

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Labská

SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA MIKROBIÁLNÍCH FOSFATAS
PODÍLEJÍCÍCH SE NA OPRAVÁCH CHYBNÝCH
METABOLITŮ

Substrate specificity of microbial phosphatases involved in
metabolic repair

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. května 2025

podpis

Poděkování

Zaprvé bych chtěla nesmírně poděkovat doc. RNDr. Olze Heidingsfeld CSc. za všechnu její trpělivost a podporu i v těch nejnáročnějších chvílích. Dále bych chtěla také poděkovat Ing. Knejzlíkovi PhD. za jeho pomoc a asistenci při druhé části měření. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, přátelům a ostatním členům laboratoře.

Abstrakt

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat mikrobiální fosfatasy, které se podílejí na opravách chybných metabolitů vznikajících jako vedlejší produkty buněčného metabolismu. Jako zástupci enzymů z eukaryotických mikroorganismů byly vybrány fosfatasy z patogenních kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Doménu bakterií v této práci zastupuje *Mycobacterium smegmatis*, nepatogenní bakterie používaná jako bezpečný model pro studium patogenních mykobakterií. Z *M. smegmatis* byly vybrány tři necharakterizované geny, u kterých bylo možno předpokládat, že kódují fosfatasy. Metody byly založené na měření absorbance při 405 nm u produktu vznikajícího defosforylací *para*-nitrofenylfosfátu. U kvasinkových fosfatas z druhů *C. albicans* (CaPho15p) a *C. parapsilosis* (CpPho15p) byly otestovány různé druhy látek jako potenciální inhibitory. Nejvýznamnější inhibitory CpPho15p byly thiamin, pyridoxal hydrochlorid a glukosa-6-fosfát. U těchto látek bylo dále stanoveno i IC_{50} , pomocí kterého byl thiamin určen jako nejlepší inhibitor. Žádná z testovaných látek neměla inhibiční vliv na CaPho15p. Různý vliv otestovaných látek na jednotlivé enzymy potvrzuje teorii, že mezi fosfatasy z obou kvasinek jsou podstatné rozdíly a je potřeba se více zabývat jejich substrátovou specifitou. U všech tří enzymů *M. smegmatis* bylo stanoveno pH optimum, u vybraného enzymu MSMEG_3753 byla rovněž stanovena Michaelisova konstanta pro *para*-nitrofenylfosfát a byla otestována potřeba dvojmocných iontů jako kofaktorů. Všechny parametry potvrdily předpoklad, že fosfatasy *M. smegmatis* jsou velmi podobné těm kvasinkovým. Stejně jako CaPho15p a CpPho15p preferuje MSMEG_3753 zásaditější pH, k reakci potřebuje Mg^{2+} nebo Mn^{2+} ionty a defosforyluje *para*-nitrofenylfosfát. Jediný podstatný rozdíl, kterým se odlišuje od CaPho15p a CpPho15p, je inhibiční vliv Co^{2+} iontů na reakci. Tato pilotní studie vytváří předpoklady potřebné k testování substrátové specifity fosfatas *M. smegmatis* a tedy k zjištění, jakou přesně funkci v organismu zastávají.

Klíčová slova: fosfatasa, glykolýza, 2 - fosfoglykolát, *Candida*, *Mycobacterium*

Abstract

The main goal of this thesis was to characterise microbial phosphatases involved in the repair of noncanonical metabolites formed as by-products of cellular metabolism. Phosphatases from the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* were selected as the representatives of enzymes from eukaryotic microorganisms. The bacterial domain in this work is represented by *Mycobacterium smegmatis*, a non-pathogenic bacterium used as a safe model for the study of pathogenic mycobacteria. Three uncharacterized genes were selected from *M. smegmatis*, which are assumed to encode phosphatases. The methods used were based on measuring absorbance at 405 nm of the product formed by the dephosphorylation of *para*-nitrophenylphosphate. Various compounds were tested as potential inhibitors of the phosphatases from the pathogenic yeasts *C. albicans* (CaPho15p) and *C. parapsilosis* (CpPho15p). Significant inhibitors of CpPho15p included thiamine, pyridoxal hydrochloride and glucose-6-phosphate. The IC₅₀ values were also determined for these compounds, with thiamine identified as the most effective inhibitor. None of the tested compounds inhibited CaPho15p. The different effects of the tested compounds on each of the enzymes confirm the theory that there are significant differences between them, highlighting the need for further research on their substrate specificity. The pH optima were determined for all three *M. smegmatis* enzymes. For the selected enzyme MSMEG_3735, the Michaelis constant for *para*-nitrophenylphosphate was established, and the requirement for divalent ions as cofactors was assessed. All parameters confirmed the assumption that the phosphatases of *M. smegmatis* are very similar to those of pathogenic yeast. Like CaPho15p and CpPho15p, MSMEG_3753 prefers a basic pH, requires Mg²⁺ or Mn²⁺ ions for activity, and dephosphorylates *para*-nitrophenylphosphate. The only significant difference that distinguishes it from CaPho15p and CpPho15p is the inhibitory effect of Co²⁺ ions on the reaction. This pilot study creates the prerequisites required for investigating the substrate specificity of *M. smegmatis* phosphatases and thus determining their exact function in the organism have been met.

Key words: phosphatase, glycolysis, 2 - phosphoglycolate, *Candida*, *Mycobacterium*

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Seznam zkratek | 1 |
| 1. Úvod | 2 |
| 2. Patogenní kvasinky | 3 |
| 2.1. Kandidy..... | 3 |
| 2.1.1. <i>Candida albicans</i> | 4 |
| 2.1.2. <i>Candida parapsilosis</i> | 5 |
| 2.2. Kandidémie..... | 5 |
| 3. Patogenita | 7 |
| 3.1. Adheze a invaze buňky | 7 |
| 3.2. Tvorba biofilmu | 7 |
| 3.3. Polymorfismus | 8 |
| 3.4. Sekrece hydrolas | 8 |
| 3.5. Stresová adaptace..... | 9 |
| 3.5.1. Heat shock proteiny | 9 |
| 3.5.2. Na ⁺ a K ⁺ ionty | 9 |
| 3.5.3. pH..... | 10 |
| 3.5.4. Výživa..... | 10 |
| 4. <i>Mycobacterium</i> | 12 |
| 4.1. <i>Mycobacterium smegmatis</i> | 12 |
| 5. Metabolické dráhy | 13 |
| 5.1. Glykolýza..... | 13 |
| 5.2. Vedlejší produkty..... | 13 |
| 6. Fosfatasy | 17 |
| 6.1. Superrodina HAD | 17 |
| 6.2. Kvasinkové fosfatasy z rodiny HAD | 18 |
| 7. Cíle..... | 19 |
| 8. Materiály a metody | 20 |
| 8.1. Materiály | 20 |
| 8.2. Přístroje..... | 21 |
| 8.3. Metody | 22 |
| 8.3.1. Michaelisova konstanta pro pNPP u Pho15p..... | 22 |

| | | |
|--------|--|----|
| 8.3.2. | Testování potenciálních inhibitorů u Pho15p | 22 |
| 8.3.3. | IC ₅₀ u vybraných potenciálních inhibitorů Pho15p | 23 |
| 8.3.4. | Měření pH optima enzymů <i>M. smegmatis</i> | 23 |
| 8.3.5. | Michaelisova konstanta pro pNPP u enzymu MSMEG_3753 | 23 |
| 8.3.6. | Potřeba dvojmocných iontů u enzymu MSMEG_3753 | 24 |
| 9. | Výsledky | 25 |
| 9.1. | Michaelisova konstanta pro pNPP u Pho15p | 25 |
| 9.2. | Potenciální inhibitory u Pho15p | 25 |
| 9.3. | IC ₅₀ vybraných potenciálních inhibitorů | 28 |
| 9.4. | pH optimum u enzymů <i>M. smegmatis</i> | 28 |
| 9.5. | Michaelisova konstanta pro pNPP u enzymu MSMEG_3753 | 30 |
| 9.6. | Potřeba dvoumocných iontů u enzymu MSMEG_3753 | 31 |
| 10. | Diskuse | 32 |
| 11. | Závěr | 33 |

Seznam zkratek

| | |
|-----------|---|
| ALS | sekvence podobná aglutininu |
| AMP | adenosinmonofosfát |
| CA | <i>Candida albicans</i> |
| CP | <i>Candida parapsilosis</i> |
| CaPho15p | <i>PHO15</i> fosfatasa <i>C. albicans</i> |
| CpPho15p | <i>PHO15</i> fosfatasa <i>C. parapsilosis</i> |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| GAPDH | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa |
| HAD | haloacid dehalogenase-like hydrolasy |
| HSP | proteiny teplotního šoku |
| k_{cat} | číslo přeměny |
| K_m | Michaelisova konstanta |
| MSMEG | <i>Mycobacterium smegmatis</i> |
| pNPP | <i>para</i> -nitrofenylfosfát |
| Saps | sekretované aspartátové proteasy |
| V_{max} | maximální rychlost reakce |

1. Úvod

V posledních letech dochází k čím dál více objevům, které nasvědčují tomu, že metabolické dráhy nejsou bezchybné a často v nich dochází k tvorbě vedlejších produktů^{1,2}. Akumulace těchto látek může být pro buňku toxická, jelikož jsou často při vyšších koncentracích schopné inhibovat jiné enzymy a tím ovlivňovat a narušovat chod celého organismu. Je tedy potřeba, aby v buňce byl nějaký obranný mechanismus, který bude tyto toxické látky eliminovat. V lidském těle tuto funkci zastávají tzv. enzymy metabolických oprav. Jedním z takových enzymů je fosfoglykolát fosfatasa, která se řadí do superrodiny haloacid dehalogenas (HAD). Do stejné skupiny enzymů patří také opravná fosfatasa kódovaná genem *PHO13* u modelové kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*³. Na základě homologie byly popsány geny *PHO15* u patogenních kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*⁴. Kvasinkové infekce představují celosvětový problém a v posledních dekádách prudce vzrostl jejich výskyt⁵. Podobnou hrozbu představují také bakteriální infekce, a to zejména v době narůstajícího výskytu bakterií rezistentních na stávající antibiotika. Jejich studium navíc přináší řadu komplikací souvisejících s vysokými nároky na bezpečnost při práci s nebezpečnými patogeny. Jedním z řešení je využít příbuzný nepatogenní organismus, s jehož pomocí lze charakterizovat alespoň některé geny, proteiny či fyziologické pochody. Takto se například často používá nepatogenní *Mycobacterium smegmatis*, které má mnoho ortologních genů s vysoce patogenní *Mycobacterium tuberculosis*⁶. První část praktické části je zaměřená na fosfatasy kódované geny *PHO15* u kandid, především na testování jejich potenciálních inhibitorů. Tyto fosfatasy jsou orthology opravné fosfatasy Pho13p ze *S. cerevisiae*. Druhou část tvoří enzymy *Mycobacterium smegmatis*, u kterých se předpokládá, že se jedná o podobné fosfatasy a že se také podílejí na metabolických opravách. Výzkum byl zaměřen především na jejich charakterizaci a porovnání s fosfatasy Pho15p kandid.

2. Patogenní kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní jednobuněčné mikroorganismy řadící se mezi houby. Dohromady nevytváří taxonomickou skupinu a mezi jednotlivými rody jsou značné rozdíly. Typický je pro ně ale nepohlavní způsob dělení buněk zvaný pučení. Kvasinky můžeme izolovat z různých prostředí, jak z půdy a rostlin, tak z některých organismů, které jsou schopné kolonizovat. U zdravých jedinců se vyskytují především na kůži a v gastrointestinálním a urogenitálním traktu jako součást mikrobiomu. Některé kvasinky jsou hojně využívány průmyslově, například při výrobě alkoholických nápojů nebo v pekařství. Kvasinky mohou ale být i původci různých onemocnění, a v tom případě je označujeme jako patogenní. Obvykle se jedná o oportunní patogeny, způsobují tedy infekci pouze při snížené obranyschopnosti hostitele. Největší riziko představují pro jedince s onemocněními snižujícími imunitu, jako je například AIDS, a pro pacienty po transplantaci nebo chemoterapeutické léčbě. Další faktory zvyšující riziko infekce jsou stres, špatné životní podmínky či léčba imunosupresivními látkami^{4,7}.

2.1. Kandidy

Fungální infekce v lidském těle jsou nejčastěji způsobeny kvasinkami patřícími do rodu *Candida*. Většina kandid patří do větve CUG (také nazývána CTG). V genetickém kódu je kodón CUG standardně překládán jako leucin. U kandid dochází ale ve 97 % případů k překladu na serin. Tento jev jde proti teorii, že genetický kód je univerzální pro všechny organismy. Ne všechny kandidy se ale řadí k této evoluční větvi. *Candida glabrata* (která se v posledních letech začala označovat jako *Nakaseomyces glabratus*) je více příbuzná se *Saccharomyces cerevisiae*, která patří do WGD větve (whole-genome duplication). Na rozdíl od ostatních kandid u ní tedy došlo ke zdvojení celého genomu. Další výjimkou je *Candida krusei*, která se také nazývá *Pichia kudriavzevii*⁷. Infekce způsobené kvasinkami rodu kandida jsou obvykle pouze povrchové a dochází k nim hlavně v urogenitálním traktu a dutině ústní. Kandidy jsou ale schopné přežít i v krevním řečišti a mohou způsobit vážná onemocnění tkání a poškodit orgány. K největšímu poškození dochází v ledvinách, játrech, slezině a mozku. Při systémových infekcích způsobených kvasinkou *C. albicans* činí mortalita přibližně 40 %⁵. Náročná diagnóza systémových kvasinkových infekcí a následná

opožděná léčba jsou hlavními příčinami této vysoké úmrtnosti, ačkoliv existuje mnoho antifungálních léčiv. Mezi ta patří především azoly, polyeny a echinokandiny.

2.1.1. *Candida albicans*

Nejhojněji zastoupenou kandidou a nejčastějším původcem fungálních infekcí je *Candida albicans*. Za normálních podmínek se jedná o komenzální mikroorganismus, tedy žije s hostitelem v harmonii a neovlivňuje ho. Pokud dojde k výraznému poklesu imunity jedince nebo změně podmínek, které naruší rovnováhu, přejde z komenzálního způsobu života na patogenní. Stejně jako modelové kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* patří taxonomicky mezi kmen Ascomycota (vřeckovýtrusné). Pro Ascomycoty je typické uspořádání haploidních pohlavních spor (ascospor) do vřecek po osmi. U *C. albicans* ale nebyl tento způsob rozmnožování pozorován. Naopak se vyznačuje svým specifickým rozmnožovacím cyklem, díky kterému je schopná měnit svou morfologii a přežít tak stresové podmínky. Je to diploidní polymorfní kvasinka, která je schopná tvořit hyfy, pseudohyfy, chlamydospory a blastospory^{7,8}. Dlouhou dobu se předpokládalo, že *C. albicans* není schopná pohlavního rozmnožování. Tato teorie byla vyvrácena a byl u ní pozorován parasexuální cyklus, který se ale v mnoha ohledech liší od cyklu modelových kvasinek. Prvním velkým rozdílem je samotná ploidie a párovací typy. Modelová kvasinka *S. cerevisiae* je haploidní a má pouze dva párovací typy, kódované MAT lokusem – **a** a α . Kdežto *C. albicans* je diploidní a má párovací typy tři, kódované MTL lokusem – **a/a**, **a/ α** , α/α . Cyklus je z velké části regulován white-opaque fenotypovým přepínáním, což je další morfologická schopnost, kterou se *C. albicans* vyznačuje. V jejích koloniích se mohou vyskytovat dva odlišné typy buněk – malé, bílé a kulaté (white forma) nebo velké, šedé a protáhlé (opaque forma). Schopnost pohlavně se rozmnožovat mají ale pouze opaque buňky. Dále se také nemohou pohlavně rozmnožovat párovací typy **a/ α** . Aby tedy mohlo dojít k pohlavnímu rozmnožování, musí nejprve buňka přejít z white formy na opaque, případně se stát homozygotem s párovacím typem **a/a** nebo α/α . Po zkrřížení vzniká tetraploidní buňka, která se ztrátou chromozomů stává opět diploidní⁹. Absence meiózy, která se odehrává u většiny eukaryot, je pravděpodobně největší zvláštností tohoto rozmnožovacího cyklu.

2.1.2. *Candida parapsilosis*

Další významnou kvasinkou z rodu *Candida* je *C. parapsilosis*. Vyznačuje se svou schopností přežívat v různých prostředích a není tedy tak vázaná na člověka jako *C. albicans* a další kandidy. Je možné ji izolovat i z domácích zvířat, hmyzu, půdy a z mořského prostředí¹⁰. Na rozdíl od *C. albicans* je dimorfní, tedy tvoří pouze dvě morfologická stádia – pseudohyfy a blastospory. Její tvorba pseudohyf je vázaná především na aminokyselinu citrullin, což podstatně ovlivňuje nejen její buněčnou stavbu, ale i formu kolonií. Není schopná vytvářet pravé hyfy, které se u patogenních kvasinek výrazně podílejí na jejich patogenitě. Nicméně i tato kvasinka má na svědomí velkou část infekcí po celém světě. To je zapříčiněno především tím, že dobře roste v parenterální výživě a ochotně tvoří biofilmy na katetrech a dalším zdravotním náčiní. Největší riziko představuje pro novorozence s nízkou porodní váhou, kteří ještě nemají plně vyvinutý zdravý mikrobiom. Další rizikovou skupinou jsou pacienti, kteří potřebují již zmíněné katetry nebo jiná implantovaná zařízení. Oproti ostatním kandidám má zvýšenou rezistenci vůči echinokandinům. Echinokandiny jsou skupina antimykotik fungující na principu blokády syntézy buněčné stěny inhibicí (1,3)- β -D-glukansynthasy. Patří mezi ně například caspofungin, micafungin a anidulafungin. Tato zvýšená rezistence by mohla být zapříčiněna rozdílnou strukturou buněčné stěny nebo regulačními mechanismy^{7,10}. Počet případů infekcí způsobených *C. parapsilosis* prudce stoupl v posledních dvou dekadách a předpokládá se, že poroste dále⁵. Na vině jsou právě tyto odlišnosti a specifčnosti, které ztěžují diagnózu a následnou léčbu.

2.2. Kandidémie

Od 90. let dochází k prudkému nárůstu onemocnění způsobenými kvasinkami rodu *Candida*. V minulosti se infekce zapříčiněné těmito kvasinkami týkaly především starších pacientů, s evolucí dalších druhů kandid došlo i k rozšíření infekcí mezi prakticky všechny věkové kategorie. Jako hlavní příčina se udávají pokroky ve zdravotnictví, například rozšíření antifungálních léčiv, čímž si tyto mikroorganismy vypěstovaly rezistenci. Kandidózy se nejčastěji šíří v nemocnicích přenosem z pacienta na pacienta skrz zdravotnický personál nebo skrz nedostatečně ošetřené náčiní. Více než 90 % případů je zapříčiněno pouze 5 kandidami, a to *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, a *C. krusei*. Nejvíce

infekcí způsobuje *C. albicans*, která je ale také celosvětově nejrozšířenější kandidou. Počet infekcí způsobenými zbylými kandidami záleží na lokalitě a demografickém složení. Například v Severní Evropě a USA způsobuje nejvíce infekcí *C. glabrata*, kdežto ve Španělsku a Brazílii je to zapříčiněno *C. parapsilosis*⁵. Nárůst infekcí těmito dvěma kandidami je způsoben především jejich zvýšenou resistencí vůči určitým antimykotikům. *C. glabrata* je méně náchylná k flukonazolu, což je jedno z nejčastěji používaných antifungálních léčiv patřící mezi azoly⁷. Výše popsaná *C. parapsilosis* je naopak odolnější vůči echinokandinům^{7,10}. Během pandemie covidu-19 byl zaznamenán náhlý vzestup případů infekce kandidami. Při onemocnění covidem-19 dochází k narušení vrstvy sliznice, což usnadňuje kvasinkám proniknutí do krevního řečiště. Pacienti s horším průběhem jsou tak vystaveni zvýšenému riziku kandidózy¹¹.

3. Patogenita

Schopnost patogenních kvasinek infikovat hostitele a množit se v něm je podmíněna mnoha virulenními faktory, kterými se kvasinky vyznačují. Spousta těchto faktorů pomáhá kvasinkám i přežít a adaptovat se na stresové podmínky okolního prostředí. V těle hostitele se kvasinky dostávají do kontaktu s různorodým prostředím, které je proměnlivé a nestálé. Mezi významné virulenní faktory patří například adheziny zprostředkávající přichycení k buňce nebo hydrolasy napomáhající proniknutí¹²⁻¹⁴. Dalším důležitým faktorem, kterým se vyznačuje hlavně *C. albicans*, je morfogeneze – tedy schopnost přecházet mezi různými formami⁸. Určitá stádia jsou více invazivní a zvyšují tak patogenitu. Kolonizaci buňky a přenos na další hostitele napomáhá naopak tvorba biofilmu, ve které vyniká *C. parapsilosis*^{10,15}. V rámci patogenity budou probrány i stresové adaptační mechanismy, které pomáhají kvasinkám přežít tato různorodá prostředí hostitelů a umožňují jejich osídlení.

3.1. Adheze a invaze buňky

Aby mohla kvasinka kolonizovat a infikovat hostitele, musí nejprve dojít k přichycení a následně proniknutí do hostitelských buněk. Patogenní kvasinky mají specializovanou sadu proteinů zvaných adheziny, které umožňují přilnutí (adhezi) k dalším kvasinkovým buňkám, ale i k hostitelským buňkám a abiotickým povrchům. Nejlépe prozkoumaná rodina adhezínů jsou agglutinin-like sequence (ALS) proteiny, do které patří 8 genů (Als1 – 7; Als 9). Als3 funguje navíc jako invazin a napomáhá proniknutí do buňky. Mezi další významné adheziny patří například Hwp1, který se společně s Als3 podílí i na tvorbě biofilmu. Po přilnutí k povrchu dojde k morfologické změně a místo kvasinkové formy začnou růst hyfy. Kontakt s pevným povrchem může také spustit tvorbu biofilmu^{12,14}.

3.2. Tvorba biofilmu

Podobně jako ostatní mikroorganismy, i patogenní kvasinky jsou schopny tvořit biofilm. Biofilm je složitá 3D struktura tvořena nahromaděnými koloniemi buněk zasazených do extracelulární polysacharidové matrix. Pro mikroorganismy tak vytváří stabilní prostředí umožňující přežít nepříznivé podmínky. Biofilm je tvořen v několika stádiích počínající ireverzibilní adhezí a nahromaděním kvasinkových buněk na povrchu. Dále dochází k dělení

buněk a tvorbě hyf. Následná akumulace extracelulární polysacharidové matrix dodává struktuře svou stabilitu a odolnost. Složení matrix je pro každý mikroorganismus unikátní a je podmíněno vnějšími podmínkami, především dostupnými materiály. U kandid obecně tvoří hlavní složky α -mannan, β -1,6-glukan a β -1,3-glukan. Za nejvýznamnější je považován β -1,3-glukan, jelikož se nejvíce podílí na rezistenci biofilmů k antimykotikům. Na konci procesu jsou do okolí vypuštěny volné kvasinkové buňky, které mohou kolonizovat další povrchy. Disperze těchto buněk umožňuje kvasinkám se rychle šířit tkáněmi a způsobovat infekce. Vyvinuté biofilmy jsou odolnější antimikrobiálními látkami a imunitním faktorům hostitele než samotné kvasinkové buňky^{10,12–14}.

3.3. Polymorfismus

Jedna z hlavních vlastností *C. albicans* podílející se na její patogenitě je schopnost měnit svou morfologii a reverzibilně přecházet mezi různými životními stádii. Kvasinkové formy napomáhají diseminaci a rozšíření kvasinky, naopak vláknité formy jsou vhodné k penetraci a vstupu do hostitelské buňky. Vláknité formy tvořící hyfy jsou více invazivní než kvasinkové formy, jelikož jsou schopné napadnout a poškodit epitelové i endotelové buňky. Zmutované buňky, které ztratily schopnost vytvářet hyfy, mají obvykle sníženou virulenci. Za vhodných podmínek mohou hyfy růst i uvnitř fagocytujících buněk a prorazit jejich stěnu, což opět přispívá k rozšíření buněk v hostiteli. Morfogeneze je z části regulována schopností quorum sensing, což je regulační systém odpovídající na hustotu populace⁸. Látky, které tuto roli v *C. albicans* zastávají, jsou například farnesol, tyrosol a dodecanol. Při vyšší hustotě buněk ($> 10^7$ buněk/ml) je podpořen růst kvasinkové formy, kdežto při nižší hustotě ($< 10^7$ buněk/ml) je preferován růst hyf¹². Morfologie je také dána vnějšími podmínkami, při nižším pH (< 6) převládá kvasinková forma, s rostoucím pH začíná růst hyf. Další faktory ovlivňující morfologii jsou například koncentrace oxidu uhličitého nebo N-acetylglukosaminu a teplota⁸.

3.4. Sekrece hydrolas

Kandidy mohou sekretovat hydrolasy, které napomáhají proniknutí do buňky. Mezi tyto hydrolasy obvykle patří proteasy, fosfolipasy a lipasy. Významnou skupinou hydrolas jsou aspartátové proteasy zvané Sap (Secreted aspartyl protease). U *C. albicans* se skupina skládá z deseti členů Sap1-10. Sap1 až Sap8 jsou sekretovány do okolí, kdežto Sap9 a Sap10 zůstávají na povrchu buněk. Degradováním strukturních a imunologických proteinů, jako

jsou například kolagen, fibronektin a řetězce obsahující imunoglobulin G, usnadňují vstup do hostitelské buňky a její kolonizaci. V posledních letech jsou Saps čím dál více zkoumány, především jejich inhibitory, které by mohli fungovat jakožto antimykotika^{12,14}.

3.5. Stresová adaptace

Mnoho stresových signálních drah popsanych už u modelových kvasinek *S. cerevisiae* a *S. pombe* bylo evolučně konzervováno i u kandid. Mezi ty patří například MAP kinasový signální systém nebo proteiny teplotního šoku (HSP). U některých z nich ale došlo k vychýlení od standardní funkce a částečně se tak podílí patogenitě. K tomuto odchýlení došlo pravděpodobně za cílem lepší adaptace na různé hostitele a k získání evoluční výhody. Některé geny jsou exprimovány až po kontaktu s hostitelskou buňkou. Například heat shock proteiny a geny zprostředkovávající odpověď na oxidativní a nitrosativní stres jsou exprimovány až po fagocytaci kvasinkové buňky makrofágy či neutrofily¹³.

3.5.1. Heat shock proteiny

Proteiny teplotního šoku (heat shock proteins – HSP) jsou skupina specializovaných proteinů vyskytující se u prokaryot i eukaryot, včetně člověka. Zajišťují odpověď a adaptaci buňky na stresové podmínky jako jsou například zvýšená teplota, hladovění nebo oxidativní stres. Tyto faktory mohou vést k degradaci proteinů a být tak pro buňku letální. Heat shock proteiny pomáhající se sbalením jiných proteinů se označují jako chaperony. U kandid bylo identifikováno 6 hlavních heat shock proteinů – Hsp104, Hsp90, Hsp78, Hsp60 a dva Hsp70 (označující se jako Ssa1 a Ssa2). Nejvýznamnější z nich je pravděpodobně Hsp90, který se podílí na rezistenci vůči léčivům, morfogenezi a tvorbě biofilmu, což jsou důležité virulenní faktory ovlivňující patogenitu kvasinek. Hlavní regulátor této stresové odpovědi je heat shock factor 1 (Hsf1), stejně jako u lidí. Hsf1 je esenciální jak pro přežití, tak pro míru virulence kvasinky^{12,13}.

3.5.2. Na⁺ a K⁺ ionty

Buňka se přirozeně snaží udržovat si izotonické prostředí, což je stav, při kterém je uvnitř i vně buňky stejná koncentrace látek a osmotické tlaky jsou vyrovnané. Při vystavení buňky roztokům NaCl nebo KCl dochází k porušení této rovnováhy a vzestupu osmotického a kationového tlaku. Aby se systém znovu dostal do rovnováhy, musí buňka odevzdat vodu

a snížit tak koncentraci těchto osmoticky aktivních látek. Tím dojde ke zmenšení buňky a prudkému poklesu turgoru, což je tlak vody působící na buněčnou stěnu zajišťující pevnost buňky. Tomuto ději se říká plazmolýza a v extrémních případech může být i fatální. Kandidy mohou být těmito kationtům vystaveny v určitých hostitelích. V ledvinách dosahují koncentrace Na^+ až 600 mmol/l, s K^+ se zase mohou setkat při fagocytóze leukocyty. K přežití jim napomáhá protein Hog1, který je při vysokém osmotickém stresu fosforylován. Následně aktivuje geny potřebné k opětovnému nastolení rovnováhy, především enzymy syntetizující glycerol. Tím se vyrovná turgor a buňka může znovu růst^{16,17}. Při inaktivaci Hog1 dochází i k oslabení virulence, což se ale ukázalo, že není zapříčiněno ztrátou adaptace na osmotický stres. Kromě toho, že Hog1 je potřebný při dalších stresových drahách, podílí se významně i na morfogenezi, regulaci metabolismu a ovlivňuje funkčnost buněčné stěny¹³.

3.5.3. pH

V lidském těle jsou kvasinky vystaveny různým hodnotám pH, od bazické až po kyselé. Například krevní řečiště je slabě zásadité (pH = 7,4), kdežto prostředí trávicího traktu je naopak kyselé (pH = 2). K přežití musí tedy být kvasinka schopná se adaptovat na jeho změny a případně ho sama umět pozměnit. Mezi nejdůležitější proteiny pomáhající této adaptaci patří Phr1 a Phr2. Oba proteiny patří mezi β -glykosidasy buněčné stěny. Phr1 je aktivní při neutrálním až zásaditém pH a podílí se především na systémových infekcích. Phr2 je naopak využíván při kyselém pH a má významnou funkci při infekcích urogenitálního traktu. Kandidy jsou do určité míry také schopné pozměnit okolní pH. Konkrétně jsou například schopné ho alkalizovat, čímž se zároveň podpoří růst *hyf*¹³.

3.5.4. Výživa

Patogenní kvasinky infikující různé organismy musí být metabolicky flexibilní a umět se adaptovat na různé zdroje živin v závislosti na druhu hostitele. Jak již bylo zmíněno výše, kandidy se obvykle vyskytují v gastrointestinálním traktu jakožto součást mikrobiomu. Problém nastává, pokud dojde k poklesu imunity jedince a kandida se dostane do krve. Krevní řečiště je poměrně bohaté na glukosu, jeden z nejvýznamnějších zdrojů energie pro většinu organismů. Vytváří tak ideální prostředí pro růst a šíření kvasinkových buněk. Skrz krevní řečiště se patogen také může dostat k různým orgánům a způsobovat systémové infekce. Výběr orgánů k napadení je výrazně ovlivněn živinami, které obsahují. Například

v játrech má kvasinka přístup k hlavnímu zásobnímu zdroji glukosy – glykogenu. Při systémových infekcích jsou tak játra jeden z nejvíce napadaných orgánů¹³. Dalším často napadaným orgánem je mozek, který kromě vysoké koncentrace glukosy obsahuje také mnoho vitaminů, které mohou sloužit jako potenciální výživa pro kvasinky. V ostatních tkáních jsou hladiny glukosy poměrně nižší a kvasinky tak musí využívat jiné látky jakožto zdroj energie. Předpokládá se, že v těle makrofágů slouží jako hlavní zdroj energie lipidy a aminokyseliny¹².

4. *Mycobacterium*

Mycobacterium je významný bakteriální rod zahrnující jak patogenní, tak saprofytní druhy. Předpona „myko“ pochází z Řeckého slova pro houby a odkazuje na jejich kolonie připomínající plísně. Hlavní předností je jejich buněčná stěna, která je bohatá na vosky a lipidy. Ty zvyšují odolnost a fungují jakožto hydrofobní vrstva. Důležitou složkou jsou mykolové kyseliny, které jsou kovalentně navázány na polysacharidové pouzdro buněčné stěny, což dále zvyšuje její pevnost. Na mykolových kyselinách jsou dále navázány volné lipidy, které je možné odštěpit. Konformace mykolových kyselin a vázání volných lipidů je podmíněno teplotou, buněčná stěna je tedy poměrně dynamická a ne rigidní, jak by se předpokládalo. U patogenních druhů se tato neobvyklá buněčná stěna významně podílí na jejich patogenitě a rezistenci k antibakteriální léčbě. Dále také hraje velkou roli při tvorbě biofilmu a buněčném dělení. Díky vysokému podílu mykolových kyselin, které tvoří až 30% suché hmotnosti, jsou mykobakterie poměrně acidorezistentní¹⁸. Nejvýznamnější a nejznámějším zástupcem je patogenní druh *M. tuberculosis*, který způsobuje závažné onemocnění tuberkulózu. Podle svého objevitele, Roberta Kocha, se mu také říká Bacil Kochův. Ačkoliv máme dnes přístup k mnoha antibiotikům a léčbám, tuberkulóza stále představuje celosvětovou hrozbu. Každý rok na tuto infekční chorobu zemře přes milion lidí, především v rozvojových zemích. Bakterii je poměrně náročné a rizikové zkoumat, vzhledem k jejímu vysokému BSL (BioSafety Level) o hodnotě 3^{18,19}. Dalším patogenním zástupcem je například *M. leprae*, který je původcem lepry.

4.1. *Mycobacterium smegmatis*

Mezi nepatogenní zástupce využívající se v laboratořích a výzkumu patří *M. smegmatis*. Tato bakterie preferuje saprofytický styl života, tedy hlavním zdrojem organického uhlíku jsou pro ni odumřelé organismy nebo jejich části. Běžně se vyskytuje v půdě, vodě a rostlinách. V savcích za normálních okolností nepřebývá a obecně nezpůsobuje infekce. Stejně jako *M. tuberculosis* patří mezi aerobní mikroorganismy, tedy k přežití potřebuje přístup kyslíku. V genomu *M. smegmatis* bylo nalezeno mnoho ortologů genů *M. tuberculosis*. Právě díky těmto podobnostem je často v laboratořích využívána jako modelová bakterie pro studium svých patogenních protějšků. Velkou výhodou je její krátký generační čas, který trvá pouze 3-4 hodiny, oproti dlouhému 20-24hodinovému cyklu *M. tuberculosis*^{6,19,20}.

5. Metabolické dráhy

Látky přijaté organismem musí být nějakým způsobem zpracovány, aby z nich mohla vzniknout energie nebo jiné esenciální látky. K tomu slouží metabolické dráhy, které skrz sérii enzymaticky regulovaných reakcí buďto látky rozkládají (katabolismus) nebo naopak syntetizují (anabolismus). Výše bylo zmíněno, že důležitým zdrojem energie pro většinu organismů je glukosa, která je nejčastěji zpracovávána skrz glykolýzu.

5.1. Glykolýza

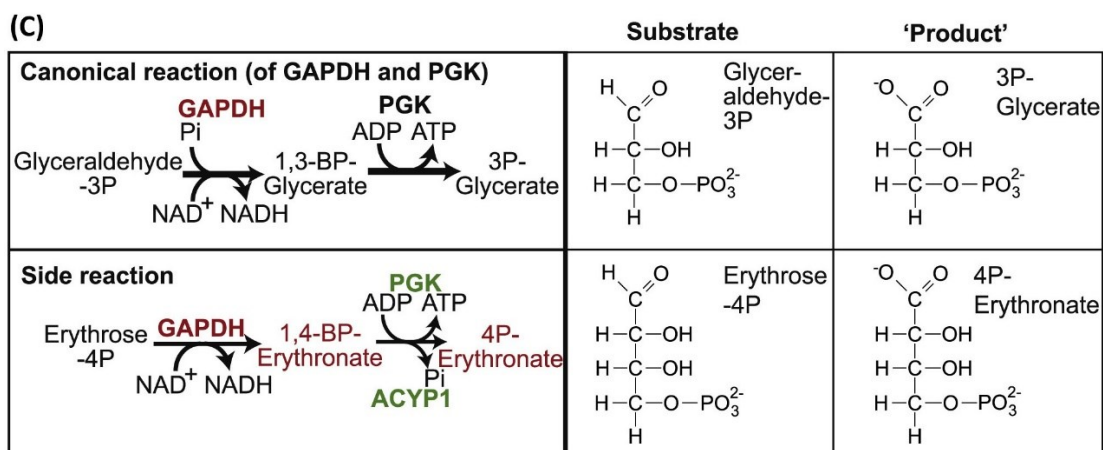
Glykolýza je katabolická dráha, při které je metabolizována glukosa na pyruvát, který je dále v Krebsově cyklu degradován až na oxid uhličitý. Během celého procesu vznikají molekuly ATP, které jsou nezbytné pro většinu procesů v organismu. Některé kvasinky jsou schopné alkoholového kvašení a při glykolýze tak produkují ethanol. Toho se průmyslově využívá především v pekařské, pивní a vinné produkci. Tato schopnost také dala *S. cerevisiae* svou přezdívku „kvasinka pивní“. Dlouhou dobu byla glykolýza považována jako jedna z nejlépe prozkoumaných metabolických drah. Bylo ale zjištěno, že v ní dochází k mnoha chybám a ke vzniku vedlejších produktů, které mohou být pro lidské tělo spíš toxické než nápomocné^{1,21}.

5.2. Vedlejší produkty

Enzymy nejsou 100% specifické a při metabolických dějích dochází i k chybné tvorbě vedlejších produktů. To je zapříčiněno například částečnou aktivitou enzymů na substrátech s podobnou stavbou jako jejich fyziologicky ideální substrát. Tomuto jevu se říká substrátová promiskuita. Naopak katalytická promiskuita označuje děj, při kterém enzymy katalyzují nesprávnou reakci na svém fyziologickém substrátu². Ačkoliv má v prvním ději enzym výrazně nižší afinitu k substrátu a u obou dějů je tvorba vedlejších produktů podstatně nižší, může docházet k akumulaci chybných produktů. Vznikající vedlejší produkty mohou mít toxický účinek na normální funkce metabolismu, jelikož inhibují činnost jiných enzymů¹. Proteiny jsou do určité míry flexibilní a mohou se tak přizpůsobit podobným substrátům, které se například liší přítomností hydroxylové nebo methylové skupiny².

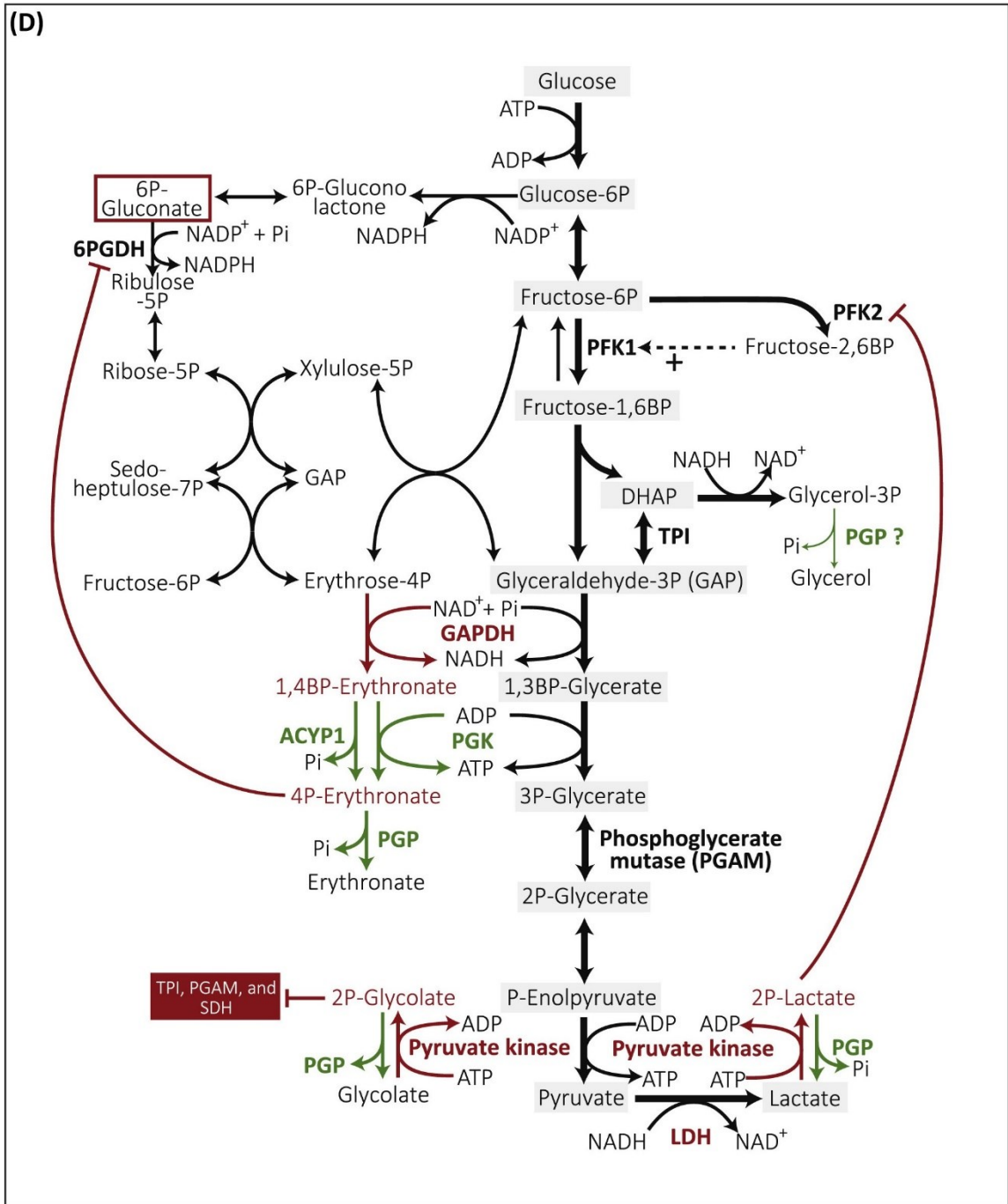
Mezi toxické vedlejší produkty vznikající při glykolýze patří především 4-fosfoerytronát, 2-fosfo-L-laktát a 2-fosfoglykolát. Na začátku glykolýzy vzniká 4-fosfoerytronát jako

vedlejší produkt glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (GAPDH), která katalyzuje přeměnu glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát. Meziprodukt pentosa fosfátového cyklu erythrosa-4-fosfát je strukturně podobný glyceraldehyd-3-fosfátu, a není tedy překvapivé, že GAPDH na něj částečně působí. V nadbytku inhibuje enzym pentosa fosfátového cyklu 6-fosfoglukonát dehydrogenasu. Ta katalyzuje 2. reakci cyklu a to přeměnu 6-fosfoglukonátu na ribulosu-5-fosfát za současného vzniku NADPH. NADPH je významný koenzym potřebný pro anabolické dráhy.



Obrázek 1: Porovnání hlavní a vedlejší reakce GAPDH, struktury obou substrátů a produktů²

Naopak 2-fosfo-L-laktát vzniká na konci glykolýzy jakožto vedlejší produkt pyruvát kinasy. Inhibuje fosfofruktokinazu-2, enzym katalyzující vznik fruktosa-2,6-bisfosfátu, což je důležitý regulátor glykolýzy. Pyruvát kinasou může vzniknout i další vedlejší produkt: 2-fosfoglykolát. Ten vzniká z glykolátu a jeho akumulace má rovnou několik následků. Zaprvé inhibuje sukcinát dehydrogenasu, významný enzymový komplex účastnící se jak Krebsova cyklu, tak oxidativní fosforylace v dýchacím řetězci. Zároveň inhibuje funkci fosfoglycerát mutasy, která katalyzuje přeměnu 3-fosfoglycerátu na 2-fosfoglycerát. Jak GAPDH, tak pyruvát kinasa jsou v organismech hojně zastoupeny, což zvyšuje šanci tvorby toxických vedlejších produktů, a tedy i potřebu nápravného enzymu^{1,2,21}.



Trends in Biochemical Sciences

Obrázek 2: Schéma metabolismu glukosy i s vedlejšími reakcemi, inhibice enzymů vzniklémi toxickými produkty²

Všechny tři produkty jsou u savců odstraňovány enzymem fosfoglykolát fosfatasa. V posledních dvou dekadách bylo objeveno více než 15 enzymů, jejichž hlavní role v lidském těle je právě odstraňování nebo přeměňování těchto toxických vedlejších

produktů². Schopnost metabolické opravy fosfoglykolát fosfatasy je evolučně konzervována i u dalších organismů, například u kvasinky *S. cerevisiae*, u které tuto obrannou funkci kóduje *PHO13*. Stejně jako fosfoglykolát fosfatasa eliminuje 2-fosfoglykolát a 4-fosfoerytronát. Jelikož *S. cerevisiae* není schopná štěpit L-laktát, nedochází u ní k akumulaci zmiňovaného 2-fosfo-L-laktátu¹.

6. Fosfatasy

Jednou z nejvýznamnějších skupin enzymů esenciálních pro správné fungování organismu jsou fosfatasy. Vyskytují se jak u prokaryot, tak eukaryot. Systematicky se řadí mezi hydrolasy, jelikož katalyzují hydrolytické štěpení substrátu. Odštěpenou látkou ze substrátu je fosfát. Jako substrát mohou fungovat různé látky, od nízkomolekulárních látek po složitější proteiny. Obecně se ale jedná o monoester kyseliny trihydrogenfosforečné. Dohromady s kinasami, které fungují opačně a přenášejí fosfátovou skupinu na substrát, vytváří regulační systém. Podle oblasti pH, ve které mají své optimum, je můžeme rozdělit na alkalické a kyselé^{22,23}. Dále je můžeme rozdělit podle typických znaků a transferasového mechanismu. Jednou z takových skupin, mezi kterou patří mnoho fosfatas, je superrodina HAD.

6.1. Superrodina HAD

Haloacid dehalogenase-like hydrolasy jsou jedna z největších superrodin enzymů zahrnující především fosfohydrolasy přítomné ve všech organismech. Superrodina byla pojmenována po haloacid dehalogenasach, které jsou přítomné především u prokaryot, nicméně většina enzymů z této superrodiny katalyzuje přenos fosforylové skupiny. Nejvíce zastoupené jsou zde fosfatasy (fosfát monoester hydrolasy ~79 %) a ATPasy (fosfoanhydrid hydrolasy ~20 %). HAD-like fosfatasy mohou mít v organismech rozmanité funkce, od metabolických a regulačních až po skládání proteinů. Strukturně se jedná o velmi rozmanitou skupinu, nicméně existují určité rysy, které mají společné. Typickými znaky jsou dva aspartátové zbytky (DxD motiv) oddělené jednou další aminokyselinou a koordinující Mg^{2+} ion. HAD enzymy se dále obvykle skládají ze 4 konzervovaných motivů tvořících aktivní místa. N-terminální motiv I se skládá z výše zmíněných Asp zbytků. Motiv II tvoří dlouhý řetězec hydrofobních aminokyselin zakončený Ser/Thr, jejichž hlavní role je tvorba vodíkového můstku s fosforylovou skupinou substrátu. Na rozdíl od prvních dvou není motiv III tak dobře konzervovaný, nicméně klíčovou vlastností je zbytek Lys, který pomáhá stabilizovat meziproduct reakce. Nakonec, motiv IV poskytuje další 2 Asp nebo Asp a Glu zbytky, které se podílejí na koordinaci Mg^{2+} iontu^{4,3,24}. Typický pro ně je i jejich aspartylfosfát transferasový mechanismus, který se uskutečňuje ve dvou krocích. V prvním kroku jeden z Asp zbytků nukleofilně atakuje fosforylovou skupinu substrátu a vytváří tak aspartylfosfát

jako meziprodukt. Druhý Asp deprotonuje molekulu vody, která ve druhém kroku nukleofilním atakem uvolňuje fosfát a regeneruje první aspartát. Hořčnatý kation zajišťuje správnou konformaci substrátu a stabilizuje přechodný stav. Aspartát funguje jak jako dobrý nukleofil, tak jako dobře odstupující skupina. Navíc reaguje při nízkém i vysokém pH, což poskytuje těmto enzymům značnou výhodu. Oproti enzymům z jiných superrodin, jako jsou například alkalické fosfatasy, mají sníženou citlivost vůči běžným inhibitorům fosfat²⁴.

6.2. Kvasinkové fosfatasy z rodiny HAD

U modelové kvasinky *S. cerevisiae* je hlavní opravná fosfatasa kódována genem *PHO13*. Na základě homologie byly popsány geny *PHO15* u kandid (specificky u *C. albicans* a *C. parapsilosis*), které také kódují 4-nitrofenyl fosfatasu. Původně se předpokládalo, že se u všech tří kvasinek jedná o alkalické fosfatasy. Mechanismus alkalických fosfat obvykle zahrnuje zbytek serinu nebo threoninu fungující jako nukleofil. Ukázalo se ale, že svým mechanismem a fungováním se podobají spíše fosfatasam patřícím do HAD superrodiny. Všechny hydrolyzují 4-nitrofenyl fosfát při slabě zásaditém pH a potřebují dikationty (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) jako kofaktory. U fosfatas z obou kandid je preferovaný substrát 2-fosfoglykolát. Ve studii⁴ testující i další substráty, fosfatasa *C. albicans* preferovala glyceraldehydfosfát a β -glycerol fosfát, zatímco fosfatasa *C. parapsilosis* preferovala především 1,3-dihydroxyaceton.

7. Cíle

1. Otestovat vybrané látky coby možné inhibitory kvasinkových fosfatas CaPho15p a CpPho15p.
2. Charakterizovat fosfatasy z *M. smegmatis*, které vykazují sekvenční homologii s fosfatasami z rodiny HAD.

8. Materiály a metody

8.1. Materiály

Dimethylsulfoxid (dále jen DMSO)

Hydroxid sodný (pevná látka, připraven 6M roztok)

Chlorid hořečnatý (pevná látka, připraven 1M roztok)

Chlorid manganatý (pevná látka, připraven 1M roztok)

para-nitrofenylfosfát (dále jen pNPP, k dispozici pevná látka a 17,7mM roztok, připraven 20mM a 250mM roztok)

Pho15p pro *C. albicans* a *C. parapsilosis* (dále jen CaPho15p a CpPho15p)

Potenciální inhibitory (pevné látky):

7-deaza-2-deoxyinosin

Acetazolamid

Adenin

AMP

Arginin

Aspartát

Diethyloxalát

Fumarát

Glukosa

Glukosa-6-fosfát

Glutamát

Glutamin

Glycin

Ketoglutarát

Kreatin

Kyselina jablečná

Laktát

Lenvatinib

Methyl- α -D-manopyranosid

Nikotinamid

Propionát

Pyridoxal hydrochlorid

Pyruvát

Rhamosa

Sukcinát sodný

Sulfanilamid

Thiamin

Uridin

Vandetanib

β -glycerofosfát

Síran kobaltnatý (pevná látka, připraven 1M roztok)

Vybrané enzymy *M. smegmatis*: MSMEG_2451, MSMEG_3753, MSMEG_0867 – klonovali, exprimovali v *Escherichia coli* a purifikovali Ing. Knejzlík PhD. a Ing. Dostál PhD. z Ústavu organické chemie a biochemie

Zásobní pufr pro Pho15p (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂; pH 8,3 pro CaPho15p a pH 8,0 pro CpPho15p)

Zásobní pufr pro enzymy *M. smegmatis* (500 mM Bis-tris propan; pH 6-9,5)

8.2. Přístroje

| | |
|---------------------------------|---|
| Analytické váhy | AND ER-120A |
| Čtečky mikrotitračních destiček | Tecan Infinite M200 Pro Tecan Sunrise Absorbance Microplate Reader Thermo Scientific Multiskan GO |
| Předvážky | AND HL-400 |
| Stolní centrifuga | Heraeus Biofuge Pico |
| Třepací inkubátor | VWR® Thermal Shake <i>lite</i> |

8.3. Metody

8.3.1. Michaelisova konstanta pro pNPP u Pho15p

Pro měření byla ze zásobního pufru pro Pho15p a 17,7mM roztoku pNPP připravena ředící řada, kde proměnný faktor byla koncentrace pNPP (3,54; 2,53; 1,77; 1,18; 0,885; 0,708; 0,506; 0,295; 0,142 mM). Do mikrozkuvek typu Eppendorf byly postupně připraveny jednotlivé reakční směsi, vždy z 20 μ l jednoho enzymu a 200 μ l jednotlivých roztoků pufru smíchaných s pNPP. Výsledné koncentrace pNPP tak byly 3,22; 2,30; 1,61; 1,07; 0,80; 0,644; 0,460; 0,268 a 0,129 mM. Reakce byly ponechány probíhat 20 minut na třepačce, při 37 °C a 1000 rpm. Pro ukončení reakce bylo použito 18 μ l 6M hydroxidu sodného. Roztoky byly po 100 μ l (v duplikátech) přeneseny do mikrotitrační destičky. Nakonec byla změřena absorbance při 405 nm.

8.3.2. Testování potenciálních inhibitorů u Pho15p

Testování potenciálních inhibitorů probíhalo analogickým postupem jako měření Michaelisovy konstanty. Z jednotlivých testovaných látek byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 100 mM. Ze zásobního pufru a roztoku pNPP byly připraveny roztoky substrátu s koncentrací 0,49 mM pNPP pro CaPho15p a 0,29 mM pNPP pro CpPho15p. Výsledná koncentrace pNPP v reakční směsi tak byla pod polovinou hodnoty K_m . V mikrozkuvkách typu Eppendorf byly připraveny reakční směsi smícháním 30 μ l testovaného potenciálního inhibitoru, 240 μ l roztoku pufru s pNPP a 30 μ l příslušného enzymu. Výsledná koncentrace testovaných potenciálních inhibitorů tak byla 10 mM. Reakce byly opět ponechány probíhat 20 minut na třepačce, při 37 °C a 1000 rpm. Přídavek 6M hydroxidu sodného u některých reakcí zkresloval výsledek a nebyl tedy nadále používán. Roztoky byly po 100 μ l (v triplikátech) přeneseny do mikrotitrační destičky a byla změřena absorbance při 405 nm. Takto byly otestovány všechny potenciální inhibitory vypsané v oddílu 8.1. Materiály. Před samotným měřením první sady potenciálních inhibitorů bylo otestováno, jestli reakce není inhibována dimethylsulfoxidem, ve kterém byly rozpuštěny některé látky. Byly připraveny roztoky pufru a substrátu o koncentraci pNPP 0,98 mM pro CaPho15p a 0,57 mM pro CpPho15p. Dále byl přidán DMSO tak, aby vznikla řada koncentrací od 0,5 % do 6 %. Zbytek měření probíhal postupem popsáním výše.

8.3.3. IC₅₀ u vybraných potenciálních inhibitorů Pho15p

U CpPho15p byly vybrány tři látky k dalšímu měření – thiamin, pyridoxal hydrochlorid a glukosa-6-fosfát. Pro zachování koncentrace pNPP v reakční směsi byla ze 100mM roztoků těchto látek nejprve připravena ředící řada (85; 65; 50; 40; 25; 10; 5; 1; 0,5 mM). V mikrozkušnicích typu Eppendorf byly připraveny reakční směsi smícháním 30 μ l vybraného roztoku inhibitoru o příslušné koncentraci, 240 μ l roztoku pufru s pNPP a 30 μ l CpPho15p. Výsledné koncentrace vybraných inhibitorů tak byly 10; 8,5; 6,5; 5; 4; 2,5; 1; 0,5; 0,1 a 0,05 mM. Zbytek měření probíhal analogicky postupem popsaným výše.

8.3.4. Měření pH optima enzymů *M. smegmatis*

Měření s enzymy *M. smegmatis* probíhalo převážně na Ústavu organické chemie a biochemie. Nejprve byly připraveny zásobní pufrы 500mM Bis-tris propanu o proměnlivém pH (rozsah hodnot 6 – 9,5), dále 250mM roztok pNPP a 1M roztok chloridu hořečnatého. Před samotným měřením byly zjištěny optimální koncentrace enzymů, respektive jejich vhodný přídavek do reakce. Pro každou hodnotu pH byl ze zásobních roztoků připraven pufr skládající se z 50mM Bis-tris propanu, 10mM chloridu hořečnatého a 5mM pNPP. Enzym MSMEG_3753, který byl poměrně aktivní, byl nejprve naředěn Milli-Q vodou osmkrát. Do jamek mikrotitrační destičky byly postupně v triplikátech přeneseny jednotlivé enzymy a následně byl ke každému přidán roztok pufru o odpovídajícím pH (50 mM Bis-tris propan, 10 mM MgCl₂, 5 mM pNPP, pH 6 – 9,5) do celkového objemu 250 μ l (viz tab.1). Absorbance (405 nm) byla měřena po dobu 20 minut na čtečce destiček TECAN.

Tabulka 1: Objemy enzymů a pufrů přenesené do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky

| Enzym | Objem enzymu [μ l] | Objem pufru [μ l] |
|------------------------|-------------------------|------------------------|
| MSMEG_2451 | 30 | 220 |
| MSMEG_3753 (8x ředěný) | 30 | 220 |
| MSMEG_0867 | 60 | 190 |

8.3.5. Michaelisova konstanta pro pNPP u enzymu MSMEG_3753

Pro další charakterizaci byl vybrán pouze enzym MSMEG_3753. Mezi měřením pH optima a Michaelisovy konstanty byl připraven nový enzym MSMEG_3753, který měl mnohonásobně vyšší koncentraci než ten předcházející. Před začátkem měření tak byl enzym MSMEG_3753 naředěn Milli-Q vodou padesátkrát. Ze zásobních roztoků byl připraven pufr

skládající se z 50 mM Bis-tris propanu o pH 8,5 a 10 mM chloridu hořečnatého, proměnný parametr byla koncentrace pNPP. Ten byl poté do jednotlivých reakčních směsí přidáván tak, aby výsledná koncentrace byla 10; 5; 4; 3; 2; 1; 0,75 a 0,5 mM. Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplicátech přeneseno 10 µl padesátkrát ředěného enzymu MSMEG_3753 a 100 µl reakční směsi. Absorbance (405 nm) byla měřena po dobu 30 minut na čtečce destiček TECAN.

8.3.6. Potřeba dvojmocných iontů u enzymu MSMEG_3753

Ze zásobních roztoků byly připraveny pufrы skládající se z 50 mM Bis-tris propanu a 5 mM pNPP. Hodnota pH byla 8,5. Proměnný parametr byla koncentrace hořečnatých, manganatých a kobaltnatých iontů v rozsahu 0–100 mM. Ze zásobních 1M roztoků chloridu hořečnatého, síranu kobaltnatého a chloridu manganatého byly připraveny ředící řady a příslušné přísavky byly přeneseny do pufrů. Do mikrotitrační destičky bylo v triplicátech přeneseno 10 µl enzymu MSMEG_3753 a 100 µl pufru o příslušné koncentraci jednotlivých iontů. Absorbance (405 nm) byla měřena po dobu 20 minut na čtečce destiček TECAN.

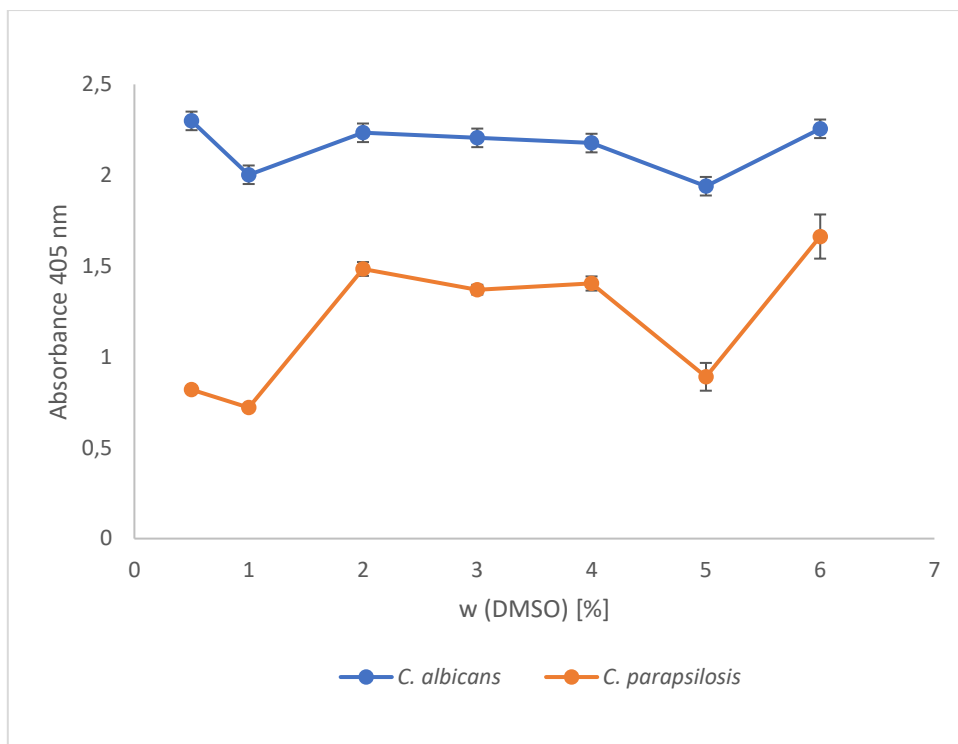
9. Výsledky

9.1. Michaelisova konstanta pro pNPP u Pho15p

Duplikáty hodnot absorbance (405 nm) naměřené při reakci enzymů s pNPP byly zprůměrovány a od každého průměru byl odečten příslušný slepý vzorek. V programu MS Excel byla pomocí nelineární regrese vypočítána Michaelisova konstanta K_m . K výpočtu byla použita rovnice funkce $V_{max} * x / (K_m + x)$, kde V_{max} je maximální rychlost, K_m je Michaelisova konstanta a x je koncentrace substrátu. Pro CpPho15p byla konstanta stanovena na $0,569 \text{ mM} \pm 0,235 \text{ mM}$, u CaPho15p byla rovna $0,977 \pm 0,051 \text{ mM}$. Hodnoty Michaelisovy konstanty byly stanoveny především pro možnost nastavení reakcí při testování potenciálních inhibitorů. Koncentrace substrátu (tedy pNPP) byla snížena pod polovinu hodnoty Michaelisovy konstanty, aby reakce neprobíhala příliš rychle a bylo možné ji sledovat.

9.2. Potenciální inhibitory u Pho15p

Triplikáty hodnot absorbance (405 nm) naměřené při reakci enzymů s pNPP a DMSO byly zprůměrovány a od průměrů byl odečten příslušný slepý vzorek. Byl vynesena graf závislosti absorbance reprezentující míru konverze substrátu na koncentraci DMSO v reakční směsi (viz obr. 3). Z grafu můžeme vyčíst, že DMSO významně neinhibuje reakci enzymů s pNPP a je tedy možné jej použít pro rozpouštění látek obtížně rozpustných ve vodě.



Obrázek 3: Vliv různých koncentrací DMSO na absorbanci (405 nm) naměřenou při reakci enzymů CaPho15p (modrá) a CpPho15p (oranžová) při reakci s pNPP; absorbance představuje míru konverze substrátu

Triplikáty hodnot absorbance (405 nm) naměřené při reakci enzymů s pNPP a testovaným potenciálním inhibitorem byly zprůměrovány a od průměrů byl odečten příslušný slepý vzorek. Pro přehlednost a zjednodušení jsou výsledky testování potenciálních inhibitorů prezentovány jako procenta z neinhibované reakce. Kvůli nestabilitě a fotosenzitivitě pNPP probíhala neinhibovaná reakce souběžně s měřením každé sady. Všechny testované látky a výsledky měření byly zaznamenány do tabulky 2. Žádná z vybraných látek výrazně neinhibovala CaPho15p, u některých z nich ale došlo ke snížení absorbance až o 40 %. Ze všech otestovaných látek inhibovaly CpPho15p pouze tři z nich, a to thiamin, pyridoxal hydrochlorid a glukosa-6-fosfát. U těchto látek bylo následně stanoveno IC_{50} .

Tabulka 2: Tabulka testovaných látek vybraných jako potenciální inhibitory enzymů CaPho15p a CpPho15p; vpravo procento z neinhibované reakce enzymů a pNPP s testovanou látkou oproti standardní reakci enzymů s pNPP bez přidavku potenciálního inhibitoru; u reakcí, při kterých nedošlo k viditelnému snížení konverze pNPP (% z neinhibované reakce > 90 %) je pouze „n.i.“ jako „neinhibuje“

| Kategorie | Testovaná látka | % z neinhibované reakce | |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|------|
| | | CA | CP |
| Glykolýza | Laktát | n.i. | n.i. |
| | Glukosa-6-fosfát | 83,2 | 35,8 |
| | Glukosa | n.i. | n.i. |
| | Pyruvát | n.i. | n.i. |
| Krebsův cyklus | Fumarát | n.i. | 77 |
| | Sukcinát sodný | 58,5 | n.i. |
| | Kyselina jablečná | n.i. | n.i. |
| | Ketoglutarát | n.i. | n.i. |
| Inhibitory jiných enzymů | Lenvatinib | n.i. | 67,3 |
| | Vandetanib | n.i. | n.i. |
| | Acetazolamid | n.i. | 71,7 |
| | β-glycerofosfát | n.i. | 72,5 |
| | Sulfanilamid | n.i. | n.i. |
| Nukleotidy/nukleosidy/báze | Adenin | 68,6 | 74,4 |
| | Uridin | 66,5 | 71,2 |
| | 7-deaza-2-deoxyinosin | 86,8 | n.i. |
| | AMP | n.i. | n.i. |
| Vitaminy | Thiamin | n.i. | 14,3 |
| | Pyridoxal hydrochlorid | n.i. | 4,11 |
| | Nikotinamid | 80,2 | 65,9 |
| Hexosy | Rhamnosa | 64,4 | 69,7 |
| | Methyl-α-D-manopyranosid | n.i. | 88,0 |
| Aminokyseliny | Glycin | 83,3 | 89,6 |
| | Arginin | 83,5 | n.i. |
| | Aspartát | 79,7 | n.i. |
| | Glutamin | 79,1 | 84 |
| | Glutamát | 86,7 | n.i. |
| Ostatní | Diethyloxalát | 81,7 | 81,3 |
| | Kreatin | 73,1 | 75 |
| | Propionát | 73,1 | 70,9 |

9.3. IC₅₀ vybraných potenciálních inhibitorů

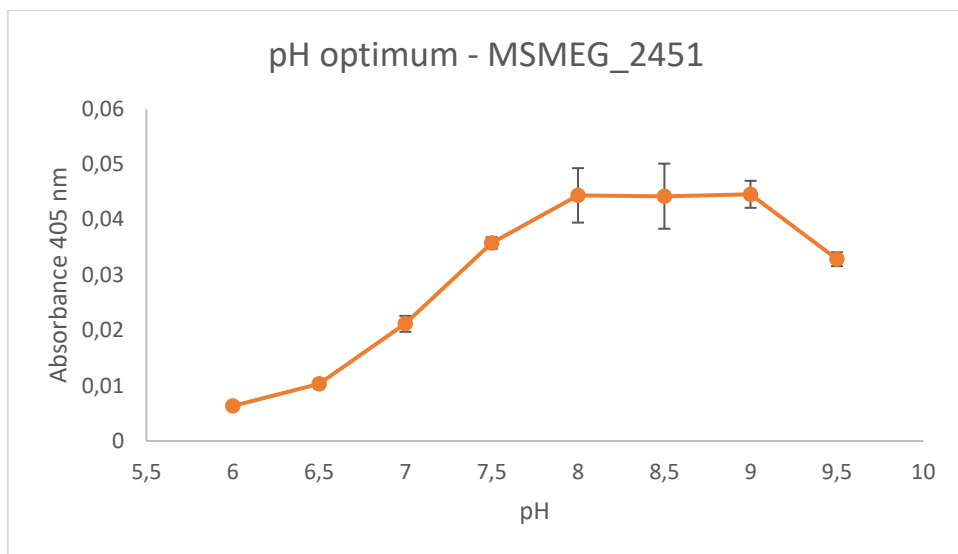
Z duplikátů naměřené absorbance (405 nm) reakce CpPho15p s pNPP a příslušným inhibitorem byly vypočítány průměry a od nich odečteny příslušné slepé vzorky. V programu MS Excel byly z rovnice grafů závislosti absorbance při 405 nm na koncentraci inhibitoru vypočítány hodnoty IC₅₀ pro jednotlivé inhibitory (viz tab. 3).

Tabulka 3: Vybrané inhibitory a jejich stanovené IC₅₀ v mM; vypočítáno v programu MS Excel

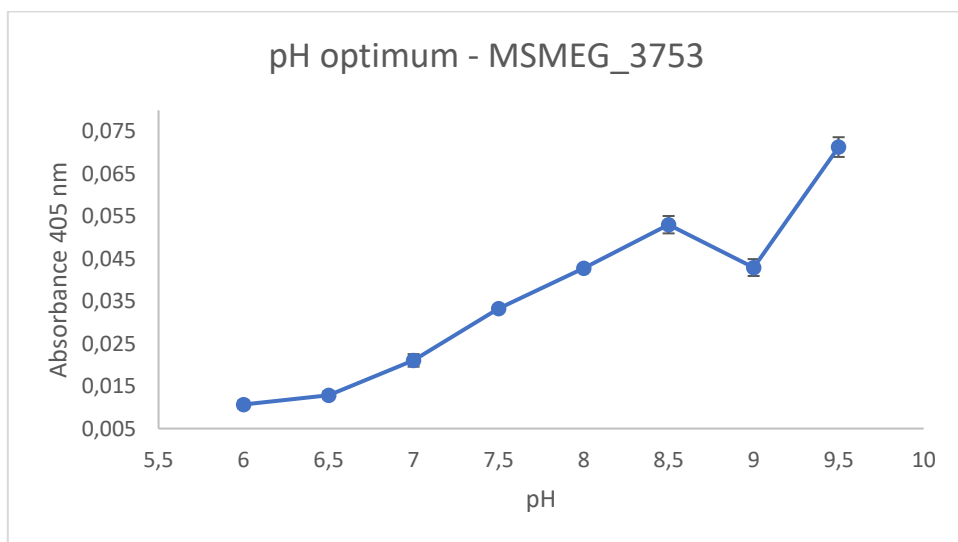
| Vybraný inhibitor | IC ₅₀ [mM] |
|------------------------|-----------------------|
| Glukosa-6-fosfát | 4,67 |
| Pyridoxal hydrochlorid | 5,29 |
| Thiamin | 3,57 |

9.4. pH optimum u enzymů *M. smegmatis*

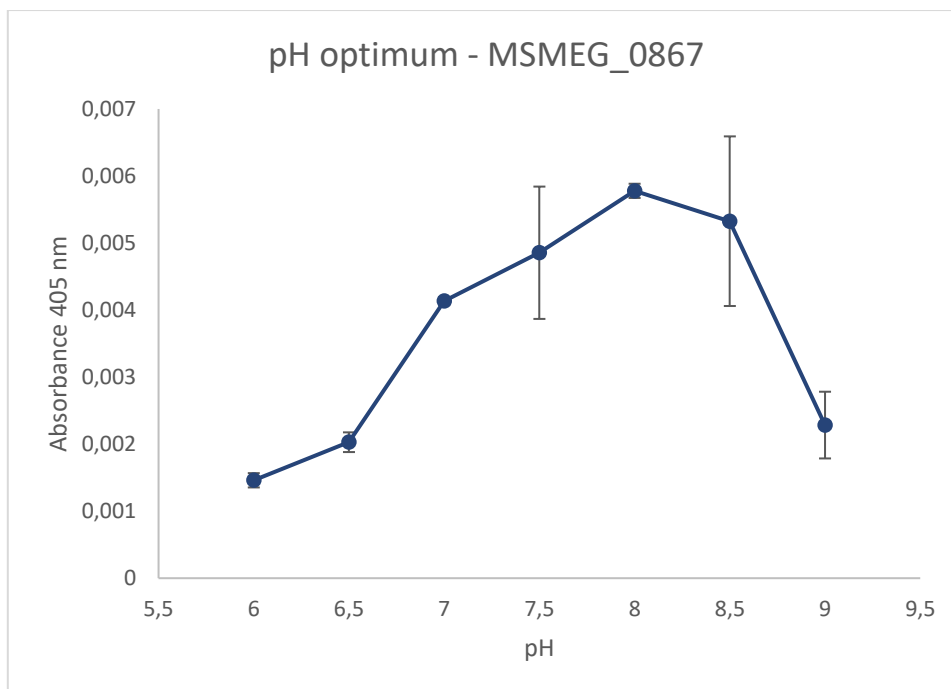
Triplikáty naměřené absorbance (405 nm) byly zprůměrovány a od průměrů byl odečten příslušný slepý vzorek. Do grafů (viz obr. 4, 5, 6) byla vynesena závislost hodnot absorbance naměřené při reakci jednotlivých enzymů s pNPP na hodnotě pH. Absorbance v grafu představuje míru konverze substrátu v daný čas. U enzymu MSMEG_2451 můžeme vidět podobnou preferenci pro pH 8; 8,5 a 9 (viz obr. 4), při dalších měřeních by bylo vybráno pH 8,5. U enzymu MSMEG_3753 bylo pH optimum stanovené na 8,5. V grafu (viz obr. 5) můžeme vidět i prudký nárůst absorbance u pH 9,5, což je ale u enzymů většinou neobvyklé. U enzymu MSMEG_0867 nemohla být kvůli nedostatku zdrojů změřena hodnota absorbance při pH 9,5. Nicméně vzhledem k výraznému poklesu absorbance u pH 9 (viz obr. 6) můžeme předpokládat, že pH 9,5 pro tento enzym není optimální a jako optimální pH se jeví hodnota 8.



Obrázek 4: Vliv pH na absorbanci u enzymu MSMEG_2451 při reakci s pNPP; triplikáty naměřené absorbance při 405 nm byly zprůměrovány a od průměru byl odečten slepý vzorek; absorbance představuje míru přeměny substrátu za daný čas



Obrázek 5: Vliv pH na absorbanci u enzymu MSMEG_3753 při reakci s pNPP; triplikáty naměřené absorbance při 405 nm byly zprůměrovány a od průměru byl odečten slepý vzorek; absorbance představuje míru přeměny substrátu za daný čas



Obrázek 6: Vliv pH na absorbanci u enzymu MSMEG_0867 při reakci s pNPP; triplikáty naměřené absorbance při 405 nm byly zprůměrovány a od průměru byl odečten slepý vzorek; absorbance představuje míru přeměny substrátu za daný čas

9.5. Michaelisova konstanta pro pNPP u enzymu MSMEG_3753

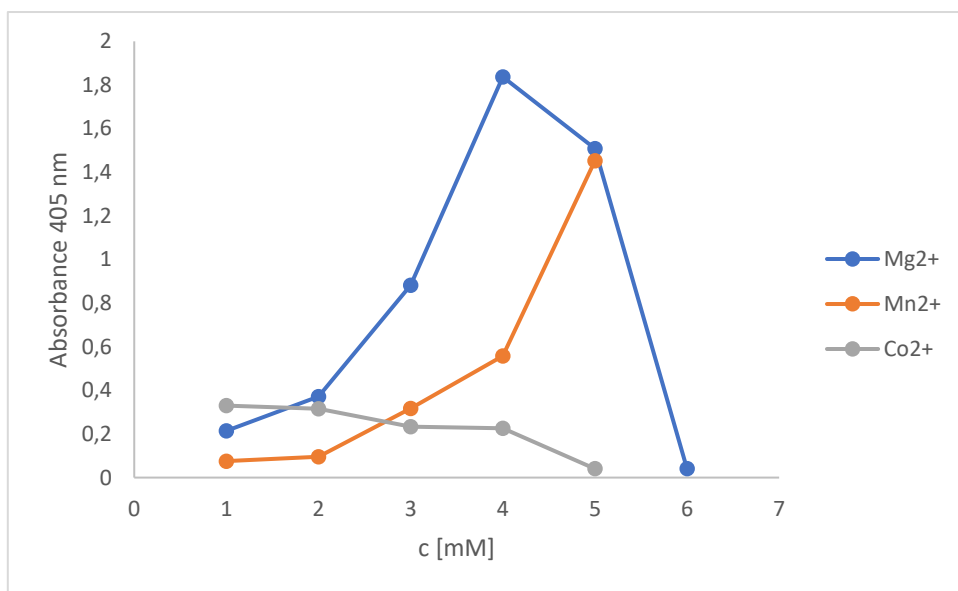
Triplikáty absorbance (405 nm) naměřené při reakci enzymu s pNPP byly zprůměrovány a od průměru byl odečten příslušný slepý vzorek. V programu MS Excel byla pomocí nelineární regrese z funkce $y = V_{\max} \times x / (K_m + x)$ vypočítána Michaelisova konstanta K_m a maximální rychlost reakce V_{\max} . Jelikož enzym MSMEG_3753 byl velmi dobře purifikován a byla stanovena jeho koncentrace, bylo také vypočítáno číslo přeměny k_{cat} . To bylo vypočítáno převedením V_{\max} na $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ použitím Lambertova-Beerova zákona a vydělením koncentrací enzymu, která byla $5,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Hodnoty byly zaznamenány do tabulky 4.

Tabulka 4: Michaelisova konstanta, maximální rychlost reakce a číslo přeměny pro pNPP při reakci s enzymem MSMEG_3753; vypočítáno v programu MS Excel z rovnice funkce $y = V_{\max} \times x / (K_m + x)$

| | |
|--|-------|
| K_m [mM] | 6,83 |
| V_{\max} [$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] | 0,49 |
| k_{cat} [s^{-1}] | 0,094 |

9.6. Potřeba dvoumocných iontů u enzymu MSMEG_3753

Z triplikátů naměřené absorbance (405 nm) reakce enzymu s pNPP a přidavkem jednotlivých iontů byly vypočítány průměry a od nich byly odečteny příslušné slepé vzorky. Vypočítané hodnoty byly v závislosti na koncentraci iontů vyneseny do grafu (viz obr. 7). Kvůli širokému rozsahu koncentrací (0–100 mM) a přehlednosti byly hodnoty na ose x označeny čísly 1-6 (viz tab. 5). U manganatých a kobaltnatých iontů nebylo možné zjistit vliv 100mM koncentrace kvůli jejich barvě (růžová a tmavě červená), která ovlivňovala měření. V grafu (viz obr. 7) můžeme vidět, že nejlépe reakce enzymu s pNPP probíhá při 1mM koncentraci hořečnatých iontů. Při koncentraci 10 mM měly hořečnaté a manganaté ionty podobný vliv, při nižších koncentracích manganatých iontů ale probíhala reakce podstatně hůř. Na rozdíl od CaPho15p a CpPho15p, jak již bylo stanoveno v předchozí studii⁴, měly kobaltnaté ionty na reakci spíš inhibiční vliv.



Obrázek 7: Vliv hořečnatých (modrá), manganatých (oranžová) a kobaltnatých (šedá) iontů na absorbanci (405 nm) u enzymu MSMEG_3753 při reakci s pNPP; absorbance představuje míru přeměny substrátu za daný čas

Tabulka 5: Hodnoty na ose x a jejich příslušné koncentrace iontů

| osa x | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------|---|------|-----|---|----|-----|
| c [mM] | 0 | 0,01 | 0,1 | 1 | 10 | 100 |

10. Diskuse

Tato práce se zabývá několika fosfatasami, které je možno na základě jejich aminokyselinových sekvencí řadit do superrodiny HAD. Dvě z těchto fosfatas, CaPho15p a CpPho15p, pocházející z patogenních kvasinek *C. albicans* a *C. parapsilosis*, byly již dříve částečně charakterizovány. Jejich substrátová specifita byla však dosud charakterizována jen povrchně. Předpokládá se, že by se CaPho15p a CpPho15p mohly podílet na metabolických opravách. V rámci předchozího výzkumu bylo predikováno několik tříd molekul, které by mohly být inhibitory těchto kvasinkových fosfatas. Mezi vybranými látkami byly například intermediáty glykolýzy a Krebsova cyklu, ale také inhibitory jiných enzymů. V této práci byla většina těchto molekul otestována a ukázalo se, že dané kvasinkové fosfatasy neinhibují. Výjimkou jsou thiamin, pyridoxal hydrochlorid a glukosa-6-fosfát, které trochu inhibují CpPho15p. Ani jednu z látek nelze považovat za dobrý inhibitor, nicméně jejich odlišný vliv na CaPho15p a CpPho15p naznačuje, že mezi těmito enzymy existují značné rozdíly. U glukosy-6-fosfátu dále není jasné, jestli ve skutečnosti není substrátem, který CpPho15p defosforyluje, a který tím pádem s pNPP soutěží na jiné bázi než inhibitory, včetně inhibitorů aktivního místa. Druhou skupinou fosfatas studovaných v této práci jsou dosud necharakterizované enzymy z *M. smegmatis*. Jejich sekvence byly vybrány na základě podobnosti s výše uvedenými kvasinkovými fosfatasami a vloženy do vektorů pro expresi v *E. coli*. Klonování, expresi a purifikaci provedli Ing. Knejzlík PhD. a Ing. Dostál PhD. na Ústavu organické chemie a biochemie. Veškerá data získaná v souvislosti s těmito mykobakteriálními fosfatasami jsou tedy zcela nová a popisují dosud neznámé enzymy. Lze tedy říct, že fosfatasy MSMEG_2451, MSMEG_3753 a MSMEG_0867 hydrolyzují pNPP, preferují pH 8 a vyšší a jejich aktivita je zvýšena v přítomnosti dvojmocných iontů, konkrétně hořečnatých a manganatých. Na rozdíl od kvasinkových fosfatas je jejich aktivita ale inhibována kobaltnatými ionty. Touto charakterizací byly splněny předpoklady potřebné pro zahájení testování substrátové specifity a zjištění, zda se jedná o fosfatasy podílející se na metabolických opravách.

11. Závěr

- Byl otestován soubor látek, u nichž se předpokládalo, že by mohly být inhibitory CaPho15p a CpPho15p
- Žádná z otestovaných látek neinhibovala CaPho15p
- Ze všech otestovaných látek inhibovaly CpPho15p pouze tři – thiamin, pyridoxal hydrochlorid a glukosa-6-fosfát – u těchto látek bylo stanoveno IC_{50}
- U všech 3 fosfatas *M. smegmatis* bylo stanoveno pH optimum – pro všechny mělo hodnotu buďto 8 nebo 8,5
- U MSMEG_3753 byla stanovena Michaelisova konstanta pro pNPP, maximální rychlost reakce a číslo přeměny
- Hořečnaté a manganaté ionty zvyšovaly aktivitu MSMEG_3753 při reakci s pNPP
- Kobaltnaté ionty měly naopak na MSMEG_3753 inhibiční vliv

Seznam použité literatury:

- (1) Collard, F.; Baldin, F.; Gerin, I.; Bolsée, J.; Noël, G.; Graff, J.; Veiga-da-Cunha, M.; Stroobant, V.; Vertommen, D.; Houddane, A.; Rider, M. H.; Linster, C. L.; Van Schaftingen, E.; Bommer, G. T. A Conserved Phosphatase Destroys Toxic Glycolytic Side Products in Mammals and Yeast. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (8), 601–607. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2104>.
- (2) Bommer, G. T.; Schaftingen, E. V.; Veiga-da-Cunha, M. Metabolite Repair Enzymes Control Metabolic Damage in Glycolysis. *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45* (3), 228–243. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.07.004>.
- (3) Kuznetsova, E.; Nocek, B.; Brown, G.; Makarova, K. S.; Flick, R.; Wolf, Y. I.; Khusnutdinova, A.; Evdokimova, E.; Jin, K.; Tan, K.; Hanson, A. D.; Hasnain, G.; Zallot, R.; de Crécy-Lagard, V.; Babu, M.; Savchenko, A.; Joachimiak, A.; Edwards, A. M.; Koonin, E. V.; Yakunin, A. F. Functional Diversity of Haloacid Dehalogenase Superfamily Phosphatases from *Saccharomyces Cerevisiae*: BIOCHEMICAL, STRUCTURAL, AND EVOLUTIONARY INSIGHTS. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (30), 18678–18698. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657916>.
- (4) Krocová, E.; Neradová, S.; Kupcik, R.; Janovská, S.; Bílková, Z.; Heidingsfeld, O. PHO15 Genes of *Candida Albicans* and *Candida Parapsilosis* Encode HAD-Type Phosphatases Dephosphorylating 2-Phosphoglycolate. *FEMS Yeast Res.* **2019**, *19* (1), foy112. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy112>.
- (5) Guinea, J. Global Trends in the Distribution of *Candida* Species Causing Candidemia. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *20 Suppl 6*, 5–10. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>.
- (6) T, J. A. S.; J, R.; Rajan, A.; Shankar, V. Features of the Biochemistry of *Mycobacterium Smegmatis*, as a Possible Model for *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Infect. Public Health* **2020**, *13* (9), 1255–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>.
- (7) Turner, S. A.; Butler, G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (9), a019778. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>.
- (8) Kim, J.; Sudbery, P. *Candida Albicans*, a Major Human Fungal Pathogen. *J. Microbiol.* **2011**, *49* (2), 171–177. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1064-7>.

- (9) Bennett, R. J. The Parasexual Lifestyle of *Candida Albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2015**, *28*, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.017>.
- (10) Trofa, D.; Gácsér, A.; Nosanchuk, J. D. *Candida Parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21* (4), 606–625. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>.
- (11) Nucci, M.; Barreiros, G.; Guimarães, L. F.; Deriquehem, V. A. S.; Castiñeiras, A. C.; Nouér, S. A. Increased Incidence of Candidemia in a Tertiary Care Hospital with the COVID-19 Pandemic. *Mycoses* **2021**, *64* (2), 152–156. <https://doi.org/10.1111/myc.13225>.
- (12) Mayer, F. L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida Albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Virulence* **2013**, *4* (2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
- (13) Brown, A. J. P.; Budge, S.; Kaloriti, D.; Tillmann, A.; Jacobsen, M. D.; Yin, Z.; Ene, I. V.; Bohovych, I.; Sandai, D.; Kastora, S.; Potrykus, J.; Ballou, E. R.; Childers, D. S.; Shahana, S.; Leach, M. D. Stress Adaptation in a Pathogenic Fungus. *J. Exp. Biol.* **2014**, *217* (Pt 1), 144–155. <https://doi.org/10.1242/jeb.088930>.
- (14) Calderone, R. A.; Fonzi, W. A. Virulence Factors of *Candida Albicans*. *Trends Microbiol.* **2001**, *9* (7), 327–335. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02094-7).
- (15) Tsui, C.; Kong, E. F.; Jabra-Rizk, M. A. Pathogenesis of *Candida Albicans* Biofilm. *Pathog. Dis.* **2016**, *74* (4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>.
- (16) Finan, J. D.; Guilak, F. The Effects of Osmotic Stress on the Structure and Function of the Cell Nucleus. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *109* (3), 460–467. <https://doi.org/10.1002/jcb.22437>.
- (17) Sychrová, H. Yeast as a Model Organism to Study Transport and Homeostasis of Alkali Metal Cations. *Physiol. Res.* **2004**, *53 Suppl 1*, S91-98.
- (18) Batt, S. M.; Minnikin, D. E.; Besra, G. S. The Thick Waxy Coat of Mycobacteria, a Protective Layer against Antibiotics and the Host's Immune System. *Biochem. J.* **2020**, *477* (10), 1983–2006. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200194>.
- (19) Reyrat, J. M.; Kahn, D. Mycobacterium *Smegmatis*: An Absurd Model for Tuberculosis? *Trends Microbiol.* **2001**, *9* (10), 472–474. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02168-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02168-0).

- (20) Long, Q.; Zhou, Q.; Ji, L.; Wu, J.; Wang, W.; Xie, J. Mycobacterium Smegmatis Genomic Characteristics Associated with Its Saprophyte Lifestyle. *J. Cell. Biochem.* **2012**, *113* (10), 3051–3055. <https://doi.org/10.1002/jcb.24199>.
- (21) Beaudoin, G. A.; Hanson, A. D. A Guardian Angel Phosphatase for Mainline Carbon Metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41* (11), 893–894. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.005>.
- (22) Cheng, H.-C.; Qi, R. Z.; Paudel, H.; Zhu, H.-J. Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*, 794089. <https://doi.org/10.4061/2011/794089>.
- (23) Sharma, U.; Pal, D.; Prasad, R. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian J. Clin. Biochem. IJCB* **2014**, *29* (3), 269–278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>.
- (24) Seifried, A.; Schultz, J.; Gohla, A. Human HAD Phosphatases: Structure, Mechanism, and Roles in Health and Disease. *FEBS J.* **2013**, *280* (2), 549–571. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08633.x>.