidské populaci dostatek potravy v době měnícího se klimatu a nestabilního počasí. Zatímco například profesor Schnable hovořil o hledání dědičné informace, která ovlivňuje výnos a jeho stabilitu právě v podmínkách měnícího se počasí, další z řečníků, Heribert Hirt ze Saudské Arábie, nabídl řešení v podobě využití půdních mikroorganismů. V programu rozděleném do osmi sekcí se ale účastníci konference zaměřili také na biologicky aktivní látky v rostlinách, genetiku a genomiku, fytochemickou analýzu, molekulární farmaření nebo například na stresové faktory u rostlin.

„Konferenci považuji za velmi vydařenou. Přijeli skutečně významní řečníci, přednášky byly velmi kvalitní. Přestože i předchozí ročníky byly velmi zajímavé, v tomto ohledu bude těžké letošní ročník překonat,“ zhodnotil konferenci ředitel CRH a děkan Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého Ivo Frébort.

Popularizaci odborných témat zajistila mobilní laboratoř

S některými tématy projednávanými na konferenci se mohli popularizační formou seznámit i obyvatelé a návštěvníci Olomouce. Na konferenci totiž odkazovala mobilní laboratoř umístěná na centrálním náměstí. Návštěvníci v ní například pomocí mikroskopů objevovali svět rostlinných buněk, odborníci je seznamovali mimo jiné s problematikou GMO. Inspirací byla podobná aktivita v Krakově u příležitosti konání Evropského biotechnologického kongresu v roce 2016.

Konferenci vyzdvihl i viceprezident Evropské biotechnologické federace Jeff Cole, který pozval přítomné na Evropský biotechnologický kongres 2018. O jeho přípravě, ale i dalších otázkách se hovořilo na zasedání výkonného výboru EFB, které se konalo 1. července 2017 v Ženevě.

Výkonný výbor EFB jednal v Ženevě

Výkonný výbor si vyslechl zprávu o průběhu konference Biotechnology of Plant Products – Green for Good IV v podání profesora Ivo Frébort a shodl se



Hlavní organizátor konference Ivo Frébort při jejím zahájení.

na tom, že akce byla po všech stránkách velmi úspěšná. Zprávu o činnosti federace přednesl její prezident Mathias Uhlen. Členové výkonného výboru diskutovali také o žurnálu New Biotechnology, jenž EFB vydává. Pozitivní zprávou je, že mezi lety 2015 a 2016 dosáhl žurnál zvýšení impact faktoru ze 3,199 na 3,813. V roce 2016 zaznamenaly články žurnálu téměř 300.000 stáhnutí, což dokládá stálý nárůst v posledních pěti letech. Karsten Zimny, finanční ředitel EFB, seznámil členy s vývojem rozpočtu organizace v prvním pololetí roku 2017 a s výhledem na další období. Představil také plán konferencí, na jejichž organizaci se bude EFB podílet v roce 2018.

Důležitým bodem setkání byl „Strategy Meeting“ zaměřený na definici cílů federace do budoucna. Delegáti se jednomyslně shodli v tom, že je nutné, aby se EFB pravidelně hlasitě vyjadřovala k aktuálním tématům, o nichž se vede vědecká či celospolečenská diskuse. Tím se upevní pozice EFB jako hlasu biotechnologie v Evropě.

Nejpodstatnějším tématem setkání byla příprava Evropského biotechnologického kongresu 2018 (ECB 2018). Cílem je navázat na úspěch ECB 2016, který se uskutečnil v Krakově za účasti téměř 900 odborníků z 62 zemí světa. ECB se poprvé konal v roce 1978 v Interlaken ve Švýcarsku a je tak nejdéle fungujícím biotechnologickým kongresem v Evropě. Po čtyřiceti letech se pro připomínku vrátí do země svého původu. Ženeva je však také přední centrum biotechnologie s 350 aktivními firmami a 20 světovými institucemi se zaměřením na tuto disciplínu. Program bude zahrnovat veškeré aspekty biotechnologie, včetně rostlinné, potravinářské, zemědělské a ekologické biotechnologie, biofarmaceutiky, genomiky mikroorganismů nebo bioinženýrství. Ivo Frébort je aktivním členem přípravného výboru kongresu, neboť je jako člen vědecké rady odpovědný za přípravu jedné ze sekcí.

Foto: Archiv CRH

POZVÁNKA NA KONFERENCI



18TH EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY
1-4 JULY, 2018 • GENEVA, SWITZERLAND



REGISTRATION OPEN
▶ REGISTER NOW!

www.ecb2018.com

 EUROPEAN FEDERATION OF BIOTECHNOLOGY

 tfigroup

 UNIVERSITÉ DE GENÈVE

KARBONICKÉ ANHYDRASY KVASINEK RODU *Candida*

Jan Blaha, Jiří Dostál, Iva Pichová

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.; iva.pichová@uochb.cas.cz,

Kvasinky rodu *Candida*

Na Zemi žije přibližně okolo 8,7 milionů druhů eukaryotických organismů. Pouze 7 % z celkového počtu tvoří říše *Fungi* (cca 611 000 druhů) z čehož se přibližně 600 druhů řadí mezi známé lidské patogeny, které mohou způsobovat širokou škálu onemocnění. Za nejběžnější patogeny považujeme druhy *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* nebo některé zástupce rodu *Aspergillus* a *Candida*¹⁻³.

Patogenní druhy kvasinek rodu *Candida* řadíme mezi tzv. oportunní patogeny, které zcela běžně kolonizují člověka. Můžeme je nalézt např. na kůži, nehtech nebo v některých tělních dutinách a na povrchu nejrozličnějších sliznic lidského těla. Mezi nejčastěji se vyskytující oportunně patogenní druhy řadíme: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* nebo *C. krusei*. V současnosti se za nejrozšířenější, a tím pádem i nejstudovanější kandidu považuje *C. albicans*, která se v klinických izolátech pacientů s diagnostikovanou kandidózou vyskytuje v 51 % případů⁴. Druhou nejčastěji se vyskytující kandidou v krevních vzorcích kandidózou napadených pacientů je *C. parapsilosis*⁵⁻⁹, v některých případech se dokonce objevují zprávy, že *C. parapsilosis* se v testovaných vzorcích dokonce vyskytuje častěji, nežli *C. albicans*^{10, 11}. Rozlišujeme dva základní typy kandidóz. Prvním typem jsou tzv. povrchové, při kterých kandidy napadají pouze povrch různých sliznic a tělních povrchů (např. mykóza nehtů, infekce ústní dutiny nebo vaginální kandidózy). Je odhadováno, že až 75 % žen zažije alespoň jednu infekci vaginální sliznice způsobené právě kandidami^{12, 13}. Tyto povrchové infekce mají jednu velice zásadní vlastnost. Jsou sice do značné míry nepříjemné a zhoršují životní podmínky pacientů, ale nejsou smrtelné. Pravým opakem jsou systémové kandidózy, které jsou spojovány s enormní mortalitou, dosahující až 60 %^{14, 15, 3}. Při těchto infekcích se kandidy rozšíří po celém těle a napadají mnoho soustav a orgánů najednou. Existuje několik hlavních faktorů, které podmiňují rozvinutí povrchové kandidózy do systémové infekce. Mezi ně se řadí např. neutropenie, poškození gastrointestinálních sliznic, dlouhodobá aplikace širokospektrálních antibiotik nebo použití intravenózních katetrů, které pro kvasinky rodu *Candida* představují volný vstup do krevního řečiště pacienta^{16, 17}.

Kandidózy se v posledních letech stávají stále větším problémem. Faktorem, který do jisté míry ztěžuje léčení těchto infekcí, je, že si kandidy v průběhu evoluce vyvinuly řadu mechanismů jak se bránit imunitnímu systému napadeného jedince. Hlavním imunitním mechanismem, který bojuje s kvasinkami rodu *Candida*, je fagocytóza. Tě se účastní zejména makrofágy a neutrofily. Není tedy divu, že nedostatek neutrofilů v těle (neutropenie) je jeden z predispozičních faktorů

pro kandidózy. Kandidy se ale dokáží fagocytóze celkem úspěšně bránit. Stejně jako u jiných vlastností se strategie, kterými se kvasinky rodu *Candida* proti imunitnímu systému brání, mezi jednotlivými druhy značně liší. Tento fakt se dá názorně demonstrovat na *C. albicans* a *C. glabrata*. Poté co, je *C. albicans* fagocytována, změni svůj morfologický typ a přemění se z kvasinkové formy – blastospor – na hyfu. To vede k tomu, že fagocytující buňka praskne a umírá, přičemž kandida se osvobodí. *C. glabrata* však neumí tvořit hyfy, a proto vyvinula jinou strategii. Namísto toho, aby změnila morfologický typ, se začne uvnitř makrofágu, neutrofilu nebo jiných imunitních buněk rapidně množit. Zvyšující se počet dceřiných buněk vede ke zvyšování turgoru uvnitř fagocytující buňky. Jakmile turgor překročí únosnou mez, dojde k lyzi a kandida je opět volná^{18, 19}. Dalším problémem, který je závažnější, je, že se na trhu vyskytuje pouze omezená skupina antimykotik a kandidy si vůči těmto lékům začínají vytvářet rezistenci^{20, 21, 11, 17, 3, 22}.

V současné době se na trhu vyskytuje pouze malá skupina léků (v České republice Státní ústav pro kontrolu léčiv registruje pouze 23 typů antimykotik, z nichž pouze 9 je určeno pro léčbu systémových kandidóz), které jsou zaměřeny na léčení fungálních onemocnění (antimykotika). Do této skupiny v posledních letech nepřibyl téměř žádný lék (mezi nejnovější se řadí Rapamycin²³) a stávající přestávají fungovat – alespoň při léčení kandidóz. Kvasinky rodu *Candida* si totiž vytvářejí vůči těmto lékům rezistenci. Velmi závažný je také fakt, že rychlost vzniku a zdokonalování těchto rezistencí napříč různými kmeny kandid neustále stoupá²⁴⁻²⁷. Navíc každé antimykotikum má vlastní spektrum organismů, vůči kterým je účinné. Studie ukazují, že nejúčinnější látkou proti *C. albicans* je Flukonazol, na rozdíl od *C. parapsilosis*, proti které by měl nejlépe účinkovat Flucytosin²⁸.

Fakt, že drtivá většina antimykotik je cílena na buněčný obal hub usnadňuje kandidám vytvářet si rezistenci. Buňky hub jsou totiž velmi podobné lidským, a proto je velmi složité najít články metabolismu a pro ně účinné látky, které jsou natolik specifické, že nebudou toxicky působit vůči buňkám pacientů. Většina léčiv cílí na různé kroky syntézy ergosterolu, což je steroidní látka esenciální pro správné fungování plazmatické membrány hub.

Patogenita kandid a karbonické anhydrasy

Patogenita kandid je způsobena především jejich schopností přizpůsobit se široké škále podmínek, jako např. změna pH, teploty nebo složení okolního prostředí. Dobře to lze dokumentovat na schopnosti kandid přežít v širokém rozmezí koncentrací oxidu uhličitého

(CO₂). Zcela běžně se kandidy vyskytují např. na lidské kůži, kde jsou obkloповány atmosférickým vzduchem, jehož koncentrace CO₂ je asi ±0,04 %. V případě, že se ale dostanou do krevního oběhu (např. při infekci) jsou vystaveny mnohokrát vyšší koncentraci CO₂ – cca 5 % a jsou schopny jí bez problémů odolávat^{29, 30}. A právě způsob regulace jakým způsobem kvasinky rodu *Candida* využívají CO₂ by mohl být cestou k nalezení nových typů antimykotik.

Oxid uhličitý (CO₂) je jedním z nejdůležitějších biologických substrátů na zemi, i přes to že tvoří pouhých ±0,04 % zemské atmosféry. V přírodě se koncentrace CO₂ přirozeně a spontánně vyrovnává vzájemnou přeměnou na hydrogenuhličitán (HCO₃⁻), který je velmi důležitým biologickým substrátem, ale jeho spotřeba je v organismu mnohonásobně vyšší, nežli je vyprodukováno touto spontánní reakcí. Z tohoto důvodu si organismy během evoluce vyvinuly skupinu enzymů tzv. karbonických anhydras (CA), které jsou schopny katalyzovat reversibilní hydrataci CO₂ za vzniku HCO₃⁻ a H⁺ a to až 10 000 krát rychleji než v případě spontánní přeměny. CA se tak zapojují do řady jiných biochemických cyklů a syntéz, které využívají buď HCO₃⁻ (kofaktor nebo kosubstrát např. při syntéze mastných kyselin nebo argininu) nebo proton (H⁺) (udržování pH homeostáze v organismu)³¹⁻³⁴.

Karbonické anhydrasy se nezávisle na sobě vyvinuly ve třech doménách života (*Bacteria*, *Archea* a *Eukarya*) a jsou rozděleny do pěti evolučně nesouvisejících skupin (α, β, γ, δ, ζ a η)³⁵. Nejlépe prostudovanou skupinou je α-skupina, jejíž zástupce lze nalézt u zvířat, rostlin, hub a prokaryotických organismů. Zástupci β-skupiny byli objeveni u rostlin a hub, ale nikoliv u zvířat. Zatím-

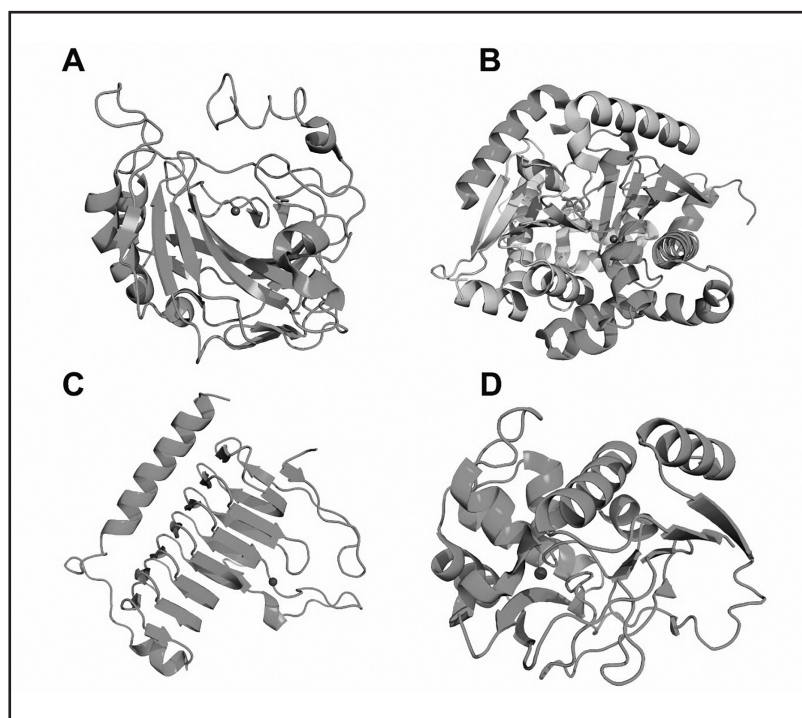
co členové γ-skupiny se vyskytují především u domény *Archea*. Další dvě skupiny δ- a ζ- byly prostudovány pouze u mořských druhů rozsivek. Poslední zástupci jsou η-CA nalezené v protozoích³⁶. Přestože se primární struktury jednotlivých CA z různých skupin velmi liší (Obr. 1.), je až pozoruhodné, že všechny katalyzují stejnou reakci^{37, 38}.

Nedostatek významných sekvenčních podobností mezi různými skupinami CA z nich činí z evolučního hlediska vynikající příklad konvergentního vývoje katalytické funkce. Molekulární struktury různých skupin CA jsou zřetelně odlišné, ale aktivní místa těchto enzymů jsou na úrovni struktury pozoruhodně podobná. Hlavním strukturním rozdílem mezi jednotlivými skupinami CA je charakter jejich kvartérních struktur. Zatímco α-CA jsou složeny z jednoho monomeru³⁹⁻⁴¹, β-CA tvoří oligomery složené se dvou až šesti monomerních podjednotek⁴². U zástupců γ-CA je známo jen několik málo struktur těchto enzymů. Za prototyp typické γ-CA je považována Cam z *Methanosarcina thermophila* jejíž aktivní centrum je tvořeno rozhraním tří jednotlivých monomerů, kde jsou koordinovány atomy Zn²⁺, mluvíme tak o homotrimeru^{43, 44}. ζ-CA jsou pravděpodobně monomerní enzymy, pokud tak můžeme usuzovat ze struktury jediné známé ζ-CA z *Thalassiosira weissflogii* (CdCA)^{45, 46}. U zbylé skupiny δ- CA nejsou doposud známe krystalové struktury a jejich struktury lze odvozovat pouze od homologních modelů s ostatními CA.

Jak již bylo řečeno karbonické anhydrasy jsou metaloenzymy, které ve svém aktivním místě mají nejčastěji zinkový iont Zn²⁺, byly však popsány i případy kdy se v aktivním místě nachází Cd²⁺, Fe²⁺ nebo Co²⁺^{47, 48}. Aktivní místo CA obvykle obsahuje ionty v tetraedrické geometrii se třemi aminokyselinovými zbytky jako ligandy. Kromě vody, se na koordinaci kovových iontů podílejí molekulové/hydroxylové ionty. Iont Zn²⁺ je přítomen v aktivním místě všech skupin CA. Přesto například u skupiny γ-CA za anaerobních podmínek je v aktivním místě nahrazen iont Zn²⁺ iontem Fe²⁺. Podobně tomu je u skupiny ζ-CA kde můžeme nalézt iont Cd²⁺. U celé řady α-CA byla popsána záměna iontu Zn²⁺ za iont Co²⁺ bez významné ztráty jejich katalytické aktivity.

A právě u α-CA, které jsou nejvíce prostudovány, byl popsán mechanismus konverze CO₂. Reakce začíná vazbou molekuly vody na zinkový iont, která jako nukleofil reaguje s CO₂. Tím vzniká HCO₃⁻, který je navázán na Zn²⁺ a následně nahrazen další molekulou vody, čímž může celý proces pokračovat. U β-skupiny je tento proces velmi podobný, avšak v některých případech dochází k tomu, že se molekuly vody neváží přímo na Zn²⁺ v aktivním místě enzymu a roli nukleofilu zde přebírá zbytek postranního řetězce Asp^{49, 50}.

Všechny známé karbonické anhydrasy u zástupců říše *Fungi* spadají do α- nebo β-skupiny. V průběhu evoluce však došlo, stejně jako u zvířat, rostlin nebo řas, ke znač-



Obr. 1: Struktury zástupců jednotlivých skupin CA získaných pomocí rengenostрукturní analýzy. (A) monomerní α-CA lidská CA II (PDB kód 1F2W)⁶⁰; (B) dimerní β-CA, Nce103 ze *S. cerevisiae* (PDB kód 5CKX)⁵³; (C) monomerní jednotka homotrimeru γ-CA Cam z *M. thermophila* (PDB kód 1QRG)⁴⁴; (D) monomerní ζ-CA ze *T. weissflogii* s iontem Cd²⁺ v aktivním místě (PDB kód 3UK8)³⁹.

né diverzifikaci říše a u třídy *Hemiascomycetes*, kam se řadí i kvasinky rodu *Candida*, nalézáme již pouze β -CA³³.

Role β -CA ve spojitosti s virulencí byla studována především u patogenních druhů *C. albicans* a *Cryptococcus neoformans*, u kterých je známo, že jsou schopny reagovat na širokou škálu životních podmínek, které se drasticky mění během infekce. *C. neoformans* ve svém přirozeném prostředí roste při nízkých koncentracích CO₂ jako saprofyt, ale v okamžiku, kdy infikuje plíce člověka, se musí přizpůsobit mnohem vyšším hodnotám CO₂ (až 5%)^{51, 52}. Podobně *C. albicans* může přežít nízké hladiny CO₂ (např. kožní infekce), ale je také schopna infikovat krevní oběh u imunokompromitovaných pacientů, kde koncentrace CO₂ dosahuje cca 5 %. Zvýšené koncentrace CO₂ podporují přechod této kvasinky z formy blastosporu k hyfálnímu růstu. Geny kodující CA byly nalezeny jak u *C. neoformans* (*CAN1*, *CAN2*) tak i u *C. albicans* (*NCE103*)⁵². Analýza delečních mutantů kódujících CA v *C. neoformans* a *C. albicans* ukázala, že geny *CAN2* a *NCE103* jsou nezbytné pro přežití za podmínek s nízkým obsahem CO₂ a naopak jsou postradatelné pro *in vivo* proliferaci a virulenci při vysokých úrovních CO₂. V *in vitro* podmínkách s nízkým obsahem CO₂ se nefunkčnost CA u *C. neoformans* projevila růstovými defekty spojenými s chybnou syntézou mastných kyselin a výslednou ztrátou virulence^{51, 52}.

Struktura β -CA u zástupců říše *Fungi*

Všechny strukturně popsané houbové CA jsou buď dimerní nebo tetramerní enzymy a lze je dále rozdělit do dvou strukturních typů podle jejich aktivního místa. V současné době jsou známy struktury čtyř houbových β -CA. Jedná se o Nce103 (PDB 3EYX)⁵³ ze *Saccharomyces cerevisiae*, Can2 z *Cryptococcus neoformans* – (PDB 2W3N)⁵⁴ a dvou Cas1, Cas2 ze *Sordaria macrospora* – (PDB 4O1J, 4O1K)⁵⁰.

První β -karbonická anhydasa u zástupců říše *Fungi* byla charakterizována v roce 1996 u *S. cerevisiae*. Prvotně byl tento enzym považován za součást neklasických sekrečních drah (z toho pramenící označení Nce – non-classical protein export pathway) a označen jako Nce103⁵⁵. Následné analýzy odhalily, že se jedná o β -CA, která je inhibována mnoha anionty a sulfonamidy. Další pokusy ukázaly, že mutantní kmeny s deletovaným genem *NCE103* nebyly schopné žít v nízké koncentraci CO₂ (0,033 %), naopak v přítomnosti vysoké koncentrace CO₂ (5 %), byly tyto kmeny schopné přežít⁵⁶. Bylo také prokázáno, že *NCE103* je více transkribován v nízké koncentraci CO₂ a detekovatelná CA aktivita odpovídala akumulaci *NCE103* mRNA v tomto prostředí⁴⁹. Zatímco vysoká koncentrace CO₂ vedla ke snížení transkripce tohoto genu a k ztrátě detekovatelné aktivity CA⁵⁷.

Krystalová struktura Nce103 (PDB 3EYX) s rozlišením 2,04 Å ukázala, že se jedná o biologicky aktivní dimer složený s identických monomerních jednotek. Podobně jako u jiných β -CA je tento monomer Nce103 tvořen: N-terminálním raménkem, konzervovaným jádrem a C-terminální subdoménou. N-terminální raménko

je ohraničeno dvěma α -helixy, které jsou odvrácené od zbytku molekuly a zprostředkovávají rozsáhlé kontakty s druhým monomerním a utvářejí tak biologicky aktivní dimer. Bylo prokázáno, že zkrácená verze (Nce103 Δ N50), která postrádá N-terminální raménko, může ještě vytvořit homodimer v roztoku, ale nevykazuje *in vitro* aktivitu, což ukazuje, že N-terminální raménko je nezbytné pro správnou aktivitu enzymu. Aktivní místo Nce103 se skládá ze čtyř β -listů (β 2- β 1- β 3- β 4) a pátého antiparalelního vlákna β 5 spojeného krátkou smyčkou. C-terminální subdoména je tvořena třemi vyčnívajícími α -helixy, které leží na povrchu konzervovaného jádra proteinu. Aktivní místo každého monomeru je umístěno na rozhraní obou monomerů, v prostoru chráněném před rozpouštědly. Iont (Zn²⁺) je v aktivním místě Nce103 koordinován třemi konzervovanými zbytky Cys57, His112 a Cys115 a molekulou vody jako čtvrtým koordinačním ligandem⁵³.

Další strukturně popsanou β -CA, u které byla prokázána spojitost s patogenitou a růstem v prostředí s nízkou koncentrací CO₂ je Can2 z *C. neoformans*. Can2 podobně jako mnoho dalších α - a β -CA je silně inhibován sulfonamidovým lékem acetazolamidem a benzolamidem. Stejně jako Nce103 ze *S. cerevisiae* je Can2 dimer, kde monomerní jednotky jsou tvořeny stejnými motivy (N-terminálním raménkem, konzervovaným jádrem a C-terminální subdoménou). Jediné markantní rozdíly oproti Nce103 je N-terminální prodloužení a naopak zkrácení C-konce C-terminální subdomény, které úzce souvisí s nemožností tvorby tetramerních a vyšších multimerních struktur⁵⁴.

Karbonické anhydrazy Cas1 a Cas2 ze *S. macrospora* jsou doposud poslední zástupci β -CA, u kterých je známa jejich struktura. V genomu *S. macrospora* byly identifikovány 4 geny kódující CA (*CAS1*, *CAS2*, *CAS3* a *CAS4*)^{33, 30}, přesto byla aktivita CA *in vitro* pozorována pouze u dvou hlavních β -CA a to Cas1 a Cas2. Bylo zjištěno, že Cas1 a Cas2 vykazují *in vitro* nízkou aktivitu ve srovnání s α -CA a β -CA. Na rozdíl od mnoha dalších CA, jsou Cas1 a Cas2 slabě inhibovány acetazolamidem a některými anionty, jako je NO₂⁻ a NO₃⁻. Zvláštností *S. macrospora* je, že je jedním z mála organismů, u kterého byla popsána schopnost přežít bez genů kódujících CA i v ovzduší s nízkým obsahem CO₂. Bylo popsáno, že deficientní kmen Δ cas *S. macrospora* v přítomnosti 0,04 % CO₂ byl schopen pomoci hyf dosáhnout míst obohacených o CO₂, a tím pádem byl schopen získat dostatek HCO₃⁻ pro růst a dokonce i pro tvorbu komplexních sexuálních struktur⁵⁸.

Krystalové struktury Cas1 a Cas2 odhalily, že biologicky aktivní molekulu těchto proteinů tvoří tetramer⁵⁰. Jedná se o první známé příklady tetramerních struktur β -CA u zástupců říše *Fungi*. Ačkoli celková aminokyselinová sekvenční identita Cas1 a Cas2 je pouze 37 %, je naopak jejich strukturní podobnost poměrně vysoká (RMSD = 1,63 Å). Celková struktura každého monomeru sestává z N-koncové oblasti, která tvoří dlouhé raménko složené ze dvou kolmo orientovaných α -helixů (α 1 a α 2), které překrývají sousední podjednotku, a tím usnadňují tvorbu dimerů. Centrální jádro je složeno z pětivláknového smíšeného β -listu (β 1- β 5), jehož čtyři β -vlákna (β 2- β 1- β 3- β 4) jsou v paralelním uspořádání

a pátý ($\beta 5$) je antiparalelní. V C-terminální subdoméně dominují α -helixy lemuující na jedné straně konvexního povrchu p-list, zatímco druhá strana je zapojena do tvorby dimeru a homotetrameru. V konstrukcích Cas1 a Cas2 byly pozorovány pouze malé rozdíly. Nejvýraznější rozdíl lze nalézt na aktivním místě obou enzymů. Iont zinku na aktivním místě CAS1 je koordinován postranními řetězci tří konzervovaných aminokyselin (Cys45, His101 a Cys104) a molekuly vody. Toto uspořádání u CA označujeme jako typ I neboli tzv. „otevřenou konformaci“. Naproti tomu iont Zn^{2+} v Cas2 je organizován postranními řetězci čtyř zbytků (Cys56, Asp58, His112 a Cys115) a nebylo možno pozorovat žádnou molekulu vody v těsné blízkosti aktivního místa. Organizace aktivního místa Cas2 označujeme jako typ II neboli tzv. „uzavřenou konformaci“. C-konec Cas2 oproti ostatním β -CA tvoří prodloužená smyčka, která hraje důležitou strukturální úlohu ve vytváření tetrameru. Toto prodloužení je přítomno pouze u CA tvořících biologicky aktivní tetramery⁵⁹.

Literatura

1. Brown GD, Denning DW, & Levitz SM *Science* 336, 647 (2012).
2. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, & Worm B *PLoS Biol* 9, e1001127 (2011).
3. Pfaller MA & Diekema DJ *Crit Rev Microbiol* 36, 1 (2010).
4. Sanglard D & Odds FC *Lancet Infect Dis* 2, 73 (2002).
5. Almirante B, et al. *J Clin Microbiol* 44, 1681 (2006).
6. Brito LR, et al. *Med Mycol* 44, 261 (2006).
7. Colombo AL, et al. *J Clin Microbiol* 44, 2816 (2006).
8. Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, & Horan T *Pediatrics* 117, 1680 (2006).
9. Pfaller MA, et al. *J Clin Microbiol* 39, 3254 (2001).
10. Nakamura T & Takahashi H *J Infect Chemother* 12, 132 (2006).
11. Ng KP, Saw TL, Na SL, & Soo-Hoo TS *Mycopathologia* 149, 141 (2001).
12. Hurley R & De Louvois J *Postgrad Med J* 55, 645 (1979).
13. Sobel JD *Lancet* 369, 1961 (2007).
14. Mayer FL, Wilson D, & Hube B *Virulence* 4, 119 (2013).
15. Pfaller MA & Diekema DJ *Clin Microbiol Rev* 20, 133 (2007).
16. Koh AY, Kohler JR, Cogshall KT, Van Rooijen N, & Pier GB *PLoS Pathog* 4, e35 (2008).
17. Perlroth J, Choi B, & Spellberg B *Med Mycol* 45, 321 (2007).
18. Kaur R, Ma B, & Cormack BP *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7628 (2007).
19. Seider K, Heyken A, Luttich A, Miramon P, & Hube B *Curr Opin Microbiol* 13, 392 (2010).
20. Hawser SP & Douglas LJ *Infect Immun* 62, 915 (1994).
21. Haynes K *Trends Microbiol* 9, 591 (2001).
22. Trofa AF, Levin M, Marchant CD, Hedrick J, & Blatter MM *Pediatr Infect Dis J* 27, 658 (2008).
23. Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, & Vezina C *J Antibiot (Tokyo)* 31, 539 (1978).
24. Anderson JB *Nat Rev Microbiol* 3, 547 (2005).
25. Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert I, & Doolittle WF *Science* 290, 972 (2000).
26. Barnett JA, Payne RW, & Yarrow D (2000) *Yeasts: characteristics and identification* (Cambridge University Press, Cambridge, U.K.; New York, NY, USA) 3rd Ed pp ix.
27. Shahid SK *Pharm Pat Anal* 5, 115 (2016).
28. Messer SA, Jones RN, & Fritsche TR *J Clin Microbiol* 44, 1782 (2006).
29. Elleuche S & Poggeler S *PLoS One* 4, e5177 (2009).
30. Elleuche S & Poggeler S *Microbiology* 156, 23 (2010).
31. Aguilera J, Van Dijken JP, De Winder JH, & Pronk JT *Biochem J* 391, 311 (2005).
32. Bahn YS & Muhlschlegel FA *Curr Opin Microbiol* 9, 572 (2006).
33. Elleuche S & Poggeler S *Curr Genet* 55, 211 (2009).
34. Supuran CT *Curr Pharm Des* 14, 601 (2008).
35. Supuran CT *The Biochemical journal* 473, 2023 (2016).
36. Del Prete S, et al. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 24, 4389 (2014).
37. Supuran CT *Curr Pharm Des* 14, 603 (2008).
38. Tripp BC, Smith K, & Ferry JG *J Biol Chem* 276, 48615 (2001).
39. Alterio V, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16233 (2009).
40. Pilka ES, Kochan G, Oppermann U, & Yue WW *Biochem Biophys Res Commun* 419, 485 (2012).
41. Whittington DA, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9545 (2001).
42. Rowlett RS *Biochim Biophys Acta* 1804, 362 (2010).
43. Alber BE & Ferry JG *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6909 (1994).
44. Kisker C, Schindelin H, Alber BE, Ferry JG, & Rees DC *EMBO J* 15, 2323 (1996).
45. Alterio V, et al. *Biochimie* 94, 1232 (2012).
46. Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y, & Morel FM *Nature* 452, 56 (2008).

Závěr

Z výsledků řady studií je patrné, že funkčnost CA může v případě kvasinek rodu *Candida* hrát zásadní roli pro jejich virulenci, či dokonce pro jejich přežití v prostředích s nízkou koncentrací CO_2 (0,04 % – tedy stejně jako v atmosférickém vzduchu). Tato skutečnost spolu s faktem, že si kandidy vytvářejí vůči současně používaným antimykotikům rezistence, dělá z CA těchto kvasinek jeden z možných cílů pro návrh nových antimykotik.

Vzhledem k tomu, že u kvasinek rodu *Candida* nebyly doposud nalezeny β -CA jako u savců, stávají se tyto enzymy atraktivními kandidáty na komplexní funkční a strukturní analýzu. Nová oblast cíleného výzkumu založená na využití informací získaných ze struktur CA v komplexech s jejich inhibitory a aktivátory je cestou pro vývoj silných a účinných léků na tomto poli.

Poděkování:

Financováno z projektu GA17-08343S.

Literatura (pokračování):

47. Lane TW & Morel FM *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4627 (2000).
48. Macauley SR, et al. *Biochemistry* 48, 817 (2009).
49. Amoroso G, Morell-Avrahov L, Muller D, Klug K, & Sultemeyer D *Mol Microbiol* 56, 549 (2005).
50. Lehneck R, et al. *FEBS J* 281, 1759 (2014).
51. Bahn Y-S, Cox GM, Perfect JR, & Heitman J *Current biology : CB* 15, 2013 (2005).
52. Mogensen EG, et al. *Eukaryot Cell* 5, 103 (2006).
53. Teng YB, et al. *BMC Struct Biol* 9, 67 (2009).
54. Schlicker C, et al. *J Mol Biol* 385, 1207 (2009).
55. Cleves AE, Cooper DN, Barondes SH, & Kelly RB *J Cell Biol* 133, 1017 (1996).
56. Gotz R, Gnann A, & Zimmermann FK *Yeast* 15, 855 (1999).
57. Aguilera J, Petit T, de Winder JH, & Pronk JT *FEMS Yeast Res* 5, 579 (2005).
58. Lehneck R, Elleuche S, & Poggeler S *Mol Microbiol* 92, 931 (2014).
59. Lehneck R & Poggeler S *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 8433 (2014).
60. Guerri A, Briganti F, Scozzafava A, Supuran CT, & Mangani S *Biochemistry* 39, 12391 (2000).

Souhrn

Blaha J., Dostál J., Pichová I.: Karbonické anhydrasy kvasinek rodu *Candida*

Patogenní kvasinky rodu *Candida* představují nejrozšířenější příčinu mykotických onemocnění. Tyto druhy jsou úspěšnými patogeny díky tomu, že jsou schopné se rozmnožovat v nejrůznějších místech jako je například kůže, gastrointestinální trakt, krev nebo vaginální sliznice a také díky schopnosti adheze na abiotické povrchy. Jednou z klíčových strategií přežití těchto patogenů je jejich schopnost polifero- vat v různých koncentracích oxidu uhličitého (CO₂). K zvládnutí takového rozdílu používají kvasinky rodu *Candida* karbonické anhydrasy (CA) kódované homologem genu *NCE103*, které katalyzují reverzibilní hydrataci CO₂ na bikarbonát. CA jsou postradatelné během infekce krevního řečiště, ale jsou nezbytné pro přežití kvasinek na kůži nebo na abiotických površích. Kvasinkové CA jsou strukturně odlišné od lidských a představují tak vhodný cíl pro vývoj profylaktických látek.

Klíčová slova: karbonická anhydrasa, *NCE103*, *Candida*, oxid uhličitý

Summary

Blaha J., Dostál J., Pichová I.: Carbonic anhydrases of the genus *Candida*

Pathogenic yeasts of the genus *Candida* represent the most prevalent cause of mycotic diseases worldwide. These species are successful pathogens due to their ability to proliferate under a wide variety of conditions, colonizing host niches as diverse as skin, blood, or vagina and also to adhere to abiotic surfaces. One of the key survival strategies of fungal pathogens is the ability to proliferate in different carbon dioxide (CO₂) concentrations. To cope with such difference, *Candida* possesses carbonic anhydrase (CA), encoded by *NCE103* gene, which catalyzes reversible hydration of CO₂ into bicarbonate. This enzyme is dispensable during the bloodstream infection, but it is essential for survival of the fungus on skin or abiotic surfaces. Fungal CAs are structurally unrelated to human CAs, which makes them an ideal target for prophylactic intervention.

Keywords: Carbonic anhydrase, *NCE103*, *Candida* spp., Carbon dioxide

ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA CINNAMALDEHYDU A N-ACETYLCYSTEINU

Kristýna Lokočová, Jana Michailidu

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; lokocovk@vscht.cz

Úvod

Mikroorganismy jsou často v porovnání s „vyššími“ organismy vnímány jako jednoduché bytosti. Studium mikrobiálního vývoje však ukázalo, že mikroorganismy jsou schopny komplexní diferenciaci a lze u nich sledovat rozmanité vzorce chování¹. Ve většině přirozených prostředí se v kontextu vazby mikroorganismů na okolí setkáváme nejčastěji s buňkami sdruženými v biofilmech – komplexních mikrobiálních uskupeních umožňujících kromě jiného pevné uchycení k povrchu. Mohli bychom téměř říci, že výskyt planktonických buněk je ve většině případů pouze formou přesunu mikroorganismů z místa na místo². Dalo by se spekulovat o tom, že tvorba biofilmu má některé společné znaky s ději jako je například tvorba plodnice u *Myxococcus xanthus*³. Většina volně se vyskytujících biofilmů je však mnohohodrová – různé mikroorganismy zde žijí ve sdružené komunitě, sdílejí genetický materiál pomocí horizontálního přenosu a vykonávají v rámci biofilmu své dané role. Z tohoto pohledu jsou tedy volně

se vyskytující biofilmy spíše vysoce diferencované komunity, jako například lidská města². Ačkoliv v přírodě výrazně převažují smíšené typy biofilmů, s jednodruhovými biofilmy se setkáváme při různých infekčních onemocněních a také na površích implantátů. Není tedy divu, že jsou tyto jednodruhové biofilmy v současnosti v centru vědeckého zájmu^{4,5,6}.

Biofilm

Jakmile se buňky mikroorganismů přichytí na povrch, začnou procházet sérií změn upozadujících znaky důležité pro planktonický způsob života (např. bičíky). Jednou z nejdůležitějších adaptací je v tomto směru exprese velkého množství exopolysacharidů chránících dozrávající biofilm a zvyšujících rezistenci vůči biocidním činidlům^{7,8,9,10,11}. U zralých biofilmů můžeme navíc pozorovat komplexní strukturální architekturu. Konfokálním skenovacím laserovým mikroskopem bylo dosaženo vizuální reprezentace této architektury například u biofilmů *Pseudomonas aeruginosa*. Vyvinutý biofilm

tohoto mikroorganismu se při kultivaci v proudění skládá z hříbových bakteriálních makrokolonií zasazených v extracelulární polysacharidové matrix protkané sítí kanálků umožňujících distribuci živin a signálních molekul¹². Mnoho vědeckých skupin studovalo podmínky, kterých musí být dosaženo, aby došlo k vytvoření biofilmu. V případě relativně velkého množství mikroorganismů (včetně mnoha lidských patogenů) bylo zjištěno, že nutnou podmínkou pro vytvoření a zrání biofilmu je fungující mezibuněčná komunikace – tzv. quorum sensing¹³. Tento fenomén by se dal popsat jako kolektivní rozhodování kolonií podmíněné tvorbou a detekcí signálních molekul, autoinduktorů, a jeho vliv se dá pozorovat v různých fázích vývoje biofilmu.

Quorum sensing

Regulace první fáze vývoje biofilmu, tedy přichytávání planktonických buněk na povrch, prostřednictvím quorum sensing, bylo pozorováno například u *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* a *Salmonella enterica*^{14,15,16}. Autoinduktory je řízeno také zrání biofilmu, při němž je zvyšována komplexita jeho architektury. Quorum sensing totiž ovlivňuje expresi faktorů ovlivňujících strukturu biofilmu – motilitu, produkci extracelulárních polymerů nebo například produkci rhamnolipidů primárně pozorovanou u zástupců rodu *Pseudomonas*^{17,18,19}. Tento způsob řízení zrání biofilmu byl pozorován u mikroorganismů jako je *Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophila* či *Streptococcus mutans*^{20,21,22,23,24}. Další důležitou součástí kolonizačního procesu mikroorganismů je schopnost buněk opouštět zralý biofilm a osidlovat nové povrchy, jakmile začne být na místě původního biofilmu patrný nedostatek živin^{25,26}. I v tomto případě byla u mnohých mikroorganismů prokázána regulace pomocí kolektivního rozhodování na základě detekce komunikačních molekul. Z těchto uvedeme například *Rhodobacter sphaeroides*, *Yersinia pseudotuberculosis* či *Xanthomonas campestris*^{27,28,29,30}. Zjednodušeně můžeme říci, že mezi bakteriemi existují dva hlavní typy bakteriálních quorum sensing systémů – gramnegativní bakterie využívají k mezibuněčné komunikaci typicky homoserinové laktony, kdežto grampozitivní bakterie disponují peptidovými systémy³¹. Kvasinky k mezibuněčné komunikaci využívají primárně aromatické alkoholy. Například u *C. albicans* byly konkrétně identifikovány dva hlavní autoinduktory jako farnesol a tyrosol³².

Potlačení systému regulace quorum sensing

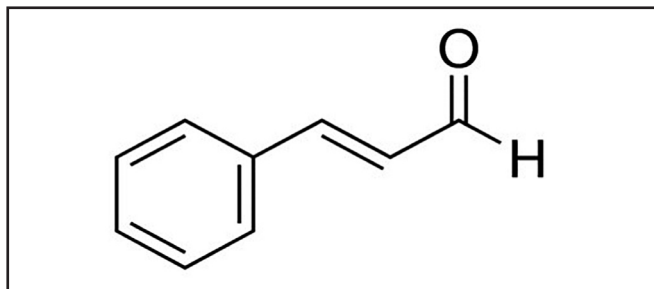
Potlačení systému quorum sensing může být u mikroorganismů využívajících quorum sensing k regulaci virulentních faktorů využito namísto klasických antimikrobiálních látek, jejichž neuvážené užívání nás dovedlo až ke vzniku rezistence bakterií na dané léky. Blokáce signálů quorum sensing vyvolává u patogenů využívajících mezibuněčnou komunikaci ke koordinaci virulence její snížení³³, jelikož tyto quorum sensing inhibitory dokáží inhibovat produkci respektive způsobovat degradaci signálních molekul³⁴. Konkurenční antagonisté komunikačních molekul naproti tomu nemají vlastní

signální aktivitu, ale vážou se na stejný receptor jako nativní agonisté. Příkladem mohou být fenylethylamidy (metabolity mořské grampozitivní bakterie *Halobacillus salinus*) podobné svou strukturou molekulám N-acyl-homoserinových laktónů (významná skupina komunikačních molekul u gramnegativních bakterií)³⁵. Zájem o aplikaci přírodních látek disponujících antibiofilmovou aktivitou v posledních letech stále narůstá³³. Velice zajímavými látkami z hlediska interference se systémem quorum sensing a biologické aktivity se jeví být cinnamaldehyd a N-acetylcystein.

Antibiofilmová aktivita cinnamaldehydu

Cinnamaldehyd je složkou esenciálního oleje obsaženého v kůře skořicovníku. Jedná se o fenylpropanoid s vysokou biologickou aktivitou³⁶. Je znám jeho inhibiční účinek na cílový protein LuxR u *Vibrio harveyi* a také schopnost ovlivnit produkci exopolysacharidů (EPS), a tím potlačit tvorbu biofilmu³⁵. Obecně vykázal cinnamaldehyd v dosavadních studiích široké spektrum antibakteriální aktivity. Ve studii Hammera a Heel (2012)³⁷ byla prokázána změna vlastností membrány snížením polarity a zvýšením propustnosti membrány u *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecalis* po expozici cinnamaldehydem v koncentraci mnohonásobně převyšující minimální inhibiční koncentraci. Co se týče přestupu cinnamaldehydu do intracelulárního prostoru, byla týmem Helander a kol. (1998)³⁸ postulována premisa, že proniká do buněk pravděpodobně prostřednictvím porinových proteinů procházejících vnější membránou. Další studie také naznačují, že cinnamaldehyd inhibuje ATPasovou aktivitu membrány³⁹.

Jia a kol. (2011)⁴⁰ sledovali účinek cinnamaldehydu na klinický izolát MRSA (methicilin-rezistentní *S. aureus*) a jeho tvorbu biofilmu – tyto kmeny izolované z klinického prostředí mají totiž vyšší pravděpodobnost tvořit biofilm na dlouhodobě zavedených lékařských implantátech. Ve studii byla prokázána malá citlivost klinických kmenů na cinnamaldehyd. Studie Pires a kol. (2011)⁴¹ dále demonstruje účinek cinnamaldehydu na biofilm kvasinky *Candida parapsilosis*. Esenciální olej *Cinnamomum zeylanicum* obsahující 54 % cinnamaldehydu inhiboval metabolickou aktivitu buněk biofilmu *C. parapsilosis* již při nízké koncentraci – 250 µl/ml. Tato skutečnost může spočívat v hydrofobitě těkavých komponent skořicového oleje. Ty umožňují vstup cinnamaldehydu do lipidové dvojvrstvy buněčné membrány, její narušení, a tím zvýšení její propustnosti pro protony. Ztráta důležitých iontů nakonec vede k buněčné smrti⁴¹. Další mechanismus, kterým může cinnamaldehyd ovlivňovat mikrobiální kultury, je inhibice quorum sensing. Bylo zjištěno, že cinnamaldehyd již při koncentraci 100 µl/l významně snižoval komunikaci prostřednictvím 3-hydroxy-C4-HSL i 3-oxo-C6-HSL autoinduktorů pravděpodobně bráněním navázání těchto komunikačních molekul na receptory. Dále bylo zjištěno, že stejná koncentrace cinnamaldehydu významně snižovala i komunikaci za použití dalšího známého autoinduktorů – AI-2. V tomto případě je očekávaným mechanismem inhibice ovlivňování biosyntézy daného autoinduktoru⁴².



Obr. 1: Chemická struktura cinnamaldehydu.

Antibiofilmová aktivita N-acetylcysteinu

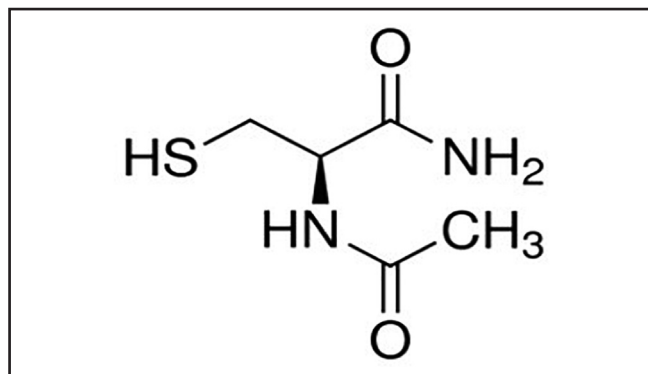
N-acetylcystein, z chemického hlediska thiol, je antioxidačním a mukolytickým činidlem⁴³. Jedná se o přírodní látku, která účinně inhibuje růst mikroorganismů a redukuje biofilmová seskupení lékařsky významných gram pozitivních i gram negativních bakterií, mezi něž patří například *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. aureus* a *Escherichia coli*⁴⁴. N-acetylcystein je schopen zvýšit terapeutickou aktivitu některých klasických antimikrobiálních látek (př. ciprofloxacín, tigecyklin) proti tvorbě bakteriálních biofilmů⁴⁵.

Ve studii Samantha a kol. (2012)⁴⁶ byly demonstrovány antibakteriální účinky a vliv N-acetylcysteinu na eradikaci biofilmu *E. faecalis*. N-acetylcystein má také schopnost inhibovat adhezi gram pozitivních bakterií již při koncentracích 3-7 mg/l⁴⁷. Dosavadní studie přisuzují antibiofilmovou aktivitu N-acetylcysteinu mnoha faktorům. Součástí mechanismu účinku N-acetylcysteinu je pravděpodobně disulfidická vazba jeho -SH skupiny na bakteriální protein. Tato skutečnost vede k nevratnému poškození bakteriálních proteinů, které jsou nezbytné pro růst a metabolismus bakterií⁴⁸. N-acetylcystein má schopnost narušit biofilm pravděpodobně i skrze svůj účinek na produkci EPS⁴⁷. Bylo také zjištěno, že N-acetylcystein snižuje tvorbu komunikačních molekul u *Pseudomonas aeruginosa*. Největší inhibiční aktivitu v tomto případě vykazoval liposomální N-acetylcystein⁴⁹. Navrhovaný mechanismus účinku N-acetylcysteinu je v tomto případě odvislý od premisy, že za aktivaci quorum sensing systému jsou z velké části odpovědné reaktivní kyslíkové částice (ROS). N-acetylcystein jakožto účinný antioxidant blokuje aktivaci QS systému skrze potlačení aktivity peroxidu vodíku a transkripčního regulátoru pro LasR⁵⁰. Volný i liposomální N-acetylcystein pak významně snižoval tvorbu elastasy – jednoho z hlavních virulentních faktorů tohoto mikroorganismu⁴⁹.

Literatura

1. O'Toole GO, Kaplan HB, Kolter R: *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49 (2000).
2. Watnick P, Kolter R: *J Bacteriol.* 182, 2675 (2000).
3. Shimkets LJ: *Annu Rev Microbiol.* 53, 525 (1999).
4. Adal KA, Farr BM: *Nutrition.* 12, 208 (1996).
5. Archibald LK, Gaynes RP: *Infect Dis Clin North Am.* 11, 245 (1997).
6. Dickinson M, Bisno AL: *Int J Artif Organs.* 16, 749 (1993).

Existují také studie zabývající se vlivem N-acetylcysteinu na tvorbu biofilmu kvasinek. Ve studii El-Baky (2014)⁵¹ byl sledován účinek N-acetylcysteinu na kvasinku *Candida albicans*. N-acetylcystein zde v kombinaci s ketokonazolem projevila vyšší inhibiční účinek jak při sledování vlivu na adhezi, tak na zralý biofilm *C. albicans*. Studie poukazuje na možnost N-acetylcysteinu inhibovat růst *C. albicans*, dimorfismus, jenž hraje důležitou roli při zrání biofilmu, a změnit strukturu již vytvořených biofilmů⁵¹. Synergické účinky N-acetylcysteinu a vybraných antibiotik na biofilm *C. albicans* byly publikovány ve studii Venkatesh a kol. (2009)⁵². Šlo zde o působení N-acetylcysteinu v kombinaci s flukonazolem a amfotericinem B. V případě použití N-acetylcysteinu a ketokonazolu (samostatně či v kombinaci) došlo k tvorbě snadno odstranitelných biofilmů z důvodu neschopnosti *C. albicans* tvořit hyfy⁵². Výborná antibiofilmová aktivita (schopnost narušit předem vytvořené biofilmy) a rovněž antimykotické vlastnosti (způsobené částečně inhibicí dimorfismu) N-acetylcysteinu mohou být s výhodou využívány k zabránění tvorby biofilmu na površích zdravotnického náčiní (př. katétrů)⁵¹.



Obr. 2: Chemická struktura N-acetylcysteinu.

Závěr

Výše zmíněné přírodní látky, cinnamaldehyd a N-acetylcystein, disponují značnou antibiofilmovou aktivitou. Jejich aplikace může být klíčová pro léčbu perzistentních biofilmových infekcí a mají potenciál být jedněmi z nových látek představujících řešení problémů rezistence biofilmů vůči antibiotikům.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokýškolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017).

7. Bayer AS, Speert DP, Park S, et al.: *Infect Immun.* 59, 302 (1991).
8. Boyd A, Chakrabarty AM: *J Ind Microbiol.* 15, 162 (1995).
9. Deretic V, Govan JRW, Konyecsni WM, et al: *Mol Microbiol.* 4, 189 (1990).
10. Gacesa P: *Microbiology.* 144, 1133 (1998).
11. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, et al.: *Clin Microbiol. Rev.* 4, 191 (1991).

Literatura (pokračování)

12. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, et al.: *J Bacteriol.* 173, 6558 (1991).
13. Parsek MR, Greenberg EP: *Trends Microbiol.* 13, (2005).
14. Yarwood JM, Schlievert PM: *J. Clin Invest.* 112, 1620 (2003).
15. Cole SP, Harwood J, Lee R, et al.: *J Bacteriol.* 186, 3124 (2004).
16. Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS: *Infect Immun.* 70 (2002).
17. Klausen, M, Aaes-Jørgensen A, Molinet S, et al.: *Mol Microbiol.* 50, 61 (2003).
18. Hentzer M, Teitzel GM, Balzeret GJ et al.: *J Bacteriol.* 183, 5395 (2001).
19. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA: *J Bacteriol.* 185, 1027 (2003).
20. Labbate M, Queck SY, Koh K, et al.: *J Bacteriol.* 186, 692 (2004).
21. Eberl L, Winson MK, Sternberg C, et al.: (1996) *Mol Microbiol.* 20, 127 (1996).
22. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, et al.: *Environ Microbiol.* 4, 18 (2002).
23. Merritt J, Qi F, Goodman SD, et al.: *Infect Immun.* 71, 1972 (2003).
24. Wen ZT, Burne RA: *J. Bacteriol.* 186, 2682 (2004).
25. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: *Nat Rev Microbiol.* 2, 95 (2004).
26. Parsek MR, Fuqua C: *J Bacteriol.* 186, 4427 (2004).
27. Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, et al.: *J Bacteriol.* 179, 7530 (1997).
28. Atkinson S, Throup JP, Stewart GS, et al.: *Mol Microbiol.* 33, 1267 (1999).
29. Dow JM, Crossman L, Findlay K, et al.: *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 100, 10995 (2003).
30. Crossman L, Dow JM: *Microbes Infect.* 6, 623 (2004).
31. Miller MB., Bassler BL: *Annu Rev Microbiol.* 55, 165 (2001).
32. Avbelj M, Zupan J, Raspor P: *Apl Microbiol Biotechnol.* 100, 7841 (2016).
33. Jha B, Kavita K, Westphal J, Hartmann A, et al.: *Mar Drugs.* 11, 253 (2013).
34. Norizan SNM, Yin WF, Chan KG: *Sensors.* 13, 5117.
35. Řezanka T, Masák J, Čejková A: *Stud Nat Prod Chem* 38, 269 (2012).
36. Ooi LSM, Li Y, Kam SL, et al.: *Am J Chin Med.* 34, 511 (2006).
37. Hammera KA, Heel KA: *Int J Antimicrob Agents.* 40, 239 (2012).
38. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, et al.: *J Agric Food Chem.* 46, 3590 (1998).
39. Bhatia R, Shreaz S, Khan N, et al.: *J Basic Microbiol.* 52, 504 (2012).
40. Jia P, Xue YJ, Duan XJ, et al.: *Lett Appl Microbiol.* 53, 1 (2011).
41. Pires RH, Montanari LB, Martins CHG, et al.: *Myco-pathologia.* 172, 453 (2011).
42. Niu C, Afre S, Gilbert ES: *Lett Appl Microbiol.* 43, 489 (2006).
43. Stey C, Steurer J, Bachmann S, et al.: *Eur Respir J.* 16, 253 (2000).
44. Zhao T, Liu Y: *BMC Microbiol.* 10, 140 (2010).
45. El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, et al: *Pol J Microbiol.* 58, 261 (2009).
46. Quah SY, Wu S, Lui JN, et al.: *J Endod.* 38, 81 (2012).
47. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H: *Appl Environ Microbiol.* 69, 4814 (2003).
48. Sevier CS, Kaiser CA: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 836 (2002).
49. Cugini C, Morales DK, Hogan DA: *Microbiol.* 156, 3096 (2010).
50. Hasanin A, Omri A: *J Nanomed Nanotechnol.* 5, 219 (2014).
51. El-Baky RMA, El Ela DMA, Gad GFM: *Am J Infect Dis Microbiol.* 2, 122 (2014).
52. Venkatesh M, Rong L, Raad I, et al.: *J Med Microbiol.* 58, 936 (2009).

Souhrn

Lokočová K., Michailidu J.: Antibiofilmová aktivita cinnamaldehydu a N-acetylcysteinu

Biofilmy oportunně patogenních mikroorganismů představují zdroj četných obtížně léčitelných onemocnění. Studium přírodních biologicky aktivních látek a jejich vlivu na tvorbu a stabilitu biofilmů hraje významnou roli v současném výzkumu. Přírodní produkty extrahované z nesčetného množství rostlin představují potenciální zdroj nových antimikrobiálních a antibiofilmových činidel. Ze zmíněné kategorie látek práce předkládá cinnamaldehyd a N-acetylcystein.

Klíčová slova: biofilm, antibiofilmová aktivita, cinnamaldehyd, N-cetylcystein

Summary

Lokočová K., Michailidu J.: Anti-biofilm activity of cinnamaldehyde and N-acetylcysteine

The biofilms of opportunistic pathogens are a source of numerous difficult-to-treat infections. Exploration of natural biologically active compounds and their influence on the formation and stability of biofilms plays an important role in current research. Natural compounds isolated from plants can be viewed as a potential source of new anti-microbial and anti-biofilm agents. From this category, cinnamaldehyde and N-acetylcysteine are presented.

Keywords: biofilm, anti-biofilm activity, cinnamaldehyde, N-acetylcysteine

QUORUM SENSING GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ

Jana Michailidu, Martina Paldrychová

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze; jana@michailidu.cz

Úvod

V době narůstajících komplikací v důsledku vzniku a nárůstu bakteriálních rezistencí je stále větší pozornost soustředována na nové postupy namířené proti mikrobiálním infekcím a dalším problémům zapříčiněným mikroorganismy. Ovlivňování mezibuněčné komunikace (jinak také quorum sensing), tedy jakási molekulární informační válka, se v současnosti jeví jako velmi perspektivní směr dalšího bádání. Bylo totiž zjištěno, že mezibuněčnou komunikací jsou regulovány mimo jiné i geny pro virulentní faktory většiny patogenních mikroorganismů^{1,2,3,4}. Ovlivněním produkce, či detekce komunikačních molekul je teoreticky možné dosáhnout zabránění exprese virulentních faktorů, mezi něž patří například tvorba extracelulárních lytických enzymů, tvorba a zrání biofilmu, či tvorba toxinů.

Quorum sensing

Quorum sensing byl poprvé objeven a popsán již před více než 40 lety u dvou světélkujících mořských bakteriálních druhů – *Vibrio fischeri* a *Vibrio harveyi*⁵. Zpočátku bylo předpokládáno, že je takováto mezibuněčná komunikace u mikroorganismů spíše anomálií. Následující výzkumy však ukázaly, že různé způsoby mezibuněčné komunikace využívá pravděpodobně většina mikroorganismů.

Všechny bakterie využívající quorum sensing systémy produkují a vylučují signální molekuly, jenž se nazývají autoinduktory (AI) – zvyšování jejich koncentrace je funkcí buněčné denzity. Jakmile je akumulací těchto molekul v růstovém médiu dosaženo mezní stimulační koncentrace, dochází ke změně genové exprese⁷. Touto regulací dochází ke kolektivní koordinaci dějů, jako jsou tvorba surfaktantů, sporulace, horizontální přenos genetické informace, či produkce antibiotik⁸. Z dalších výzkumů jsme se dozvěděli také to, že bakterie ke kolektivnímu rozhodování tohoto typu využívají široké spektrum různých komunikačních molekul integrovaných v rámci komplexních hierarchických regulačních struktur⁶.

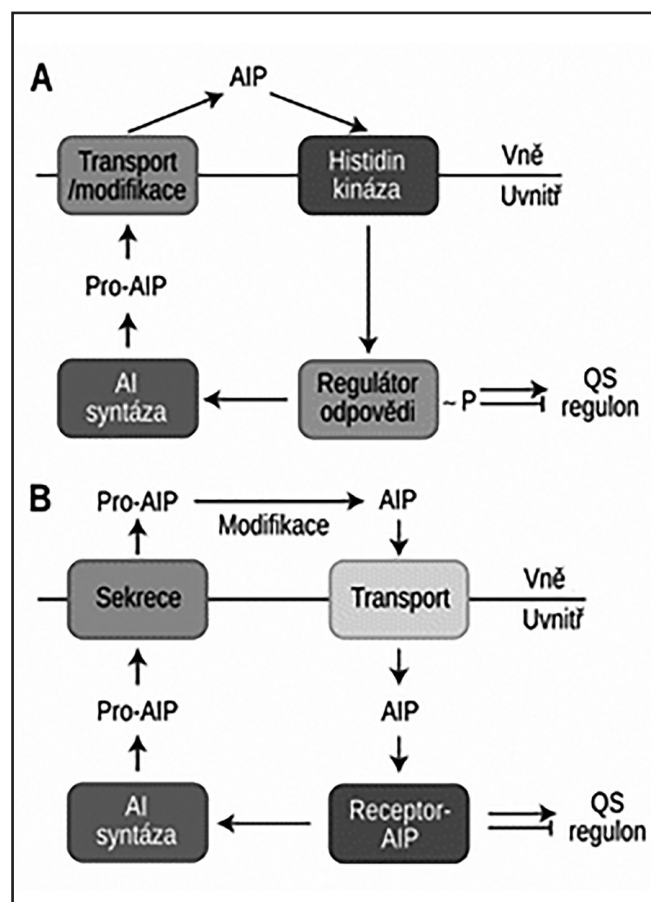
Quorum sensing grampozitivních bakterií

Grampozitivní a gramnegativní bakterie používají různé typy komunikačních systémů – gramnegativní bakterie většinou využívají sekrece a detekce N-acyl-homoserinových laktonů (AHL), kdežto grampozitivní bakterie komunikují prostřednictvím oligopeptidů (AIP – autoinducer peptide)⁸. V tomto článku bude představena architektura quorum sensing systémů grampozitivních bakterií a blíže také struktura mezibuněčné komunikace zástupců tří hlavních potenciálně patogenních grampozitivních rodů: *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus*.

Grampozitivní bakterie v závislosti na rostoucí buněčné denzitě prostřednictvím mezibuněčné komunikace regulují široké spektrum procesů – využívají k tomu, jak

už bylo řečeno, peptidy, jenž jsou po vytvoření posttranslačně modifikovány a následně vylučovány prostřednictvím ATP-vazných transportérů (ABC – ATP-binding cassette). Jakmile je v médiu dosaženo dostatečné buněčné denzity a je překročena daná hraniční koncentrace autoinduktorů, naváží se tyto malé peptidové molekuly na odpovídající membránový histidin kinasový receptor, složený ze dvou částí, jenž se fosforyluje a přenáší fosfát dále na intracelulární regulátor odpovědi. Takto fosforylovaný regulátor odpovědi následně aktivuje transkripci genů v quorum sensing regulonu^{9,10}.

U některých grampozitivních bakterií je možno pozorovat i mírně pozměněný systém, v němž dochází k průchodu autoindukčních peptidů dovnitř buňky, kde přímo interagují s transkripčními faktory, a ovlivňují tak jejich aktivitu. Tímto způsobem je opět ovlivněna genová exprese (Obr. 1)³.



Obr. 1: Quorum sensing systémy grampozitivních bakterií. Autoindukční peptidy (AIP) mohou být součástí dvoukomponentové signální soustavy (A), či se přímo vázat na transkripční faktory uvnitř buňky (B).

Streptococcus

Zástupci rodu *Streptococcus* jsou zodpovědní za velkou řadu lidských infekcí. Někteří z nich existují jako součást přirozeného mikrobiomu a účastní se

oportunních infekcí, jiní zase patří k exogenním patogenům způsobujícím jak lehká onemocnění dýchacího traktu, tak život ohrožující nemoci jako je například zápal plic, septický šok, či nekrotizující fasciitida. Výzkumy potvrdily, že u mnoha druhů streptokoků se vyvinuly podobné peptidové quorum sensing systémy, jenž jim pomáhají přežít proměnlivé podmínky v rámci hostitelského organismu¹¹.

Quorum sensing systém užívaný zástupci rodu *Streptococcus* zde bude znázorněn na zástupci, u nějž byla poprvé popsána genetická transformace podmíněná mezibuněčnou komunikací – *Streptococcus pneumoniae*¹². K úspěšnému předání genetické informace je totiž nutné u recipientní bakterie navodit stav kompetence – proces regulovaný systémem quorum sensing¹³.

Peptidová signální molekula, jejíž dostatečná koncentrace je u *S. pneumoniae* vyžadována pro navození kompetentního stavu je nazývána CSP (competence stimulating peptide). CSP je 17-aminokyselinový peptid, jenž je produkován z 41-aminokyselinového prekursoru, nazvaného ComC^{14,15}. ComAB ABC transportér následně vylučuje CSP ven z buňky^{16,17}. Detekce akumulovaného CSP je zprostředkována pomocí ComD sensorové kinasy¹⁸. Vysoká koncentrace CSP v prostředí indukuje autofosforylaci ComD a následný přesun fosfátové skupiny na regulátor odpovědi ComE. ComE-P dále aktivuje transkripci genu *comX*. ComX je alternativou k bakteriálnímu σ faktoru, jenž je potřebný pro transkripci strukturálních genů zapojených do dějů vedoucích k nastolení stavu kompetence¹⁹.

Staphylococcus

Staphylococcus aureus a *Staphylococcus epidermidis* jsou grampozitivní koky, jenž jsou za normálních okolností součástí mikrobiomu kůže. Kolonizace lidského těla těmito mikroorganismy s sebou většinou nenese negativní jevy. Nicméně například při narušení epiteliální bariéry může rychle dojít k rozvinutí vážného onemocnění²⁰. Invazivní patogen *S. aureus* může způsobovat kožní infekce, syndrom toxického šoku, či otravy z jídla. Velká část důležitých faktorů virulence tohoto lidského patogenu je regulována opět peptidovým quorum sensing systémem (např. tvorba exoproteas, enterotoxinů či tvorba a zrání biofilmu).

V tomto systému reguluje patogenicitu závislou na buněčné denzitě molekula RNA, pojmenovaná RNAlII²¹. Operon *agrBDCA* obsahuje informace pro strukturu komponent peptidového quorum sensing systému, jenž se parciálně podílí na regulování hladiny RNAlII^{22,23,24}. Lokus *agrBDCA* sousedí s oblastí, jenž kóduje zmiňovaný RNAlII transkript²¹. Gen *agrD* kóduje strukturu 46-aminokyselinového prekursorového peptidu AgrD, který je následně modifikován na výsledný oktapeptid pomocí mechanismu, jehož průběh závisí na přítomnosti AgrB^{10,26}. Modifikovaný peptidový autoinduktor *S. aureus* obsahuje thiolaktonový kruh, jenž je nutný pro jeho signální aktivitu²⁷. AgrC zde plní roli sensorové kinasy a AgrA je příslušný regulátor odpovědi^{24,28}. Fosforylaci regulátoru odpovědi dochází ke zvýšení koncentrace RNAlII, která působí jako efektör v kontextu aktivace exprese široké škály vylučovaných virulentních faktorů⁶.

Bacillus

Bacillus subtilis je půdním organismem využívajícím komplexní quorum sensing systém mimo jiné k rozhodování o přechodu do kompetentního stavu či o započatí procesu sporulace. Kompetence je na rozdíl od ostatních rodů (např. *S. pneumoniae*) dosahováno většinou až ve fázi zpomaleného růstu. Jelikož v této fázi již narůstá podíl lyze buněk stejné kolonie, předpokládá se, že si tímto specifickým načasováním nástupu kompetence rod *Bacillus* zaručuje příjem velmi příbuzné náhradní DNA. Proces sporulace je u *B. subtilis* spuštěn, jakmile se podmínky prostředí rapidně zhorší, či je růst bakterie limitován některou ze základních živin²⁹.

Regulaci kompetence a sporulace zprostředkovávají systémem quorum sensing dva peptidy, pojmenované ComX a CSF (kompetenční a sporulační faktor). ComX je 10-aminokyselinový peptid, jenž obsahuje hydrofobní modifikace na tryptofanovém zbytku – jedná se o strukturu důležitou pro jeho signální aktivitu. Modifikovaný ComX je odvozen od 55-aminokyselinového prekursoru, jenž je zakódován v genu *comX*^{30,31,32}. K detekci akumulovaného ComX dochází prostřednictvím dvoukomponentové sensorové kinasy/regulátoru odpovědi ComP/ComA^{30,32}. Autofosforylovaný ComA-P aktivuje expresi genu *comS*, a ComS následně inhibuje proteolytickou degradaci ComK proteinu (transkripční aktivátor kontrolující expresi strukturálních genů nutných pro vývoj kompetence)^{33,34,35}.

Druhým zúčastněným peptidem je pentapeptid CSF, jenž je produkován odštěpením 5-aminokyselinového zbytku z prekursorového peptidu PhrC³¹. CSF je na rozdíl od ComX importován do buňky pomocí oligopeptidového ABC-transportéru Opp^{31,32,36}. Bylo zjištěno, že nízké intracelulární koncentrace CSF vedou k převaze kompetence, kdežto vysoké koncentrace CSF kompetenci inhibují a naopak indukují sporulaci. Vysoké koncentrace CSF také inhibují expresi genu *comS*, což vyústí ve zvýšenou proteolýzu ComK, proteinu důležitého pro navození stavu kompetence^{31,37}.

Quorum quenching

Hlavní rolí quorum sensing se jeví být globální kontrola nad fyziologií bakteriálních populací. Schopnost narušování mezibuněčné komunikace mezi bakteriemi, tzv. quorum quenching, může být silnou evoluční výhodou mezi kompetujícími druhy, či kmeny (např. *S. aureus*), ale také velmi zajímavým předmětem vědeckého bádání.

Například u bakterie *S. aureus* můžeme sledovat čtyři skupiny zástupců, pro každou z nich je typická určitá modifikace thiolaktonového kruhu v komunikační molekule. Peptidové autoinduktory jedné skupiny však inhibují quorum sensing všech tří ostatních skupin. Mnoho druhů rodu *Bacillus* vylučuje enzym AiiA, jenž nespecificky štěpí laktonové kruhy N-acyl-homoserinových laktonů používaných gramnegativními bakteriemi, čímž je zbavuje jejich funkce. AiiA vykazuje velmi širokou škálu účinnosti⁷.

Quorum quenching molekuly se právem staly středem zájmu mnoha výzkumných skupin, jelikož skýtají

mnohá uplatnění a mohly by nabídnout řešení jednoho z palčivých problémů současné společnosti. Například ve studiích Mayville a kol. (1999) a Lyon a kol. (2000) byly identifikovány klíčové strukturální znaky molekul podílejících se na antagonismu i aktivaci quorum sensing systému bakterie *S. aureus*, a byla tak navržena struktura globálního inhibitoru její virulence^{27,38}. Již od objevení prvního z quorum quenching enzymů kódovaného genem *aiiA* (Dong et al. 2000), byly AHL-laktonasy a AHL-acylasy často používány při studiu role N-acyl-homoserinových laktonů³⁹. Quorum quenching enzymy, společně s menšími přírodními quorum sensing inhibitory a také syntetickými deriváty jsou v současnosti zkoumány jako nová antimikrobiální činidla – například u transgenních brambor s exprimovaným genem pro AiiA byla pozorována rezistence vůči bakteriálnímu patogenu *Erwinia carotovora* – bakterie nebyla schopna exprimovat geny virulence v nepřítomnosti dostatku signálních molekul v prostředí^{40,41}.

Literatura

1. Deep A, Chaudhary U, Gupta V: *J. Lab. Physicians* 3, 4 (2011).
2. Novick RP, Muir TW: *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 40 (1999).
3. Rutherford ST, Bassler BL: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a012427 (2012).
4. de Kievit TR, Iglewski BH: *Infect. Immun.* 68, 4839 (2000).
5. Nealson KH, Hastings JW: *Microbiol. Rev.* 43, 496 (1979).
6. Miller MB, Bassler BL: *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165 (2001).
7. Waters CM, Bassler BL: *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 319 (2005).
8. Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST: *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18490 (2007).
9. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN: *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183 (2000).
10. Ji G, Beavis RC, Novick RP: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12055 (1995).
11. Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP: *J. Clin. Invest.* 112, 1626 (2003).
12. Dawson MH, Sia RH: *J. Exp. Med.* 54, 681 (1931).
13. Morrison DA: *Microb. Drug Resist.* 3, 27 (1997).
14. Havarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11140 (1995).
15. Pozzi G, Masala L, Iannelli F, Manganelli R, Havarstein LS, Piccoli L, Simon D, Morrison DA: *J. Bacteriol.* 178, 6087 (1996).
16. Hui FM, Morrison DA: *J. Bacteriol.* 173, 372 (1991).
17. Hui FM, Zhou L, Morrison DA: *Gene* 153, 25 (1995).
18. Pestova EV, Havarstein LS, Morrison DA: *Mol. Microbiol.* 21, 853 (1996).
19. Lee MS, Morrison DA: *J. Bacteriol.* 181, 5004 (1999).
20. Yarwood JM, Schlievert PM: *J. Clin. Invest.* 112, 1620 (2003).
21. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S: *EMBO J.* 14, 4569 (1995).
22. Morfeldt E, Janzon L, Arvidson S, Löfdahl S: *Mol. gen. Genet.* 211, 435 (1988).
23. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S: *Mol. gen. Genet.* 248, 446 (1995).
24. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P: *J. Bacteriol.* 170, 4365 (1988).
25. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S: *EMBO J.* 14, 4569 (1995).
26. Ji G, Beavis R, Novick RP: *Science* 276, 2027 (1997).
27. Mayville P, Ji G, Beavis R, Yang H, Goger M, Novick RP, Muir TW: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1218 (1999).
28. Lina G, Jarraud S, Ji G, Greenland T, Pedraza A, Etienne J, Novick RP, Vandenesch F: *Mol. Microbiol.* 28, 655 (1998).
29. Ansaldi M, Marolt D, Stebe T, Mandic-Mulec I, Dubnau D: *Mol. Microbiol.* 44, 1561 (2002).
30. Magnuson R, Solomon J, Grossman AD: *Cell* 77, 207 (1994).
31. Solomon JM, Lazazzera BA, Grossman AD: *Genes Dev.* 10, 2014 (1996).
32. Solomon JM, Magnuson R, Srivastava A, Grossman AD: *Genes Dev.* 9, 547 (1995).
33. Turgay K, Hahn J, Burghoorn J, Dubnau D: *EMBO J.* 17, 6730 (1998).
34. Turgay K, Hamoen LW, Venema G, Dubnau D: *Genes Dev.* 11, 119 (1997).
35. van Sinderen D, Luttinger A, Kong L, Dubnau D, Venema G, Hamoen L: *Mol. Microbiol.* 15, 455 (1995).
36. Lazazzera BA, Solomon JM, Grossman AD: *Cell* 89, 917 (1997).
37. Perego M: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8612 (1997).
38. Lyon GJ, Mayville P, Muir TW, Novick RP: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13330 (2000).
39. Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3526 (2000).
40. Dong YH, Wang LH, Zhang LH: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362, 1201 (2007).
41. Dong YH, Wang LH, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH: *Nature* 411, 813 (2001).
42. Maeda T, García-Contreras R, Pu M, Sheng L, Garcia LR, Tomás M, Wood TK: *ISME J.* 6, 493 (2012).
43. García-Contreras R, Maeda T, Wood T: *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6840 (2013).

Závěr

V době, kdy je narůstající rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům stále důležitějším tématem, se metody zamezování mikrobiální komunikace jeví jako nadějná cesta k řešení tohoto problému. Je nicméně nutné přemýšlet v tomto směru koncepčně.

Převládajícím mechanismem rezistence vůči některým antibiotikům dnes už i quorum quenching molekulám je eflux intracelulárně působících látek ven z buňky (např. syntetický furanon C-30). Studium extracelulárně působících látek ovlivňujících quorum sensing (např. chitosan), či kombinace intracelulárně působících látek s dalšími fyzikálními antimikrobiálními metodami (např. aplikace nízkoteplotního plasmatu) se tedy jeví jako udržitelnější varianta^{42,43}.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický cyskolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017).

Souhrn

Michailidu J., Paldrychová M.: Quorum sensing gram pozitivních bakterií

Lidstvo se v současnosti potýká s důsledky neuváženého užívání antibiotik – stále rozšířenější rezistence patogenních bakteriálních druhů nutí vědce poohlížet se po jiných metodách zamezení infekcí či kolonizací povrchů těmito nevídanými hosty. Objevení mezibuněčné komunikace mikroorganismů a souvislosti quorum sensing s expresí virulentních faktorů daných mikroorganismů bylo v tomto směru rozhodně vítanou událostí. Pro správné využití quorum sensing systému ke koncepčnímu boji proti mikroorganismům je ale nejdříve potřeba mechanismy těchto systémů ovlivňujících expresi genů i mechanismy jejich ovlivňování podrobněji popsat a pochopit. Při neuvážené aplikaci by zde totiž potenciálně také mohly vzniknout problémy s rezistencí (obzvláště u intracelulárně působících quorum sensing inhibitorů).

Klíčová slova: quorum sensing, gram pozitivní bakterie, quorum quenching

Summary

Michailidu J., Paldrychová M.: Quorum sensing in gram-positive bacteria

Humanity is currently battling the consequences of its own careless behaviour regarding antibiotics – growing resistance of pathogenic bacterial species is pushing scientists to search for novel methods to fight infections and to repress colonisation of surfaces by these unwanted guests. The discovery of bacterial intercellular communication (quorum sensing) and its connection to expression of virulence factors has definitely been a great leap forward in this regard. However there has to be great caution before we use these findings to battle the microorganisms – we have to study these processes of altering gene expression to understand them. With uninformed application, new problems with resistance could arise (especially with intracellular quorum quenching molecules).

Keywords: quorum sensing, gram positive bacteria, quorum quenching

FAKTORY VIRULENCE BAKTERIE *Pseudomonas aeruginosa*

Martina Paldrychová

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

Úvod

Chemická komunikace mezi bakteriemi prostřednictvím systémů quorum sensing je ústředním prvkem jejich života. Dovoluje jim rozpoznat, kdo jsou jejich sousedé, ať už jsou jim příbuzní nebo nepříbuzní, a spočítat je. Quorum sensing je zásadní pro řadu bakteriálních procesů a umožňuje bakteriím organizovat kolektivní chování¹. Mimo proces adheze buněk či produkce surfaktantů hraje klíčovou roli během řízení exprese genů kódujících faktory virulence. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* disponuje celým arzenálem těchto faktorů. Předpokládá se, že právě pochopení mechanismů vedoucích k jejich syntéze může být klíčem k nalezení nových terapeutik aplikovatelných pro prevenci a léčbu bakteriálních infekcí². Tento článek poskytne přehled faktorů virulence *P. aeruginosa*, jejichž syntéza je řízena prostřednictvím vysoce organizovaných a vzájemně propojených QS systémů.

QS systémy *P. aeruginosa*

Bakterie schopné mezibuněčné komunikace zpravidla při vysoké optické hustotě produkují a uvolňují do okolního prostředí malé signální molekuly. Akumulace signálních molekul vede k jejich interakci s příslušnými receptory a následné indukci transkripce genů kódujících faktory virulence². *P. aeruginosa* využívá hustou síť receptorů a regulátorů transkripce patřících do čtyř QS systémů (*las*, *rhl*, *pqs* a *iqs*)^{3,2}.

Systémy jsou hierarchicky uspořádány, přičemž *las* systém stojí na vrcholu kaskády^{4,5}. Receptor LasR povazbě signální molekuly (3-oxo-C12-homoserinového laktonu) aktivuje nejen transkripci cílových genů kódujících faktory virulence (elastasa, alkalická proteasa a exotoxin A)⁶, ale také transkripci genu kódujícího LasI syntasu, což vede k autoindukci⁴. Přítomnost molekuly 3-oxo-C12-HSL je vyžadována také pro diferenciaci

buněk tvořících biofilm – společenství mikroorganismů obalené extracelulární polymerní matrix, nevratně přichycené k povrchu⁸. Zvýšená produkce syntasy LasI potřebné k produkci této komunikační molekuly bývá zaznamenána zejména během iniciační fáze tvorby biofilmu⁷. Dále jsou komplexem LasR-3-oxo-C12-HSL aktivovány *rhl* a *pqs* QS systémy².

Rhl QS systém pracuje obdobně jako *las* systém, pokud je na receptor navázána signální molekula (v tomto případě C4-HSL), dojde k aktivaci RhII a k vytvoření autoindukční smyčky¹. Tento systém řídí zejména produkci rhamnolipidu⁹. C4-HSL dependentní QS systém je velmi důležitý během tvorby anaerobní zóny biofilmu, která je pozorována u pacientů s cystickou fibrózou⁷. Receptor RhIR inhibuje expresi receptoru pqsR. Naopak komplex PqsR-PQS je zpětně spouštěn, aby aktivoval receptor RhIR, který tyto tři QS systémy spojuje. Tato smyčka je navržena tak, aby byl zajištěn správný poměr autoinduktorů 3-oxo-C12-HSL k C4-HSL, který vede k aktivaci *pqs*¹.

Pqs QS systém poprvé popsal Pesci se svými spolupracovníky v roce 1999¹⁰. Signální molekula 2-heptyl-3-hydroxy-chinolon (*Pseudomonas* chinolon signál, PQS) se po navázání na receptor PqsR podílí na sekreci exotoxinu pyocyaninu nebo biosyntéze lektinu⁵.

V roce 2013 byl u bakterie *P. aeruginosa* objeven čtvrtý QS systém. Struktura jeho signální molekuly byla popsána jako 2-(2-hydroxyfenyl)-thiazol-4-karbaldehyd (IQS). Produkce IQS je za normálních kultivačních podmínek řízena prostřednictvím *las* QS systému. Může být, ale také aktivována stresem (např. limitace fosfáty je v průběhu infekce poměrně častým jevem). Klinické izoláty velice často obsahují mutace v centrálním *las* QS systému. Bylo prokázáno, že *iqs* QS systém je schopen částečně převzít jeho úlohu a exprese faktorů virulence může být tímto způsobem zachována³. Toto je velice důležitý poznatek, neboť stávající strategie zaměřené na potlačení funkce centrálního *las* QS systému (aplika-

ce QS inhibitorů), za účelem potlačení virulence bakterií *P. aeruginosa*, se mohou jevit jako neefektivní. Při vývoji účinnějších anti-QS terapeutik by měl být význam iqs QS systému brán v potaz².

Tato kapitola pouze nastíní složitost propojení čtyř doposud popsaných QS systémů *P. aeruginosa*, které řídí expresi řady virulentních faktorů. Následující kapitoly se zaměří na popis těchto faktorů a jejich význam pro průběh infekcí způsobených *P. aeruginosa*.

Elastasa

Proteasy, mezi něž patří také LasB a LasA elastasa, hrají hlavní roli během akutní infekce *P. aeruginosa*. Schopnost štěpit elastin, který je hlavní součástí plicní tkáně, vede k jejímu poškození a plicnímu krvácení¹¹. LasB elastasa degraduje nejen elastin, ale také fibrin a kolagen. Dále je schopna deaktivovat imunoglobuliny G a A a látky podílející se na obraně dýchacího ústrojí vůči proteasám. LasB elastasa tedy nejen ničí tkáň obsahující elastin, ale také zasahuje do obranných mechanismů hostitele¹². *Pseudomonas aeruginosa* produkuje v reakci na nedostatek železa siderofory pyoverdin a pyochelin. Zisk železa je poté zajištěn produkcí elastasy, která proteolyticky degraduje transferrin¹³.

Alkalická proteasa

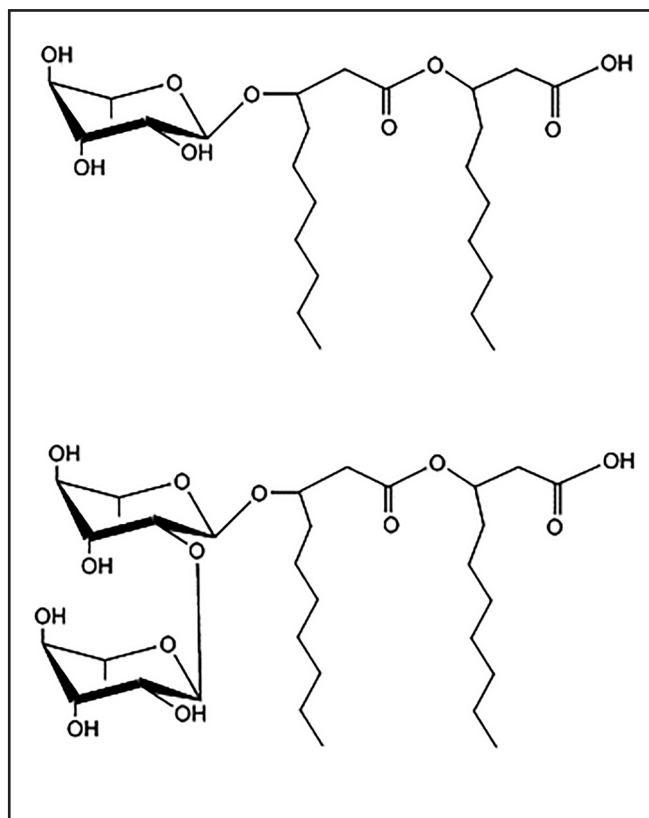
Alkalická proteasa patří do skupiny serralysinů – faktorů virulence velice hojně rozšířených mezi gram-negativními bakteriemi včetně rodů *Serratia* a *Erwinia*. Tato proteasa je schopna degradace komplementárního proteinu C3 podporujícího fagocytózu a lokální zánětlivé reakce^{14,15}. Dále degraduje interferon γ , cytokin, který má zásadní význam pro imunitu vůči bakteriálním infekcím, a jednu z klíčových mikrobiálních rozpoznávacích molekul – monomerní flagelin, čímž snižuje aktivaci Toll-like receptorů¹⁴.

Exotoxin A

Exotoxin A patří stejně jako difterický toxin, cholera toxin, pertusis toxin a toxiny produkované rodem *Clostridium*, do skupiny bakteriálních ADP-ribosyltransferas. Jedná se o nejtoxickejší protein produkovaný *P. aeruginosa*¹⁶. Cílovým místem exotoxinu A je elongační faktor 2, jehož inhibice vede k narušení biosyntézy proteinů a smrti buněk hostitelského mikroorganismu¹⁶⁻¹⁷. Exotoxin A má taktéž imunosupresivní účinky¹⁸.

Rhamnolipid

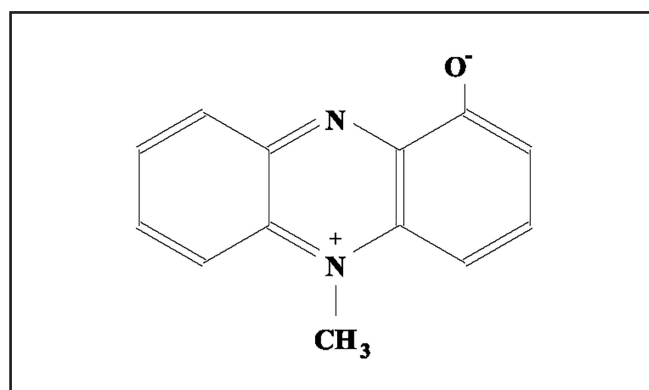
Rhamnolipid, biosurfaktant, glykolipid obsahující rhamnosu (Obr. 1), solubilizuje fosfolipidy obsažené v plicní tkáni, která je takto přístupna štěpení fosfolipasou C¹⁹. Také se významnou měrou podílí na architektuře biofilmu *P. aeruginosa*^{7,20}. Podrobná mikroskopická analýza ukázala, že biofilmy *P. aeruginosa* jsou otevřené, vysoce hydratované struktury složené z buněk zabudovaných do extracelulární matrice s obsahem vysokého množství kanálků umožňujících tok tekutin uvnitř biofilmu. Tvorba charakteristických biofilmů *P. aeruginosa*, včetně kanálků je regulovaným procesem. Indukovaná syntéza rhamnolipidů během pozdější fáze vývoje biofilmu představuje mechanismus, při kterém bakterie využívají komunikaci k aktivnímu udržování těchto kanálků²⁰.



Obr. 1: Struktura monorhamnolipidu (nahore) a dirhamnolipidu (dole) produkovaných *P. aeruginosa*²¹

Pyocyanin

Modrý pigment s fenazinovou strukturou (Obr. 2) – pyocyanin (PCN) disponuje redox aktivitou díky které se podílí na produkci reaktivních kyslíkových částic (ROS). Takto produkované ROS částice jsou schopny inhibovat aktivitu katalasy a vyčerpávat zásoby antioxidantu glutathionu. Nadměrná a neustálá produkce ROS vede k inhibici antioxidačních mechanismů organismu a poškození tkání. Pyocyanin dále podporuje produkci superoxidů, paralyzuje cévy dýchacích cest a inhibuje tvorbu oxidu dusnatého makrofágy a produkci prostacyklinu²². Pyocyanin disponuje také antibakteriální a antifungální aktivitou²³.



Obr. 2: Struktura pyocyaninu²⁴

Lektin

Lektiny představují specifickou třídu proteinů schopných vázat sacharidy. *P. aeruginosa* produkuje dva tyto adheziny: LecA a LecB. Galaktofilní LecA má cytotox-

ké účinky na buňky epitelu dýchacího systému. LecB vykazuje vysokou specifitu pro L-fukosu, její deriváty a D-manosu. Zvýšená terminální fukosylace glykoproteinů epitelu dýchacích cest je typická pro pacienty trpící cystickou fibrózou, tento jev se podílí na chronických respiračních onemocněních způsobovaných rodem *Pseudomonas*. Lektiny zprostředkované interakce buněk určují schopnost *P. aeruginosa* adherovat k biotickým i abiotickým povrchům a významnou měrou tak přispívají k tvorbě biofilmů. Infekce dýchacího ústrojí vyvolané bakterií *P. aeruginosa* mohou být úspěšně léčeny např. aplikací roztoků obsahujících sacharidy specifické pro LecA a LecB²⁵.

Závěr

Oportunně patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* produkuje extracelulární lytické enzymy a sekundární metabolity o nízké molekulové hmotnosti, z nichž většinu označujeme jako faktory virulence, jejichž

exprese je ovlivněna autoinduktory²⁵. Faktory virulence *P. aeruginosa* (např. elastasa, alkalická proteasa, exotoxin A, rhamnolipid, pyocyanin a lektin) významně přispívají k její patogenitě neboli schopnosti vyvolat onemocnění²⁶. Popsání a pochopení mechanismů vedoucích k syntéze těchto faktorů, jakož i samotné jejich funkce během infekcí způsobovaných *P. aeruginosa*, povede k nalezení látek, které jejich tvorbu budou potlačovat více specificky. Od anti-virulentní terapie se očekává především snížení míry patogenity bakterie, která je poté snadněji odstranitelná obrannými mechanismy hostitele (především jeho imunitním systémem) a snížení selekčního tlaku, vlivem kterého dochází k šíření mutantů odolných vůči účinkům běžně používaných antimikrobiálních látek.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysok školský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017).

Literatura

1. Papenfort K, Bassler BL: *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576 (2016).
2. Lee J, Zhang L: *Protein Cell* 6, 26 (2015).
3. Lee J, Wu J, Deng Y et al.: *Nat. Chem. Biol.* 9, 339 (2013).
4. Seed PC, Passador L, Iglewski BH: *J. Bacteriol.* 177, 654 (1995).
5. Farrow JM, Sund ZM, Ellison ML, et al.: *J. Bacteriol.* 190, 7043 (2008).
6. Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH: *Infection and immunity* 61, 1180 (1993).
7. Favre-Bonté S., Köhler T, Van Delden C: *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 598 (2003).
8. Stoodley P, Boyle JD, Dodds, et al.: *Biofilms: Community Interactions and Control*. BioLine, Powys 1997.
9. Ochsner UA, Reiser J: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6424 (1995).
10. Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11229 (1999).
11. Kernacki K, Hobden J, Hazlett L, et al.: *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 36, 1371 (1995).
12. Galloway D: *Mol. Microbiol.* 5, 2315 (1991).
13. Wolz C, Hohloch K., Ocaktan A: *Infection and immunity* 62, 4021 (1994).
14. Bardoel BW, van Kessel KP, van Strijp JA: *J. Mol. Biol.* 415, 573 (2012).
15. Sahu A, Lambris JD: *Immunol. Rev.* 180, 35 (2001).
16. Wick M, Hamood A, Iglewski B: *Mol. Microbiol.* 4, 527 (1990).
17. Iglewski BH, Liu PV, Kabat D: *Infection and immunity* 15, 138 (1977).
18. Vidal DR, Garrone P, Banchereau J: *Toxicon* 31, 27 (1993).
19. Van Delden C, Iglewski BH: *Emerging Infect., DiS.* 4, 551 (1998).
20. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA: *J. Bacteriol.* 185, 1027 (2003).
21. Lang S: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7, 12 (2002).
22. Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann HS, et al.: *Am. J. Pathol.* 175, 2473 (2009).
23. Kerr J, Taylor G, Rutman A, et al.: *J. Clin. Pathol.* 52, 385 (1999).
24. O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, et al.: *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, 1077 (2003).
25. Tielker D, Hacker S, Loris R, et al.: *Microbiology* 151, 1313 (2005).
26. Gellatly SL, Hancock RE: *Pathog., DiS.* 67, 159 (2013).

Souhrn

Paldrychová M.: Faktory virulence bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa využívá hustou síť quorum sensing receptorů a regulátorů patřících do čtyř QS systémů (*las*, *rhl*, *pqs* a *iqs*), které řídí produkci faktorů virulence. Systémy jsou hierarchicky uspořádány, přičemž *las* QS systém stojí na vrcholu kaskády. Nicméně, vzhledem k nedávnému zjištění, že funkce centrálního *las* QS systému může být v podmínkách, které jsou typické pro infekci, převzata QS systémem *iqs*, je zřejmé, že použití klasických QS inhibitorů cílících na *las* QS systém může být neúčinné. Měli bychom také mít na paměti, že systémy QS vyžadují další výzkum, aby bylo zcela jasné, jak jsou propojeny a jakým způsobem společně řídí produkci faktorů virulence. Cílem článku bylo nastínit propojení QS systémů a popsat nejznámější faktory virulence (elastasa, alkalická proteasa, exotoxin A, rhamnolipid, pyocyanin a lektin) – jejich přínosy pro bakterii *P. aeruginosa* a jejich účinky na buňky hostitele během infekce. V budoucnu nám všechny tyto informace společně pomohou zajistit vývoj specificky účinných anti-OS terapeutik.

Klíčová slova: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, faktory virulence, elastasa, alkalická proteasa, exotoxin A, rhamnolipid, pyocyanin, lektin

Summary

Paldrychová M.: Virulence factors of bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, use a dense network of quorum sensing receptors and regulators, belong to the four quorum sensing systems (*las*, *rhl*, *pqs* and *iqs*), which control the virulence factors production. These systems are organized in a hierarchy with *las* system at the top of the cascade. However, due to recent discovery that functions of central *las* QS system could be overtaken by *iqs* QS system in conditions that closely mimics host infection, it becomes clear that the application of classical QS inhibitors targeting *las* QS system may be ineffective. We should also keep in mind, that there is a lot of unknown about the QS systems requiring further investigations to understand how *P. aeruginosa* QS networks are connected and how it controls the production of virulence factors together. The aim of the article was to outline the interconnection of QS systems and to describe the most well-known *P. aeruginosa* virulence factors (elastase, alkaline protease, exotoxin A, rhamnolipid, pyocyanin and lectin) – their benefits to *P. aeruginosa* and their effects to host during the infection. In the future, all this information together will help us ensure development of potent anti-QS therapeutics with specific mode of action.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, virulence factors, elastase, alkaline protease,

OBSAH

Úvod	53
Vzpomínka na paní prof. RNDr. Marii Tichou, CSc.	54
Šaradínová M.: Zpráva z konference	55
Pozvánka na konferenci	56
Blaha J., Dostál J., Pichová I.: Karbonické anhydrasy kvasinek rodu <i>Candida</i>	57
Lokočová K., Michailidu J.: Antibiofilmová aktivita cinnamaldehydu a N-acetylcysteinu	61
Michailidu J., Paldrychová M.: Quorum sensing gram pozitivních bakterií	65
Paldrychová M.: Faktory virulence bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68

CONTENTS

Editorial	53
In Memoriam: Professor RNDr. Marie Tichá, CSc.	54
Šaradínová M.: Conference report	55
Conference invitation	56
Blaha J., Dostál J., Pichová I.: Carbonic anhydrases of the genus <i>Candida</i>	57
Lokočová K., Michailidu J.: Anti-biofilm activity of cinnamaldehyde and N-acetylcysteine	61
Michailidu J., Paldrychová M.: Quorum sensing in gram-positive bacteria	65
Paldrychová M.: Virulence factors of bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68

REDAKČNÍ RADA

doc. 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)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skácel, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., 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, Albertrtov 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., Videňská 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., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
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.

Novák Z.: Diploma thesis, UCT 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).