

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor biochemie



Lenka Mynářová

**Interakce patogenních kvasinek rodu *Candida* s bakterií
*Pseudomonas aeruginosa***

**Interaction of the pathogenic yeasts of the genus *Candida* with
the bacterium
*Pseudomonas aeruginosa***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Školitel: RNDr. Olga Hrušková-Heidingsfeldová, CSc.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a školitele RNDr. Olgy Hruškové-Heidingsfeldové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Místo a datum:

Podpis:

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za to, že mi umožnil zabývat se tímto tématem a poskytl mi potřebné informace k jeho zahájení. Dále bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Olze Hruškové-Heidingsfeldové, CSc. za dobré rady a čas strávený nad mojí prací a díky patří i celému výzkumnému týmu Ing. Ivy Pichové, CSc., který vytvořil příjemnou pracovní atmosféru.

ABSTRAKT

Patogenní kvasinky rodu *Candida* a bakterie *Pseudomonas aeruginosa* jsou oportunistickými patogeny, které se často vyskytují v lidské mikroflóře jako neškodní komenzálové. Pro zdravého člověka nepředstavují hrozbu, avšak pro jedince s oslabenou imunitou mohou znamenat velké zdravotní riziko.

Cystická fibróza (CF) je geneticky podmíněná, nevyléčitelná nemoc, která je mimo jiné příčinou snížené obranyschopnosti pacienta. Velká část nemocných cystickou fibrózou prodělává chronické infekce plic způsobené bakterií *P. aeruginosa*. Ta však může být doprovázena právě patogenními kandidami, které, stejně jako pseudomonáda, kolonizují dýchací soustavu pacienta nebo různé plastové povrchy (např. katetry). Proto je užitečné sledovat způsob jejich interakce jak v těle hostitele, tak *in vitro*.

Kandidy i pseudomonáda sekretují celou škálu proteinových virulentních faktorů a stejně tak i malé molekuly, které slouží jako mediátory komunikace mezi mikroorganismy. Proto jsme se rozhodly testovat možnosti koexistence dvou zástupců rodu *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) s bakterií *P. aeruginosa* ve třech různých, chemicky definovaných, kapalných médiích. Testovaly jsme životaschopnost různých druhů a analyzovaly jsme proteiny sekretované do média. Mezi proteiny sekretovanými pseudomonádou jsme našly některé hydrolytické enzymy, jako na příklad aminopeptidázu, keratinázu nebo elastasu. Pouze jeden z nalezených proteinů byl sekretován *C. albicans* v přítomnosti *P. aeruginosa*: hypotetický protein č. 8 z genové rodiny LDG, který dosud nebyl charakterizován. Výsledky naší studie by v budoucnu měly sloužit jako základ rozsáhlejšího výzkumu, který bude zaměřen na různé aspekty interakce mezi *P. aeruginosa* a *C. albicans* nebo *C. parapsilosis*.

ABSTRACT

Pathogenic yeasts of the genus *Candida* and the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* are opportunistic pathogens and they often occur in the human microflora as harmless commensals. They do not mean a threat for healthy humans but they can represent a true hazard for a person with suppressed immunity.

Cystic fibrosis (CF) is an incurable genetic disease and among others, it causes suppression of immunity. Most of the patients with CF suffer from the chronic lung infections caused by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. The pathogenic yeasts can coexist with the bacteria both in lungs of the CF patients, and on various surfaces, e.g. catheters used in hospitals. Therefore it is important to explore the mode of their interaction in the host body, as well as in vitro.

Both *Candida* and *Pseudomonas* secrete a range of proteins that act as virulence factors, and also small molecules, which mediate the interaction and communication between microorganisms. We therefore tested cocultivation of two *Candida* species (*C. albicans* and *C. parapsilosis*) with *P. aeruginosa* in three different chemically defined liquid media. We monitored viability and survival of the individual species and analyzed the proteins secreted to the media. We found that *P. aeruginosa* secreted several hydrolytic enzymes, for example aminopeptidase, keratinase or elastase. We found only one protein secreted by *C. albicans* in presence of *P. aeruginosa*: hypothetical LDG family protein 8, which has not been characterized as yet. This study will provide a starting point for a more extensive project focused on various aspects of interactions between *P. aeruginosa* and either *C. albicans* or *C. parapsilosis*.

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	1
1.1 ÚVOD	1
1.2. Rod <i>Candida</i>	2
1.2.1. Zařazení a charakterizace rodu	2
1.2.2. Morfologie	2
1.2.3. Fermentace	4
1.2.4. Kvasinkové infekce	4
1.2.5. Bližší popis patogenních kvasinek <i>C. albicans</i> a <i>C. parapsilosis</i>	5
1.2.5.1. <i>Candida albicans</i>	5
1.2.5.2. <i>Candida parapsilosis</i>	6
1.2.6. Virulentní faktory	6
1.2.6.1. Adherence	6
1.2.6.2. Vratné změny fenotypu	7
1.2.6.3. Biofilm	8
1.2.6.4. Sekretované hydrolasy	9
1.2.6.5. O-mannan	10
1.2.7. Antimykotika	11
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.3.1. Zařazení a charakterizace	13
1.3.2. Morfologie a identifikace	13
1.3.3. Bakteriální infekce vyvolané původcem <i>P. aeruginosa</i>	14
1.3.4. <i>P. aeruginosa</i> a cystická fibróza (CF)	15
1.3.5. Virulentní faktory	16
1.3.5.1. Adherence	16
1.3.5.2. Biofilm	17
1.3.5.3. Extracelulární virulentní faktory	17
1.3.5.4. Lipopolysacharidy	18
1.3.6. Antibiotika	18
1.3.6.1. Rezistence <i>P. aeruginosa</i> na antibiotika	18
1.3.6.2. Antibiotika účinná proti <i>P. aeruginosa</i>	19
1.4. Systém quorum sensing	21
1.4.1. Systém Quorum sensing <i>C. albicans</i>	21
1.4.1.1. <i>E,E</i> -farnesol a tyrosol	21
1.4.1.2. 3(R)-hydroxy-tetradekanová kyselina a linolová kyselina	22
1.4.2. Quorum sensing <i>C. parapsilosis</i>	22
1.4.3. Quorum sensing <i>P. aeruginosa</i>	23
1.4.3.1. N-acylhomoserin laktony, PQS	23
1.4.3.2. Pyocyanin	24
1.4.4. QS interakce mezi <i>C. albicans</i> a <i>P. aeruginosa</i>	25

1.5. Další faktory hrající roli v interakci <i>C. albicans</i> a <i>P. aeruginosa</i>	26
2. MATERIÁL A METODY	28
2. 1. Chemikálie a přístroje	28
2.1.1. Komerční chemikálie.....	28
2.1.2. Protilátky	28
2.1.3. Buněčný materiál.....	28
2.1.4. Ostatní materiály	29
2.1.5. Přístroje	29
2. 2. Cíl experimentu	30
2. 3. Metodika.....	30
2.3.1. Kultivace mikroorganismů	30
2.3.2. Mikroskopické snímky	31
2.3.3. Semikvantitativní vyhodnocení přežití kandid v kulturách s pseudomonádou	31
2.3.4. Ukončení kultivace, filtrace a zahušťování média	32
2.3.5. SDS-PAGE.....	32
2.3.6. Přenos proteinů na membránu, N-koncová sekvenace.....	33
2.3.7. Western blot- identifikace sekretovaných aspartátových proteinas.....	33
3. VÝSLEDKY	34
3.1. Výběr vhodných médií	34
3.2. Mikroskopické fotografie	34
3.2.1. YNB-glu	34
3.2.2. YNB-gal	35
3.2.3. Minimální médium- M9	36
3.3. Test přežití kandid v kulturách	37
3.4. Barva supernatantů	41
3.5. Sapp v médiích	42
3.5.1. YNB-glu	42
3.5.2. Minimální médium- M9	43
3.6. Výsledky stanovení N-terminální sekvence proteinů sekretovaných do médií.....	44
3.6.1. YNB-glu	44
3.6.2. YNB-gal	47
3.6.3. Minimální médium- M9	48
4. DISKUZE.....	51
5. ZÁVĚR.....	53
6. SEZNAM LITERATURY	54

Seznam použitých zkratek

Als	agglutinin-like sequence
Hwp	hyphal wall protein
Sap	sekretované aspartátové proteinasy
CF	cystická fibróza
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
QS	quorum sensing
3(R)-HTDE	3-(R)-hydroxy tetradekanová kyselina
Cap	adenylate cyclase-associated protein
3-oxo-C-12-HSL	N-3-oxododekanoyl homoserin lakton
C4-HSL	N-butanoylhomoserin lakton
PQS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> quinolone signal
YNB	yeast nitrogen base
YPD	yeast extract pepton dextrose
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N, N ,N',N' - tetramethyl- ethylendiamin
PX	peroxidasa
Tris-Cl	roztok tris(hydroxymethyl)aminomethanu a koncentrované HCl

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 ÚVOD

Přestože je v současné době lékařská věda na vysoké úrovni, začíná se objevovat jeden vážný problém spojený s úspěšnou léčbou vážných nemocí. Tímto problémem je ztráta přirozené obranyschopnosti jedince. Transplantace, chemoterapie nebo onemocnění AIDS jsou příčinou ztráty přirozené imunity jedince. Jednotky intenzivní péče tak stále ve větší míře poskytují prostředí vhodné pro šíření oportunisticky patogenních mikroorganismů, které jsou pro zdravého člověka neškodné, avšak napadají pacienty s potlačenou imunitou a často končí jejich úmrtím.

Patogenní kvasinky rodu *Candida* a bakterie *Pseudomonas aeruginosa* jsou častou příčinou těchto infekcí. Co se týče patogenních kvasinek, omezily jsme se v naší práci na *C. albicans*, která je častým komenzálem a zatím celosvětově nejrozšířenější kandidou a na *C. parapsilosis*, se kterou se pacienti častěji setkají v nemocnicích a na rukou nemocničního personálu. *P. aeruginosa* je velkou hrozbou hlavně pro nemocné cystickou fibrózou a i ona je častou příčinou smrti pacienta.

Tyto mikroorganismy jsou úspěšnými patogeny díky různým faktorům virulence – je možné, že ty samé látky mohou být i nástrojem interakce mezi pseudomonádou a kandidami. Teoretická část této práce se proto zabývá faktory, které je za jistých podmínek činí tak úspěšnými patogeny. V experimentální části jsme se zaměřily hlavně na výběr vhodných podmínek kultivace patogenních kvasinek rodu *Candida* spolu s bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a dále jsme se zabývaly interakcí mezi těmito mikroorganismy.

1.2. Rod *Candida*

1.2.1. Zařazení a charakterizace rodu

Taxonomické zařazení podle National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

Nadříše:	Eukaryota
Říše:	Fungi
Podříše:	Dikarya
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Saccharomycotina
Třída:	Saccharomycetes
Řád:	Saccharomycetales
Rod:	<i>Candida</i>

Rod *Candida* je rozsáhlá skupina mikroorganismů, jejíž zástupci se mezi sebou mohou zásadně lišit. Typickými vlastnostmi těchto kvasinek je tvorba endospor a mycélií, absence produkce ureázy a v mnoha případech také schopnost zkvašování sacharidů. Dalšími charakteristikami je silná buněčná stěna zajišťující mechanickou odolnost mikroorganismu a také dvě látky dominující v její struktuře, a to glukan a mannan [1].

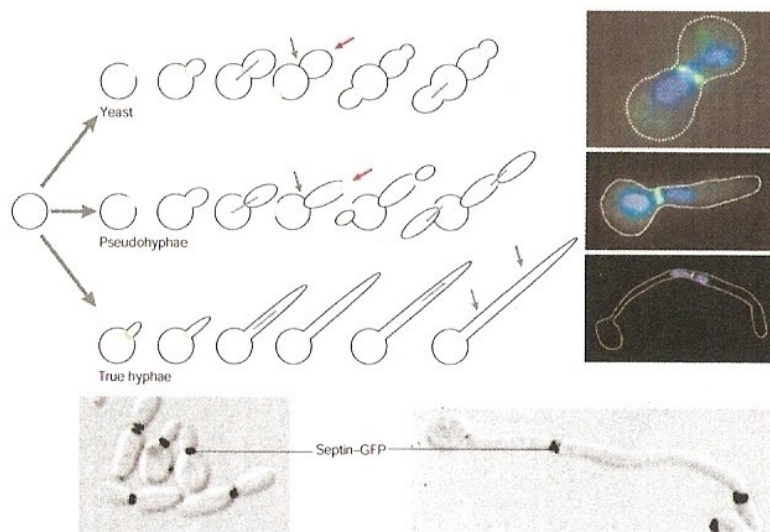
Kandidy, stejně jako další druhy kvasinek, jsou nepostradatelným modelem experimentálního výzkumu eukaryotické buňky, protože pouze studium eukaryotních organismů může vést k pochopení procesů jedinečných pro vyšší organismy [2].

1.2.2. Morfologie

U rodu *Candida* popisujeme nefilamentující formu buněk která se vyznačuje kulatými, až protáhlými buňkami a nazývá se **blastospora**. Její velikost je přibližně 3-5 μm . Buňky, které mají dostatek kyslíku, ale málo živin, se prodlužují a vytvářejí **pseudomycelium** (pseudohyfy). Je to způsob, jak získat kýžené látky z tuhého média i ve chvíli, kdy je výživa v nejbližším okolí kolonie již chudá. **Pseudohyfy** vznikají řetězením protáhlých blastospor. Na spojení dvou buněk vlákna jsou situovány konstriktce. Vytvářejí se tak řetízky, na jejichž konci rostou blastospor [3].

C. albicans a *C. dubliensis* se vyznačují schopností tvorby **pravého mycelia** (pravých hyf). Pro tyto organismy jsou charakteristické i pseudohyfy a pravé hyfy jsou tak jen speciálním případem filamentace [4,5].

Tvorba pravých hyf je spojena s procesem **germinace**. Při ní vznikají tak zvané **zárodečné klíčky** (germ tubes), jemná vlákénka, které vyrůstají z blastospor a mohou z nich vznikat pravé hyfy. Pravá hyfa je mnohobuněčný útvar, který však není rozdělen přepážkami (obr. 1) [3,4].



Obr. 1: Morfologické formy *C. albicans*, napravo zeleně znázorněná konstriktce a modře znázorněný pohyb jádra [9]

Kandidy tedy mění své morfologické formy (jsou dimorfní) podle potřeby a ta se může měnit v závislosti na přítomnosti chemických látek v okolí, pH, koncentraci kyslíku a oxidu uhličitého, teplotě nebo nutričních podmínkách. Tento způsob adaptace je řízen změnami genové exprese [6]. Rozdíl mezi těmito morfologickými formami tkví na příklad ve vyšší permeabilitě buněčné stěny myceliové formy. Ostatní dimorfní houby se v infikované tkáni vyskytují výhradně jako kvasinkovité buňky, kandidy se však při infekci objevují jak ve formě kvasinky, tak ve vláknité podobě [3].

Další strukturou pozorovanou u *C. albicans* jsou **chlamydospory**, kulovité buňky s velmi silnou buněčnou stěnou, které se vyskytují na koncích řetězců pseudohyf v prostředí s nízkým obsahem glukosy. Mají bohatý obsah lipidových kapiček, a v čase proměnlivý obsah mitochondrií a ribozomů. Vzhledem k přítomnosti dalších struktur v kombinaci s chlamydospory je jejich rozbor problematický, protože tyto buňky nelze izolovat jednoduchou separační technikou [1].

1.2.3. Fermentace

Podle fermentačních vlastností můžeme odlišit různé druhy v rámci rodu *Candida*. Při identifikaci kvasinek se používají asimilační a fermentační testy, které odlišují jednotlivé mikroorganismy. Jsou založeny na různé schopnosti asimilovat některé sacharidy nebo jiné látky – tyto testy se nazývají **auxanogramy**. Jak již bylo řečeno, vlastnosti druhů v rámci rodu *Candida* se mohou velmi lišit a fermentace je jednoduchý způsob identifikace [3].

1.2.4. Kvasinkové infekce

Rod *Candida* zahrnuje druhy nepatogenní a oportunisticky patogenní, nikoli však obligátně patogenní. Většina osob nosí některé druhy kandid ve své přirozené mikroflóře jako neškodné komenzály bez jakékoli známky infekce. **Oportunisticky patogenní** mikroorganismus napadá jedince s oslabenou obranyschopností. Vážný problém tak hrozí až v případě vážného úrazu nebo nemoci spojené se ztrátou přirozených imunitních schopností. Taková situace nastává u osob s transplantovanými orgány nebo dlouhodobými infuzemi, rakovinou a chorobou AIDS. Rizikovými faktory pro rozvoj kvasinkové infekce (obecně **mykózy**) jsou také širokospektrá antibiotika a steroidy nebo léčba ozařováním [7].

V zásadě mykózy rozdělujeme na **povrchové** a **systémové**. Nemoci způsobené kandidami se nazývají **kandidózy** a existuje jich celá řada. Povrchové kandidózy se vyskytují v podobě nepříjemných, ale relativně neškodných kožních problémů a vaginálních či orálních kandidóz. Uvádí se, že asi tři čtvrtiny dospělých, zdravých žen se ve svém životě setkaly s vaginální kandidózou [8]. Orální kandidózy jsou pak častou povrchovou nákazou pacientů s nemocí AIDS. Pokud se kandida vyskytuje v krevním řečišti pacienta, mluvíme o **kandidémii**, která může přerůst ve vážnou systémovou infekci. **Systémové infekce** způsobené kandidou jsou velkou hrozbou pro jedince, jejichž imunitní systém je oslaben opravdu vážně. Jsou to život ohrožující infekce spojené s vysokou mortalitou, protože kandida při nich napadá i vnitřní orgány [9].

Kandidémie jsou 4. nejčastější nozokomiální nákazou. Přívlástek **nozokomiální** označuje nákazu pacienta, která pochází z nemocničního prostředí [4]. Výskyt kandid v krevním řečišti pacienta vždy naznačuje, že se může jednat o systémovou nákazu [9].

Nejznámějším a obecně nejrozšířenějším z lidských patogenů je *C. albicans*. Je zároveň nejstudovanějším druhem *Candida*. Dalšími v pořadí jsou *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a *C. glabrata*. Tyto **non-C. albicans** druhy se v poslední době v populaci začínají rozšiřovat a poměrně snadno se roznášejí cestou nozokomiálních infekcí [10]. Jejich výskyt se liší

v závislosti na geografické lokalitě. Ve Finsku byla nejčastějším non-*albicans* patogenem v průběhu let 2004-2007 *C. glabrata* [11], studie na Slovensku zase odhalily největší zastoupení *C. parapsilosis* v letech 1989-1998 [12]. V USA je to *C. glabrata* v roce 1999 [13]. V Evropě, Kanadě a Latinské Americe vítězí *C. parapsilosis* [62]. Nutno podotknout, že tyto údaje se velmi rychle mění, pravděpodobně i v závislosti na používání antimykotik.

1.2.5. Bližší popis patogenních kvasinek *C. albicans* a *C. parapsilosis*

1.2.5.1. *Candida albicans*

Candida albicans byla prvně objevena již roku 1839 u pacienta s tyfovou horečkou. Jak již bylo řečeno, je nejrozšířenějším druhem kandid. Běžně se vyskytuje v gastrointestinálním traktu, vagině a ústní dutině zdravých osob. Jejímu životu na lidských sliznicích výrazně pomáhají proteolytické enzymy, které mimo jiné narušují slizniční proteiny hostitele [1].

C. albicans vytváří za běžných podmínek kulovité až protáhlé buňky v řetězcích či shlucích, ale v závislosti na okolním prostředí může vytvářet **hyfy**. Obě formy přispívají ke strategii patogenního mikroorganismu svým dílem. Kvasinková forma je pohyblivější a snadno se šíří v těle hostitele, kdežto vláknitá forma je zodpovědná za samotnou invazivní účinnost a **penetraci** do hostitelské buňky. Zajímavé je, že zárodečné klíčky (zárodky pravých hyf, viz 2.1.2.) *C. albicans* jsou metabolicky aktivní útvary a má-li dojít ke změně fenotypu, pak nemusí probíhat syntéza proteinů *de novo* [1].

C. albicans má velmi rozvinutou strategii získávání železa. Železo je prvek nepostradatelný pro všechny mikroorganismy. Jeho získávání v rozpustné formě je v přírodě krajně problematické a ani patogenní organismy, žijící v tělech vyšších organismů, nemají vyhráno, neboť železo je zde vázáno v proteinových komplexech. Mechanismus získávání takto vázaného železa zahrnuje **siderofory**, neboli specifické chelátory, které se u mikroorganismů vyskytují v dvojím typu. **Fenolátové siderofory** jsou většinou produkovány bakteriemi a **hydroxamátové siderofory** jsou produkovány spíše houbami. *C. albicans* produkuje oba tyto typy, a to ve stejném poměru [1]. Výhradně hyfální forma má pak na svém povrchu protein **Als 3** (viz 1.2.6.1.), který má schopnost vázat lidský ferritin a z něj pak získávat železo [14].

Genom *C. albicans* je dobře prozkoumán a je k nalezení na oficiálních stránkách genomové databáze *C. albicans* [62]. Ačkoli bylo provedeno již mnoho sekvenací genomu, jedná se stále o dynamicky se rozvíjející oblast výzkumu.

1.2.5.2. *Candida parapsilosis*

Vytváří elipsoidní až protáhlé buňky vyskytující se v párech či shlucích. Může být přítomna i jako kontaminant potravin. Uvádí se, že je druhým nejčastějším původcem invazivních kandidóz a bývá původcem nemocí u **nedonošených dětí** [15]. Kromě toho samozřejmě, stejně tak jako ostatní oportunisticky patogenní kandidy, napadá obecně imunokompromitované jedince a je zřejmě nejdůležitějším původcem nozokomiálních infekcí na jednotkách intenzivní péče- na rozdíl od *C. albicans* se běžně nevyskytuje jako součást lidské mikroflóry, takže kandidózy *C. parapsilosis* jsou častěji spojeny s **nozokomiálním přenosem** [16]. Fungémie způsobená *C. parapsilosis* je u pacientů spojená s používáním **katetrů** a **umělé výživy** a *C. parapsilosis* je také často přítomna **na rukou nemocničního personálu**. Vzácněji se vyskytuje rovněž jako komenzál na povrchu epitelů [10].

Informace o **genomu** *C. parapsilosis* byly publikovány v práci Butler et al. [17] a data jsou k nalezení na <http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis/>. Genom samozřejmě není prostudovaný tak detailně, jako u *C. albicans*. Hlavním úskalím je fakt, že genom *C. parapsilosis* dosud **není anotován**, a proto může být práce s daty někdy problematická.

1.2.6. Virulentní faktory

1.2.6.1. Adherence

Schopnost adheze je nepostradatelným iniciačním faktorem kolonizace a infekce kandidou. **Adheze na povrch** buněk navíc usnadňuje tvorbu **biofilmu**, který je dalším virulentním faktorem. Jednotlivé druhy kandid se ve schopnosti adheze liší, na příklad *C. parapsilosis* má poněkud lepší schopnost adheze na akrylové materiály, než *C. albicans*. Tato skutečnost může být dána tendencí *C. parapsilosis* vytvářet při adhezi na povrch epiteliálních buněk **agregáty** [7].

Za schopnost adheze jsou pravděpodobně zodpovědné dvě genové rodiny, *ALS* a *HWP*. Genová rodina *ALS* (agglutinin-like sequence) *C. albicans* kóduje osm povrchových glykoproteinů. Tyto proteiny pak pravděpodobně slouží jako **adheziny**. Ztráta schopnosti

produkovat různé proteiny Als více či méně ovlivňuje způsob a míru adheze. Deficit Als4p na příklad způsobil sníženou adhezi k endoteliálním cévním buňkám. Přítomnost podobných genů je předpokládána rovněž u *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis* [18].

Podobně i genová rodina **HWP** (hyphal wall protein) podporuje adhezi. *HWPI* kóduje protein vázaný na glukan a ten má oblasti bohaté na serin a threonin, které pravděpodobně plošně rozšiřují adhezi na napadenou plochu [19].

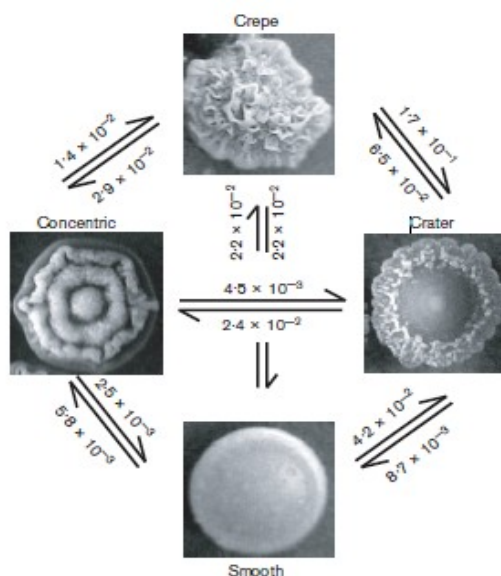
1.2.6.2. Vratné změny fenotypu

Dimorfismus kandid je virulentním faktorem. Je známo, že mutanti *C. albicans*, kteří nejsou schopni morfogeneze z blastospor na hyfu, nejsou virulentní [4]. Kromě toho však známe ještě proces, který se nazývá fenotypické přepínání.

Fenotypické přepínání (switching) je reverzibilní proces, během něhož se **spontánně** mění morfologický a fyziologický stav kandidy. Právě spontánnost tohoto procesu odlišuje fenotypické změny od dimorfismu mezi blastosporou a hyfou- ten je závislý na vnějších podmínkách. Rozdílné izoláty vykazují různé fenotypické formy [20]. U *C. albicans* **WO-1** pozorujeme proces nazývaný **white-opaque switching** – „přepínání“ mezi bílou a šedou formou. Obvykle na tuhém médiu nacházíme hladké, bílé kolonie *C. albicans*, fenotypovou změnou se však mohou změnit v protáhlé, méně kompaktní, šedé kolonie. Rozdíly mezi těmito dvěma fenotypy se netýkají jenom tvaru buňky, ale i schopnosti interakce s hostitelskou buňkou a virulentních vlastností. Obě formy vytvářejí hyfy, ačkoli šedá forma pouze za speciálních podmínek. Pokud je tedy šedá forma nějak zastoupena v invazi do těla hostitele, bude pravděpodobně představovat pouze přechodnou morfologickou strukturu, která v okamžiku potřeby prostřednictvím „white-opaque switching“ přenechává své místo bílé formě [20,21].

Také u *C. parapsilosis* byl pozorován podobný jev, ačkoli zatím nebyl příliš prostudován. Nalezené fenotypické formy byly popsány jako krepová, koncentrická, hladká a kráterovitá (crepe, concentric, smooth, crater). Zatímco **krepový** a **koncentrický** fenotyp *C. parapsilosis* je spojen s **filamentující** pseudohyfální formou, **hladký** a **kráterovitý** fenotyp je pozorován spíše u **blastospor** (obr. 2, str. 8) [10]. Každý z těchto fenotypů je pak charakteristický určitými vlastnostmi. Koncentrická forma produkuje nejvíce **biofilmu** (viz 2.2.3.3.), nejméně ho vytváří hladká forma. Koncentrická forma se

tak nejsilněji lepí na různé povrchy, na příklad na polystyren. Na druhou stranu, hladká forma zase vykazuje nejrychlejší růst [10].



Obr. 2: Fenotypové formy *C. parapsilosis*, **crepe-krepový**, **concentric-koncentrický**, **smooth-hladký**, **crater-kráterovitý**, čísla vyjadřují frekvenci přeměny (Laffey)

1.2.6.3. Biofilm

Tvorba biofilmu bývá obvyčejně **úzce spojena s dimorfismem** kandid. Hyfální forma *C. albicans* obvykle produkuje více biofilmu, než kvasinková forma. Ačkoli *C. parapsilosis* produkuje kvantitativně menší množství biofilmu, který je kvalitativně méně komplexní, než u *C. albicans*, v případě morfogeneze na pseudohyfy se jeho produkce může zásadně zvýšit [10]. Izoláty *C. parapsilosis* z různých vzorků mohou mít poněkud rozdílnou infektivitu, protože i schopnost vytvářet biofilm se mění případ od případu. Krevní izoláty *C. parapsilosis* mají větší schopnost produkovat biofilm, než izoláty téhož druhu z ostatních částí těla, tedy na příklad z kůže. Nabízí se tedy možnost **snížení virulence** hledáním cest **inhibice produkce biofilmu**. Bylo zjištěno, že mutanti postrádající jednu z lipas tvořili méně biofilmu a prokazovali nižší míru invazivity v tkáňových kulturách. Jinou cestou je příprava **antimykotik** cílených proti aktivitě vytváření biofilmu. **Amphotericin B** je klasické antimykotikum, proti němuž je biofilm *C. parapsilosis* chráněn. Jeho deriváty už však proti biofilmu aktivně zasahují a také **echinokandiny** snižují metabolickou aktivitu biofilmu (viz 2.2.4.) [7].

Dalším faktorem, který upravuje podmínky produkce biofilmu je látka zvaná **farnesol**, která je také důležitým článkem **quorum sensing** systému některých kandid (viz 1.4.1.1.).

Tvorbu biofilmu a stejně tak hyfální růst inhibuje, na rozdíl od **3(R)-hydroxy-tetradekanové kyseliny** (1.4.1.2.), která je iniciačním článkem tvorby biofilmu a rovněž se podílí na quorum sensing mikroorganismu [22].

1.2.6.4. Sekretované hydrolasy

Prokazatelný vliv na infektivitu vykazují tři základní typy enzymů. Jsou to **sekretované aspartátové proteinasy, fofolipasy a lipasy**.

Sekretované aspartátové proteinasy (Sap)

Sap výrazně zvyšují invazivitu a virulenci mikroorganismu poškozováním slizničních membrán napadeného jedince. Použití inhibitoru aspartátových proteinas **pepstatinu A** zabraňuje prvotní penetraci kandidy přes epiteliální buňky [8]. Aktivita Sap tak může být hlavním virulentním faktorem **v raných stádiích infekce**. Kandidy jsou často schopny produkovat více než jednu Sap, a proto je zvykem jednotlivé **isoenzymy** odlišovat číslováním (např. Sap1p *C. albicans*). Více je pak i genů kódujících Sap, které dohromady tvoří genové rodiny *SAP* a jejich počet se mezi různými druhy kandid liší [8].

Přes tyto druhové odlišnosti je společným rysem všech rodin *SAP* **diferenční regulace**. Můžeme ji popsat na asi nejprozkoumanějším systému Sap, který náleží *C. albicans*. **SAP2** je na příklad regulován transkripčním faktorem **Stp 1**. Stp1 je nepostradatelný pro funkci degradace extracelulárních proteinů a mutanti, kteří postrádají *stp1*, nerostou na médiu obsahujícím protein jako zdroj dusíku [23]. **SAP1** a **SAP3** a **SAP 4-6** jsou exprimovány **v závislosti na fenotypu**. Zatímco *SAP1* a *SAP3* jsou aktivní u **blastospor**, geny *SAP 4-6* jsou exprimovány pouze, je-li *C. albicans* ve své **hyfální formě**. Exprese **SAP8** je podmíněna **teplotou** a takto bychom postupně našli různé regulační faktory v rámci celé genové rodiny [8].

Oproti desetičlenné rodině *SAP C. albicans* je genová rodina **SAPP *C. parapsilosis*** poměrně malá. Byly prokázány tři proteinasy. Z toho pouze **Sapp1p** a **Sapp2p** byly izolovány a charakterizovány [7]. Sapp1p se objevuje pouze v médiích obsahujících protein jako exogenní zdroj dusíku. Sekrece Sapp2p není závislá na zdroji dusíku, ovšem vyskytuje se v menších množstvích, z celkové produkce proteinas tvoří jen asi pětinu [24]. Oba enzymy se mohou izolovat současně a lze je oddělit na základě odlišných izoelektrických bodů chromatofokusací [24].

O **Sapp3p** je zatím známo poměrně málo. Pokus o jeho izolaci dosud nebyl úspěšný. Je možné, že pouze nebylo nalezeno vhodné médium pro jeho izolaci, ale nabízí se také varianta, že tento enzym vůbec není sekretován, neboť může být zakotven v buněčné stěně [25].

Vliv Sap je obecně větší v případě lokalizovaných kandidóz (např. vaginální infekce), než u systémových infekcí [7].

Fofolipasy

Fofolipasy hydrolyzují esterové vazby v glycerofosfolipidech. Zdá se, že participují na poškozování buněčných membrán hostitele a tím zvyšují virulenci. Aktivita fosfolipas byla testována u *C. albicans* na různých modelech a přitom bylo zjištěno, že tyto enzymy **ovlivňují adhezi** na epitel nebo penetraci do buněk napadeného jedince. Příspěvek fosfolipas k invazivitě je však nejistý u *C. parapsilosis* a nemůžeme tedy jejich funkci zobecňovat [7].

Lipasy

Lipasy jsou tepelně stabilní enzymy, které katalyzují jak hydrolýzu, tak syntézu triacylglycerolů. Jsou odolné vůči působení organických rozpouštědel a proteolytických enzymů. Pole jejich působnosti je opravdu široké – **zpracovávají lipidy** z důvodu výživy kandid, **přispívají k adhezi** na hostitelskou buňku, nebo **ovlivňují imunitní buňky** a způsobují tak zánětlivou reakci. Mnohé patogenní bakterie využívají lipasy ke zvýšení virulence, mezi nimi *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Staphylococcus epidermidis* [7]. Rovněž *C. albicans* má lipasy k dispozici. **Inhibitory lipas** snižují poškození tkání u infekcí způsobených *C. parapsilosis*. Byl prokázán také pozitivní dopad lipasové aktivity na kvalitu a množství biofilmu a *C. parapsilosis* postrádající geny pro lipasy byla celkově ochuzena o invazivní chování v porovnání s přirozenou kandidou [7].

1.2.6.5. O-mannan

Sérologické studie odhalily **antigenní aktivitu** u jednoho z polysacharidů buněčné stěny, mannanu. Jeho příspěvek k patogenitě je vyšší, než u ostatních polysacharidů. Bylo dokázáno, že *O-mannan* je ochranným faktorem při interakci *C. albicans* s bakterií *P. aeruginosa*, protože mutanti *C. albicans*, kteří měli poškozený *O-mannan* v buněčné stěně, byli napadáni a likvidováni bakterií v mnohem větší míře [26].

1.2.7. Antimykotika

Antimykotika rozdělujeme do skupin podle jejich struktury na azoly, polyeny, sordariny, echinokandiny a jiné typy. Prvními používanými antimykotiky byly **Nystatin** (polyen), **Amphotericin B** (polyen) a **Griseofulvin** (jiné). Obecně antimykotika působí na buněčnou membránu (Nystatin, Amphotericin B), buněčnou stěnu (Nikkomycin) a na proteosyntézu (deriváty Sordarinu, antimetabolity) [27].

Následující souhrn popisuje významná antimykotika a další metody léčby podle review Ostrosky-Zeichnera et al. [28] (viz obr. 3, str. 12).

Azolová antimykotika jsou dosti toxická. Působí mechanismem inhibice **lanosterol 14- α -demethylasy**, enzymu, který katalyzuje přeměnu lanosterolu na ergosterol, což vede k porušení struktury buněčné membrány kvasinky. **Ergosterol** se nachází v membránách hub a kvasinek, zatímco hlavní sterolovou součástí buněčných membrán savců je **cholesterol**. Ergosterol je tedy specifickým cílem zásahu antimykotik [29]. Antimykotika fluconazolového typu dnes rozšiřují spektrum působnosti navázáním methylové skupiny na základní strukturu antimykotika. Ta usnadňuje hydrofobní interakce s cílovým proteinem. Existuje však podezření, že používáním původního fluconazolu bylo zvýšeno procento zastoupení *C. glabrata*, ale tento trend mohl být způsoben i jinými faktory [11].

Polyenová antimykotika působí tak, že se silně vážou na **ergosterol kvasinkových membrán** (např. širokospektré antimykotikum Amphotericin B). Vytvořením komplexu antimykotika s membránou vznikají póry, kterými pak unikají intracelulární látky z cytoplazmy do extracelulárního prostoru. Nevýhodou je vysoká **nefrotoxicita**, která je snižována navázáním látky do lipidického komplexu [28].

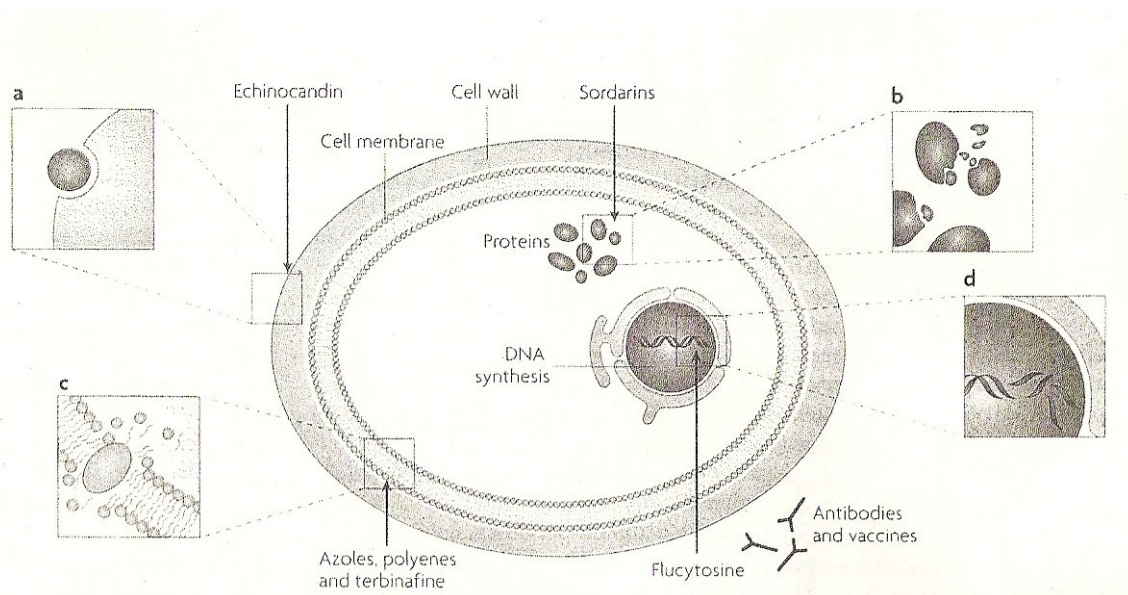
Funkce **sordarinových antimykotik** je založena na **inhibici elongačního faktoru 2** v biosyntéze proteinů. Jejich testování potvrzuje účinnost na různých zvířecích modelech *in vivo* a jeden z derivátů sordarinu ukázal výborné výsledky při nákazách vyvolaných *C. albicans* [28].

Echinokandiny inhibují syntézu **(1,3)- β -D glukanu** v buněčné stěně. Caspofungin, Anidulafungin a Micafungin jsou echinokandiny využívané v současné době. Jsou specifické proti většině druhů *Candida* spp. Nejnovějším zástupcem je Aminocandin. Vykazuje poměrně vysokou účinnost proti *Candida* spp. a obecně proti filamentujícím houbám. Bohužel byl pozorován vznik rezistence *C. glabrata* vůči echinokandinům [29].

Nikkomycin Z prokazuje svou výjimečnost mezi antimykotiky výbornými výsledky na myších modelech. Působí mechanismem **kompetitivní inhibice chitinsynthasy**. Dochází tak k porušení kostry buněčné stěny kvasinky a vzhledem k tomu, že savčí buňky chitin v buněčné stěně nemají, dosahuje Nikkomycin Z velké specifity zásahu při minimálním poškození lidské tkáně [28].

Deriváty antimykotik obsahující nanočástice dále snižují toxicitu léčiva, a to i v porovnání s lipidickými deriváty. Deriváty stříbra se v mykologii používají i jako běžné antiseptické látky [28].

V současné době probíhá vývoj nových antimykotik v oblasti azolů, polyenů a echinokandinů. Hlavním problémem ve vývoji nového léku je charakter cílového působení. Eukaryotické buňky kandid jsou na rozdíl od prokaryotických buněk bakterií dosti podobné savčím buňkám, a proto je cílů zásahu málo a antimykotika bývají poměrně **toxická** i pro léčeného jedince. Toxicita se obvykle snižuje navázáním antimykotika do **lipidického komplexu** (Nystatin, Amphotericin B) a léčivo tak může specifičtěji zasahovat proti buňkám kandid [28]. Antimykotika však nejsou jedinou formou potlačení kandidóz. Výzkum se zabývá také možnostmi **protilátkové léčby** (některé monoklonální protilátky působí protektivně) a vývoje **vakcín** [28].



obr. 3: Cílové struktury zásahu antimykotik [28]

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.1. Zařazení a charakterizace

Taxonomické zařazení podle National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

Nadříše:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Třída:	Gammaproteobacteria
Řád:	Pseudomonadales
Rodina:	Pseudomonadaceae
Rod:	Pseudomonas
Druh:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Pseudomonas aeruginosa je **gram-negativní** bakterie, která díky své všestrannosti osidluje širokou škálu prostředí a dokáže žít za rozmanitých životních podmínek. Nachází se v půdě, přímořských příbytcích, v rostlinách a i v tělech vyšších organismů [31].

Genom *P. aeruginosa* PAO1 byl sekvenován a výsledky byly uveřejněny v časopise Nature v roce 2000. Je výjimečný svou velikostí a neobvyklým rozsahem genů zodpovědných za metabolické procesy [63]. *P. aeruginosa* totiž dokáže metabolizovat malé molekuly i komplexní organické sloučeniny, aby získala zdroj uhlíku a je schopná žít **v aerobním i anaerobním prostředí**. V druhém případě využívá na příklad arginin jako akceptor elektronů. Sekvenací genomu bylo také zjištěno, že obsahuje **5570 otevřených čtecích rámců**, z nichž významná část má regulační funkci. Počtem regulačních genů *P. aeruginosa* převyšuje většinu již osekvenovaných bakteriálních genomů [31].

1.3.2. Morfologie a identifikace

P. aeruginosa se morfologicky nijak neodlišuje od běžných gram-negativních tyčinek (obr. 4, str. 14). Někdy může být obalena slizovou vrstvou. Převážná část kmenů *Pseudomonas* produkuje **pigmenty**, na příklad fluorescein. Výsadou *P. aeruginosa* je **pyocyanin** (modrozelený methylhydrofenazin, viz 1.4.3.2.). Typická je **produkce antibiotických látek**, které vznikají ve starších bakteriálních kulturách a které byly

dokonce využívány již před 2. světovou válkou českými lékaři proti gram-pozitivním i některým gram-negativním bakteriím. Teplotní optimum růstu bakterie je 37°C, ale roste i při pokojové teplotě [32].



Obr. 4: Morfologie *Pseudomonas aeruginosa* [63]

1.3.3. Bakteriální infekce vyvolané původcem *P. aeruginosa*

Na rozdíl od většiny nepatogenních zástupců rodu *Pseudomonas* je *P. aeruginosa* **oportunistickým patogenem**, který napadá imunosuprimované osoby. V tomto ohledu nacházíme paralelu mezi touto bakterií a patogenními kvasinkami rodu *Candida*. Potlačení imunity a následné infekce vyvolané *P. aeruginosa* nastávají u pacientů s vážnými popáleninami a při chronických plicních chorobách, jakou je na příklad **cystická fibróza**, ale také v případě choroby AIDS [33,34]. U těchto osob se často vyskytují **systémové infekce** způsobené bakterií – *P. aeruginosa* napadá orgány, může vyvolat jejich selhání a také bývá přítomna v krvi pacienta. Podílí se také na chorobách močových cest a na různých dermatitidách, které jsou ale pouze **povrchové**. Systémové infekce vyvolané touto bakterií bývají často fatální. Odolnost bakterie musí být velká, neboť musí obstát v boji s imunitním systémem. Takový boj obnáší útoky fagocytů, protilátek a antimikrobiálních látek produkovaných hostitelským organismem [34].

P. aeruginosa je častou příčinou **nozokomiálních nákaz**, neboť se ve velkém množství vyskytuje v nemocnicích na jednotkách intenzivní péče a v resuscitačních a novorozeneckých odděleních, kde kontaminuje okolní prostředí. Obvykle je velmi těžké vymýtít nákazu způsobenou touto bakterií, stejně jako je obtížné zbavit se patogenních kandid, které nejsou citlivé na přítomnost antibiotik. Jednou z příčin odolnosti *P.*

aeruginosa je možnost této bakterie vybrat si ze široké škály **virulentních faktorů** takovou kombinaci, která ji nejlépe adaptuje na prostředí [31].

1.3.4. *P. aeruginosa* a cystická fibróza (CF)

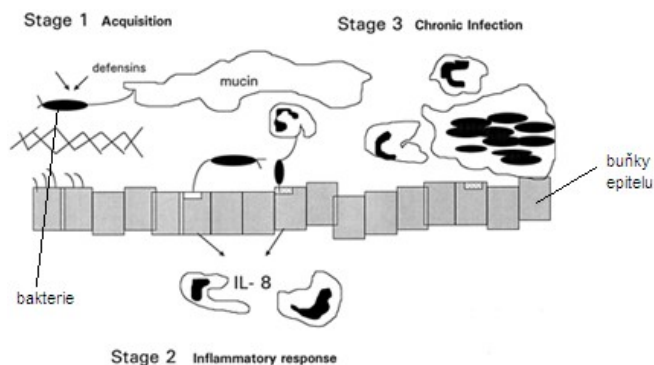
Cystická fibróza je **geneticky podmíněná choroba**, kterou vyvolávají četné **mutace** na genu, který kóduje protein zvaný **CFTR** (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Jedná se o **chloridový kanál** regulovaný cAMP, který je umístěný v buňkách epitelu, jehož funkce je v případě cystické fibrózy omezena nebo znemožněna. Zhoršuje se tak transport chloridových iontů, ale protože má tento protein i regulační funkci, dochází k selhání funkce některých dalších kanálů, na příklad sodného. To vede k **hyperabsorpci sodných iontů** v dýchacím ústrojí a porušení transportu vody [35].

CFTR protein je sice exprimován v mnoha orgánech, ale nemoc se projevuje především v respiračním, gastrointestinálním a reprodukčním systému. V 90 % případů pacient umírá na **plicní chorobu** [35].

U pacientů s cystickou fibrózou se bakterie postupně **adaptuje změnami exprese genů** ve svém genomu a během dlouhotrvající nemoci se neustále přizpůsobuje prostředí, až je prakticky nemožné ji vymýt. Tomu přispívá i vysoká míra **rezistence** na antibiotika. V dýchacím traktu zdravého člověka je přítomná bakterie navázána na povrch hlenového filmu, který pokrývá povrch respiračních cest. Bakterie je posléze řasinkami epitelu posílána výše, až se dostává do trávicího traktu a tam je zničena trávicími šťávami. Bakterie, které se tomuto procesu ubrání, jsou posléze fagocytovány, na příklad mechanismem opsonizace [33]

Dýchací trakt nemocného člověka je v důsledku genového defektu pokryt hustou, **dehydratovanou látkou**, která čištění sliznice pohybem řasinek znemožňuje. Pacient je ohrožen nejen důsledky CF, ale k závažnosti stavu také přispívají předchozí prodělané infekce, které z důvodu **zánětlivých procesů** krok po kroku poškozují plíce (viz obr. 5, str. 16) [33].

Chronické pseudomonádové infekce se týkají 85% adolescentů s CF. Antibiotická léčba se využívá k vymýcení bakterií, ale k prodloužení délky života CF pacientů se využívají i jiné metody léčby, na příklad vylepšená **mukolytická terapie** (mukolytika mění vlastnosti slizničního sekretu nebo zasahují do jeho tvorby), **fyzioterapie** dýchacích cest nebo **nutriční strategie** (použití pankreatických enzymů) [36].



obr. 5: Model respirační infekce *P. aeruginosa*- v prvním stadiu se pohyblivá bakterie dostává do plic. Pokud není odstraněna řasinkami epitelu, porušuje svými exoprodukty ochranný glykokalix epiteliálních buněk. K přichycení využívá bičíku a pilů. V druhé fázi dochází ke stimulaci hostitelských interleukinů, ve třetí fázi se choroba stává chronickou [37]

1.3.5. Virulentní faktory

Virulentní faktory rozdělujeme na faktory **vázané na bakteriální buňku** (bičík, pily IV. typu, lipopolysacharidy buněčné stěny, exopolysacharidy) a **extracelulární faktory** (proteinasy, exotoxiny, pyocyanin) [32]. Produkce **exotoxinů** je obvykle nejvýraznějším faktorem spojovaným s infekcí. V neposlední řadě však k virulenci přispívá i **syntéza biofilmu** [31].

Četné virulentní faktory vyvolávají v těle hostitele také produkci specifických protilátek, imunokomplexů, neutrofilů, ale také serinových proteinas. Všechny jmenované látky mohou při dlouhodobém působení přispívat k poškození tkáně a zejména pak k **postupné dysfunkci plic** u pacientů s CF [36].

1.3.5.1. Adherence

P. aeruginosa produkuje několik **povrchových adhezínů** a **adherentních faktorů**, které bakterii umožňují přichycení na epiteliální buňky hostitele. Konkrétně **pily IV. typu** jsou nejsilnějším adhezním faktorem mezi bakterií a pneumocyty [38]. Pseudomonády, které postrádají pily, jsou nejméně virulentní. Dokonce i samotné pily izolované z bakterie způsobují zánětlivé reakce. Na druhou stranu, mutanti, kteří vlastní pily, ale postrádající ostatní virulentní faktory, nejsou příliš úspěšnými patogeny. K silným adhezním schopnostem pilů přispívají další adheziny. Mohou to být **lipopolysacharidy**, **vnější membránové proteiny** nebo **flagelární proteiny**. Zdá se, že bakterie může také vlastnit celou řadu přídatných ligandů a receptorů, které přispívají k adhezi na různé povrchy a

struktury hostitelské buňky – příkladem může být receptor pro cholesterol. Tyto přídatné mechanismy jsou však v procesu adheze zahrnuty až druhořadě [34].

V prvotní fázi infekce bakterie produkuje exopolysacharid **alginát**. Bylo předpokládáno, že přispívá k adhezi na některé epiteliální buňky, ale dnes se zdá, že důležitější pozici může zastávat ve funkci **mezibakteriálního adhezínu** [34]. Alginát je hlavní složkou **biofilmu** *P. aeruginosa* [36].

1.3.5.2. Biofilm

V některých životních stádiích se mění struktura asociace jednotlivých bakteriálních buněk a bakterie produkuje biofilm. Bakterie v biofilmu jsou silně **rezistentní proti antibiotikům** a je pro ně tedy velmi výhodné vytvářet agregáty buněk propojené biofilmem při invazi na buňky hostitele, ale i v průběhu chronických nemocí. Biofilm je produkován nejčastěji v těchto případech:

- transport bakterie na povrch buňky
- počáteční přichycení na povrch buňky
- tvorba mikrokolonií bakterie

V souvislosti s adhezí bakterie na povrch hostitelské buňky bylo řečeno, že hlavní složkou biofilmu je exopolysacharid **alginát**. Bakterie produkující alginát a tedy biofilm je nazývána **mukoidní**. Mukoidní bakterie je zvýhodněna rezistencí na antibiotika a odolností vůči fagocytům, ale bývá **nepohyblivá** a potřebuje k životu nutričně bohaté, **anaerobní** prostředí [36]. Syntéza biofilmu není přímo závislá na **bičíku** nebo **fimbriích** (speciálním případem fimbrie jsou pily), ale mutanti postrádající tuto komponenta vytvářejí biofilm s odlišnou strukturou. Bylo zjištěno, že pohyb řízený bičíkem je zodpovědný za **produkci biofilmu** *P. aeruginosa* PA14 a pily IV. typu odpovídají za **tvorbu mikrokolonií** tímto mikroorganismem [39].

1.3.5.3. Extracelulární virulentní faktory

Velká část produkce extracelulárních virulentních faktorů je u bakterie řízena **quorum-sensing systémem** (viz 1.4.3.) [31]. Většina izolátů *P. aeruginosa* produkuje čtyři extracelulární virulentní faktory. Těmi jsou **elastasa**, **fosfolipasa C**, **toxin A** a **exoenzym S**. Nejvíce elastasy a fosfolipasy C produkují izoláty z průdušek, močových cest a z povrchových poranění. Toxin A se vyskytuje spíše v kulturách izolátů z povrchových ran. Jednoduše se dá říci, že **elastasa a fosfolipasa C** jsou důležitými virulenčními faktory

ve všech typech infekce bakterií, kdežto **toxin A a exoenzym S** jsou zásadní spíše pro **povrchové infekce**. Chronické infekce pseudomonádou jsou doprovázeny postupně se zvyšující produkcí exoenzymu S [40].

Toxin A (ADP-ribosyl transferasa) je jedním z nejtoxičtějších virulentních faktorů produkovaných *P. aeruginosa*. Způsobuje ADP-ribosylaci **elongačního faktoru 2** v eukaryotických buňkách a zastavuje tak proteosyntézu [41]. Elongační faktor 2 je kovalentně modifikován a inaktivován pouze v případě, že má toxin k dispozici endogenní zdroj NAD^+ [42]. Produkce toxinu A zvyšuje virulenci v průběhu **chronických onemocnění plic**, ale během akutních zánětů nemá jako virulentní faktor příliš velkou váhu [41]. Mechanismem působení je podobný **A-fragmentu difterického toxinu** [42].

Exoenzym S je také ADP-ribosyl transferasa, ale má odlišnou strukturu a aktivitu. Není neutralizován protilátkami proti toxinu A a je **stabilnější při vysokých teplotách** [43].

Elastasa je metaloproteasa, která štěpí elastin a kolagen, ale také **inaktivuje lidský imunoglobulin G** [43].

Fosfolipasa C je hydrolytický enzym ze skupiny fosfolipas, který štěpí fosfolipidy eukaryotické buněčné stěny a také dokáže pozměňovat metabolismus buněk živého organismu [40]. Experimenty na myších na příklad potvrdily, že expozice fosfolipasou C může vést k **agregaci krevních destiček** *in vitro* i *in vivo*, k otokům končetin, vyšší propustnosti cév, paralýze a **až ke smrti** [44].

1.3.5.4. Lipopolysacharidy

Lipopolysacharidy jsou již ve své podstatě **silně toxické**. Jejich nebezpečí však tkví také v rezistenci na lidské sérum. Navíc bylo prokázáno, že protilátky proti lipopolysacharidům výrazně přispívají k přežití infikovaného experimentálního modelu [41].

1.3.6. Antibiotika

1.3.6.1. Rezistence *P. aeruginosa* na antibiotika

P. aeruginosa je rezistentní na Ampicilin, neboť pomocí enzymu **AmpC β -laktamasy** účinně likviduje β -laktamový cyklus antibiotika. Navíc vlastní také **effluxové pumpy**, které antibiotikům znemožňují prostoupit skrze buněčnou stěnu a membránu. Tím pádem je rezistentní i vůči některým dalším β -laktamům, chloramphenicolu, fluorochinolinům a novobiocinu [31]. Vhodně mutovaná bakterie si dokonce dokáže vytvořit rezistenci i proti

antibiotikům, která jsou jinak vůči *P. aeruginosa* účinná, a to na příklad proti aminoglykosidům a Colistinu [31]. S velkým **rizikem** vzniku rezistence na antibiotika jsou spojeny **mnohonásobné terapie** pacientů s cystickou fibrózou. Obecně jsou bakterie rezistentnější vůči antibiotikům, která byla dříve frekventovaně používána, než proti nově vyvinutým lékům [36].

1.3.6.2. Antibiotika účinná proti *P. aeruginosa*

Aminoglykosidická antibiotika mají molekuly složené ze sacharidů modifikovaných aminoskupinou. Aminoglykosidy se dokážou se navázat na **30 S podjednotku** bakteriálního ribozomu. Tím sice neovlivní vznik preiniciačního komplexu, ale mohou **interagovat s opravnými mechanismy** vznikajících proteinů, a ty pak obsahují mnoho chyb. Tyto proteiny jsou pak na příklad zabudovány do struktury buněčné membrány a ta má **odlišnou permeabilitu**, takže může docházet k poruchám transportu. Do bakteriální buňky se aminoglykosidy dostávají porušením struktury lipopolysacharidů vnější membrány [45]. Aminoglykosidy jsou **potenciálně toxické** pro ledvinový systém a oblast vnitřního ucha, což je způsobeno akumulací antibiotika v buňkách a jeho vázáním na ribozomy. **Úskalí** podávání aminoglykosidů pacientům s CF může spočívat v **chemickém složení bakteriálních biofilmů**- ty obsahují záporně nabitě glykoproteiny a DNA. Kladně nabitě aminoglykosidy se tak na ně mohou navázat a přestat účinkovat tím správným mechanismem. Z toho důvodu by před podáváním těchto antibiotik mělo proběhnout předchozí vyčištění dýchacích cest pacienta od **hustých bakteriálních povlaků**, aby antibiotikum mohlo plně rozvinout své účinky [36].

Cefalosporiny III. generace jsou látky **β-laktamového charakteru**. Stejně jako všechny látky této struktury tak účinkují mechanismem inhibice syntézy buněčné stěny, stěna slábne a v jistém okamžiku dochází k lyzi. Ceftazidim a Cefaperazon mohou být používány i v monoterapii, ale jakékoli jiné antibiotikum této třídy musí být podáváno v kombinaci s aminoglykosidem nebo širokospektrým penicilinovým antibiotikem (viz Kombinovaná léčba níže) [46].

Monobaktamy jsou také látky β-laktamové struktury, **β-laktamový kruh** je zde však **otevřený**- není napojen na další cyklus. Azthreonam je jediný komerčně dostupný monobaktam. Je **odolný** proti působení **β-laktamázy** a jeho aktivita proti *P. aeruginosa* je srovnatelná s cefalosporiny třetí generace. Stejně jako peniciliny a cefalosporiny působí mechanismem inhibice syntézy buněčné stěny [47].

Mechanismus účinku **širokospektrých penicilinových antibiotik** zde opět odpovídá charakteru β -laktamového kruhu, dochází tedy k inhibici syntézy buněčné stěny. Proti penicilinům však často vznikají alergie. Dříve byl široce používán Carbenicillin, Azlocilin a Mezlocilin jsou však méně toxické při intravenózním podání [36].

Fluorochinolony jsou syntetická širokospektrá antibiotika. Mechanismem jejich účinku je **zábrana rozvolnění bakteriální DNA**- nemůže docházet k replikaci. Fluorochinolony se často podávají v kombinaci s β -laktamovými antibiotiky (viz Kombinovaná léčba níže). Ciprofloxacin byl úspěšně používán k léčbě pacientů s CF, kteří byli nakaženi **multirezistentní pseudomonádou**. V menším než inhibičním množství potlačuje produkci exotoxinů *P. aeruginosa* a tím pádem **eliminuje zánětlivé procesy** [36]. Poměr účinnosti antibiotika proti *P. aeruginosa* a velikosti dávky je velmi vysoký, a proto je kombinovaná léčba ciprofloxacinem častá [48].

Polypeptidová antibiotika vykazují vysokou účinnost vůči gram-negativním tyčinkám. Colistin je **kationtový detergent**, který je účinný i při multirezistentních pseudomonádových infekcích. Působí na fosfolipidy buněčné membrány bakterie *P. aeruginosa*. Ta se stává permeabilnější a pseudomonáda postupně umírá. Colistin je **nefrotoxický** a **neurotoxický** při intravenózním podávání, raději se tedy používá při lokální léčbě. Výhodou je, že je velmi účinný a bakterie si na něj nevytváří rezistenci. Používá se jako inhalační léčivo nejen u pacientů s CF, ale také u HIV pozitivních jako podpůrná terapie [49].

Kombinovaná léčba

Monoterapie může být faktorem vzniku rezistence na antibiotika, protože na jedno antibiotikum vznikne rezistence snadněji, než při použití směsi antibiotik při kombinované terapii. Základem **kombinované terapie** je použití dvou a více antibiotik **s různými mechanismy účinku** – velkou výhodou je synergistický účinek léčiv při použití vhodné kombinace antibiotik. Na příklad β -laktamová antibiotika, která zasahují do mechanismu biosyntézy buněčné stěny, můžeme kombinovat s Novobiocinem a chinolony, které inhibují syntézu DNA, anebo s antibiotiky inhibujícími ribozomální enzymy nebo proteosyntézu navázáním na bakteriální ribozomální podjednotky [36].

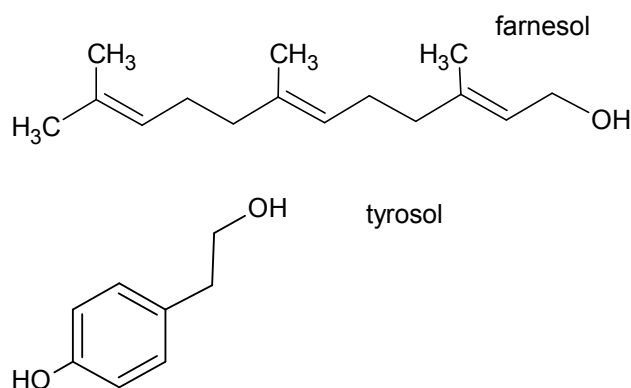
1.4. Systém quorum sensing

Quorum sensing (QS) je způsob **komunikace mezi mikroorganismy**. Výměna informací je životně důležitá a bez QS by se mikroorganismy nedokázaly chovat jako **koordinovaná skupina**. U bakterií je poměrně dobře prostudován a je zprostředkován syntézou **autoinduktorů**, což jsou malé, snadno difundující molekuly, které při jisté prahové koncentraci ovlivňují genovou expresi [50]. Toto chování trochu připomíná rysy chování vyšších organismů, kde roli autoinduktorů sehrávají hormony. Klíčové QS součásti zahrnují **synthasu, receptor a signální molekulu**. QS může ovlivňovat tvorbu biofilmů, morfogenezi, virulenci, symbiózu nebo pohyb mikroorganismů [51,52]. **Kvasinky** mají ovšem také systém QS – ačkoli, jejich **autoinduktory** se zásadně liší od těch bakteriálních. V této kapitole uvádím nejprve izolované systémy QS *C. albicans*, *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa* a dále se zabývám interakcí systémů autoinduktorů *C. albicans* a *P. aeruginosa* [52].

1.4.1. Systém Quorum sensing *C. albicans*

1.4.1.1. *E,E*-farnesol a tyrosol

E,E-farnesol a tyrosol (obr. 6) mají funkci autoinduktorů *C. albicans* a zároveň jsou vzájemnými antagonisty. Obě tyto látky jsou důležitými faktory ovlivňujícími morfologii kandid, především pak slouží jako „přepínače“ mezi formou **blastospory a hyfy**. *E,E*-farnesol sice nezastavuje prodlužování již existující hyfy, ale je-li vylučován, nové hyfy již nevznikají. Navíc potlačuje produkci biofilmu. Biosyntéza farnesolu je pravděpodobně spjata s biosyntézou ergosterolu, neboť použití azolových antimykotik současně podněcuje produkci farnesolu [50]. Tyrosol naopak **zahajuje růst hyf** v raném stadiu stavby biofilmu. Tyto děje mají základ ve změně genové exprese [53].

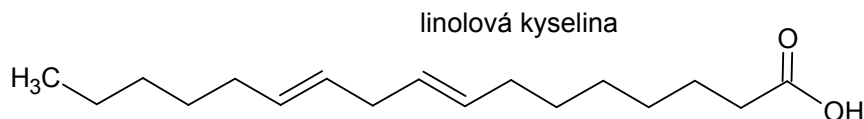


obr. 6: Autoinduktory *C. albicans*, farnesol a tyrosol

E,E-farnesol je vylučován především *C. albicans* a *C. dubliensis*. Je to **virulentní faktor**, který usnadňuje adhezi na různé povrchy a jeho produkce se v přítomnosti krevního séra až ztrojnásobuje [53].

1.4.1.2. 3(R)-hydroxy-tetradekanová kyselina a linolová kyselina

Další z rodiny autoinduktorů *C. albicans* je 3(R)-hydroxy-tetradekanová kyselina (3(R)-HTDE). Jedná se o **produkt metabolismu linolové kyseliny** (obr. 7) a obě tyto látky prokazatelně působí jako faktory urychlující přeměnu kvasinkových forem na zárodečné hyfy [22]. 3(R)-HTDE je také iniciačním článkem tvorby biofilmu a je tak antagonistou *E,E*-farnesolu. Nigam a spol. zkoušeli vystavit *C. albicans* působení obou těchto antagonistů současně a došli k následujícímu závěru. Ve směsi těchto látek se biofilm tvořil, protože účinky farnesolu byly tlumeny pomocí 3(R)-HTDE. V té samé studii bylo zjištěno, že 3(R)-HTDE působí **na úrovni genové exprese** tak, že spouští novou syntézu proteinů zodpovědných za morfogenezi. 3(R)-HTDE tak ovlivňuje dva geny zodpovědné za tuto morfogenezi: *HWPI* (viz 1.2.6.1.) a *CAP1* (adenylate cyclase-associated protein), které podporují nárůst samotné hyfy, přičemž gen *CAP1* je zahrnut ve formaci hyfální čepičky. [22].



obr. 7: Linolová kyselina, jeden z autoinduktorů *C. albicans*

Odbourávání 3(R)-HTDE v aerobním prostředí probíhá mechanismem **β -oxidace**. Tento metabolický krok dává vzniknout dvěma různým metabolitům. Není vyloučeno, že i tyto látky jsou nějakým způsobem zahrnuty v mechanismu přeměny morfologie z kvasinkové formy na hyfu [22].

1.4.2. Quorum sensing *C. parapsilosis*

QS systém *C. parapsilosis* není příliš dobře prostudován. Dosavadní studie neprokázaly, že by *C. parapsilosis* produkovala *E,E*-farnesol. Tato molekula však působí i na ty druhy kvasinek, které ji samy neprodukují. *C. parapsilosis* může být ovlivněna *E,E*-farnesolem, co se týče růstu, tento vliv je však závislý na vnějších podmínkách a teplotě [53].

Hlavními efekty farnesolu na *C. albicans* jsou inhibice produkce biofilmu a přeměny blastospor na hyfální formu. Růst však farnesolem ovlivněn není. *C. parapsilosis* ale

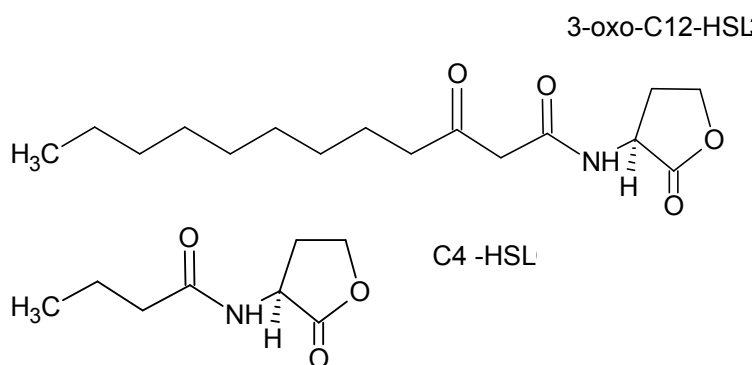
neumí vytvářet pravé hyfy a farnesol má na ní poněkud jiné účinky. Farnesol přidaný do kultury *C. parapsilosis* prokazatelně přispívá k **omezení růstu** této kvasinky. Snižuje se i tvorba biofilmu. Vyšší koncentrace farnesolu zcela zastavují růst *C. parapsilosis*, jedná se ovšem o **reverzibilní proces** a po jisté době se růst obnovuje [54].

1.4.3. Quorum sensing *P. aeruginosa*

1.4.3.1. N-acylhomoserin laktony, PQS

Přibližně **10% genomu** *P. aeruginosa* má **regulační funkci** a tento podíl zahrnuje také regulaci QS systému [51]. *P. aeruginosa* vlastní několik genů, které jsou pro QS stěžejní. Těmi jsou na příklad *las R/I* a *rhl R/I*. Tyto geny kódují synthasy, jejichž funkcí je syntéza dvou hlavních autoinduktorů bakterie – **N-3-oxododekanoyl homoserin laktonu** (transkripční faktor Las) a **N-butanoylhomoserin laktonu** (transkripční faktor Rsa) (obr. 8) [52].

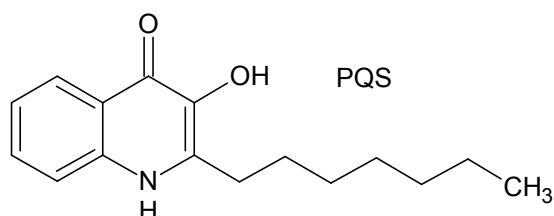
Acyl homoserin laktony každopádně **přispívají k virulenci** *P. aeruginosa*. Exprese genů zodpovědných za jejich produkci je však závislá na vnějších podmínkách. V minimálních médiích a ve zředěných bohatých médiích probíhá exprese ve větší míře, než v médiích hustých a bohatých. Dopad na expresi těchto genů má také nedostatek železa či kyslíku [51].



obr. 8: Struktura autoinduktorů *P. aeruginosa*: N-3-oxododekanoyl homoserin lakton (3-oxo-C-12-HSL) a N-butanoylhomoserin lakton (C4-HSL)

Systém acylhomoserin laktonů je provázán s dalším regulačním systémem, jehož autoinduktorem je sloučenina 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon, neboli **PQS** (*Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal, obr. 9, str. 24). Jeho funkcí je například regulace genů sideroforické biosyntézy a vyplavování železa z buňky. Může tedy sloužit jako chelátor.

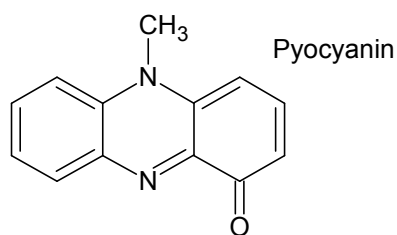
Při nadprodukcí PQS také dochází k ovlivnění buněčného růstu a případně k jeho zástavě a lyzy v případě strádání. PQS je také silný antioxidant. Existuje také **spojení** mezi produkcí **PQS a pyocyaninu**, barviva s virulentními vlastnostmi, které ale zároveň zastává velmi důležitou funkci v redoxním systému bakterie (1.4.3.2.) [51].



obr. 9: 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS)

1.4.3.2. Pyocyanin

Strukturně se jedná o látku **fenazinového charakteru** (obr. 10). Bylo zjištěno, že je článkem v systému **redoxní homeostáze** – dokáže snižovat hladinu redukovaného koenzymu NADH. Redukce pyocyaninu nejspíš **napomáhá udržovat redoxní rovnováhu** za nepřítomnosti jiných elektronových akceptorů [56]. Poměr oxidované a redukované formy koenzymu NADH/NAD⁺ nám dává klíč k identifikaci dané bakterie. *P. aeruginosa* má poměr NADH/NAD⁺ stále stabilně větší, než jedna, což ji odlišuje od řady dalších bakterií. *P. aeruginosa* totiž využívá ke svému růstu respirační dráhu za většiny podmínek, a tak se v prostředí, kde je **limitován příjem kyslíku**, může **hromadit NADH**. V takovém případě se pyocyanin redukuje a zároveň oxiduje koenzym [56].



obr. 10: Pyocyanin, jeden z autoinduktorů *P. aeruginosa*, virulenční faktor a článek redoxní homeostáze

K hromadění NADH však opět díky pyocyaninu nemusí vůbec docházet. Pokud by se nějak podařilo **blokovat přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA**, redukce koenzymu NAD⁺ na NADH by vůbec neproběhla. Samotný pyocyanin takovou funkci nemá, ale díky své redoxní aktivitě přispívá k produkci **reaktivních superoxidů** (superoxidy přispívají k oxidativnímu stresu, pro pseudomonádu však nejsou toxické, protože vlastní větší množství superoxidových dismutas). **Superoxid** dokáže zastavit přeměnu pyruvátu tak, že

katalyzuje redukci sulfhydrylových skupin lipoamidového kofaktoru **pyruvátdehydrogenasového komplexu** a tím pádem inaktivuje celý enzymatický komplex. Nedochozí tak ke vzniku acetyl-CoA, který by dále vstupoval do citrátového cyklu a redukoval NAD^+ . Pyruvát je místo toho vylučován do okolního prostředí. Nachází-li se bakterie v **extrémních podmínkách**, může to pro ni být velká výhoda - když nemůže pyruvát okamžitě zpracovat, schovává si jej do zásoby. Půdní bakterie jsou obklopeny velkým množstvím jiných mikroorganismů, které by mohly vyloučený pyruvát samy využít. U pseudomonád vyskytujících se na plicích pacientů je ale tato strategie velmi výhodná. Bez ohledu na to, že je pyocyanin toxický, může **akumulace pyruvátu** způsobovat **chronické kolonizace** a problematické léčení pacientů [56].

1.4.4. QS interakce mezi *C. albicans* a *P. aeruginosa*

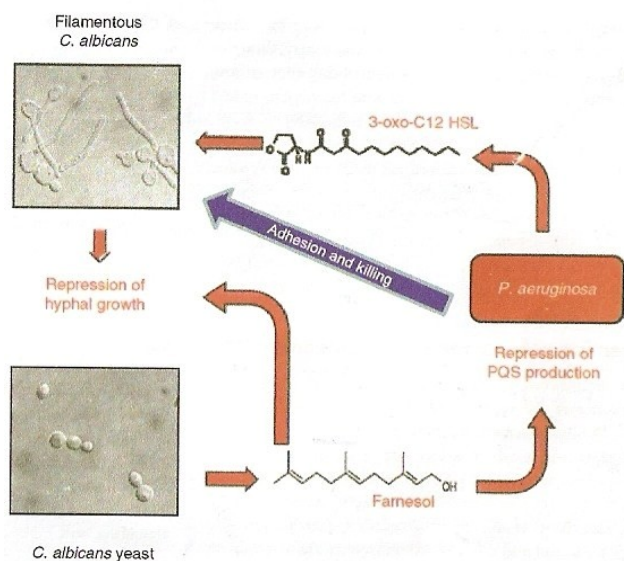
Ačkoli jsou systémy QS u kandid a bakterií zcela rozdílné, zdá se, že existuje několik drah, ve kterých se mohou navzájem ovlivňovat. Není to nic překvapivého, uvědomíme-li si, že infikovaný jedinec je také ovlivňován produkty mikroorganismů. Zajímavé je, že různé látky mohou mít afinitu k tomu samému receptoru a mohou tak zahájit proces **genové exprese** [52].

Jak bylo již výše řečeno, QS systém *P. aeruginosa*, zahrnuje geny *las R/I* a *rhl R/I*. Jedná se o kaskádu, v níž první skupina genů spouští expresi druhé skupiny. **PQS** je mezičlánek regulace *Las* a *Rhl* systému. Oba QS systémy vyvolávají expresi genů zodpovědných za stavbu a **stav biofilmu** nebo například za **expresi virulentních faktorů** a jsou nezbytné i pro interakci s *C. albicans* [51].

Farnesol, jakožto molekula zodpovědná za **ukončení filamentace** kandidy, je dalším důležitým článkem v interakci mezi bakterií a kandidou. *P. aeruginosa* má totiž mechanismy, kterými dokáže útočit na *C. albicans*, ovšem **pouze v její hyfální podobě**. Tím však role farnesolu nekončí. Bylo zjištěno, že **také inhibuje produkci PQS** prostřednictvím operonu *pqs* [55]. Farnesol přidáný do kultury pseudomonády vede ke snížení produkce PQS a pyocyaninu, ačkoli kinetika růstu bakterie není poznamenána [55]. **Farnesol zřejmě neefektivně interaguje s promotorem *pqs A***, takže nedochází k transkripční aktivaci operonu *pqs A-E* a tedy ani k produkci PQS a následně pyocyaninu. Blokace produkce PQS/pyocyaninu je aktuální téma, neboť poskytuje potenciál pro snížení virulence *P. aeruginosa* při kolonizaci pacienta [55].

3-oxo-C12-HSL je autoinduktor *P. aeruginosa* zmíněný v odstavci 1.4.3.1.. Tato látka blokuje přeměnu *C. albicans* z kvasinkové formy na hyfální. Jednoduše lze říct, že produkce této látky znemožňuje útok pseudomonády na *C. albicans* [52].

Za jistých podmínek tak může nastat situace, kdy *C. albicans* produkuje farnesol (díky farnesolu není produkován toxický pyocyanin) a *P. aeruginosa* produkuje 3-oxo-C12-HSL. Jen za těchto podmínek, je nastolena možnost **koexistence** *C. albicans* a bakterie (obr. 11) [52].



obr. 11: Interakce QS systémů *C. albicans* a *P. aeruginosa*. Farnesol (*C. albicans*) i 3-oxo-C12-HSL (*P. aeruginosa*) potlačují tvorbu hyf kandidy, farnesol současně zastavuje produkci PQS (*P. aeruginosa*). Díky tomu mohou oba mikroorganismy přežít.

1.5. Další faktory hrající roli v interakci *C. albicans* a *P. aeruginosa*

Jeden z možných mechanismů, jakým *C. albicans* podléhá bakterii pouze ve své hyfální formě, by mohla být **přítomnost glykosylových skupin** na povrchu buňky a **proteinů specifických pouze pro hyfu** [26].

Brand a spol. [26] zkusili kultivovat *C. albicans* a *P. aeruginosa* v médiu RPMI-1640, na kterém roste *C. albicans* výhradně ve své hyfální formě. Vedle směsné kultury kultivovali také kontrolní kulturu *C. albicans*. Výsledný počet přeživších buněk *C. albicans* byl určen počítáním kolonií z kultur rozetřených na povrch agarů s obsahem antibiotik. Samotná *C. albicans* dosahovala vysokých buněčných hustot a tvořila **agregáty**.

Proteiny specifické pro hyfy tedy zřejmě slouží i k adhezi a agregaci. Ve směsné kultuře s *P. aeruginosa* byla buněčná hustota nízká a agregace byla zcela zastavena [26].

Bylo zjištěno, že různá **mannanová komponenta** jsou určena k adhezi *C. albicans* na různé typy buněk. Nabízející se možností bylo otestovat mutanty postrádající tuto komponenta ohledně jejich citlivosti na vliv pseudomonády, neboť je možné, že bakterie napadá právě tyto struktury. Z výsledků však nevyplývalo, že by tyto mutanti byli odolnější. Naopak se ukázalo, že přítomnost jednoho z mannanů je **protektivním faktorem** *C. albicans* [26].

Vzájemná interakce mezi patogenními kvasinkami rodu *Candida* začala být studována teprve v posledních letech a lze předpokládat, že další faktory zahrnuté v této interakci se ještě v příštích letech objeví.

2. MATERIÁL A METODY

2. 1. Chemikálie a přístroje

2.1.1. Komerční chemikálie

Bio-Rad: Coomassie Brilliant Blue- Bio Safe Coomassie, standardy molekulových hmotností Kaleidoscope Standards

Difco: YNB médium (YNB w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate)

Fluka: akrylamid, glycerol, TEMED

HiMedia: agar

Lachema: CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, NH₄Cl

Penta: D-glukosa, kyselina citronová, NaCl, Na₂HPO₄

Pierce: Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate pro vizualizaci WB (Western blot)

Sigma: D-(+)-galaktosa, Gentamicin Sulfate Salt, LB médium, SDS, Tetracycline hydrochloride, YPD médium

2.1.2. Protilátky

králičí polyklonální protilátky proti Sapp1p, Sapp2p, Sapp3p a proti všem isoenzymům Sapp celkově, Ing. J. Dostál (ÚOCHB AV ČR)

sekundární protilátky SwAR - prasečí imunoglobuliny proti králičím značené PX (Sevapharma)

2.1.3. Buněčný materiál

Candida albicans HE 169 (z mykologické sbírky FN Olomouc)

Candida parapsilosis P 69 (z mykologické sbírky FN Olomouc)

Pseudomonas aeruginosa PAK (ze sbírky Ústavu lékařské mikrobiologie, 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Motol)

veškeré buněčné materiály jsou skladovány v mrazicím boxu při teplotě -70°C

2.1.4. Ostatní materiály

blotovací filtrační papíry Extra Thick Blot Paper (Bio-Rad)

filtry Amicon Ultra 0,5 ml 10 K Membrane (Millipore)

krycí sklička (Hirschmann Laborgeräte)

mikrofiltry Premium Syringe Filters, 0,2 µm (Agilent Technologies)

podložní sklička Objektträger (Knittelglass)

PVDF membrána- Immobilion Transfer Membranes (Millipore)

2.1.5. Přístroje

analytické váhy AE 163 (Mettler)

autokláv Tuttnauer Systec 5075 (EL)

blotovací zařízení Trans-Blot (Bio-Rad)

CCD kamera LAS-3000 (Fujifilm)

centrifuga - Eppendorf Minispin Plus

- Multifuge 3 S-R Heraeus

inkubátor (Merck)

mikroskop (Olympus IX) s kamerou (Olympus DP 70)

pH metr (Orion Model 420)

předvážky Setra 2000 S (EL)

rotační třepačka Innova 4300 (New Brunswick Scientific)

spektrofotometr HEILOS α (UNICAM)

svářečka fólií (Eta)

vertikální elektroforéza (Bio-Rad)

2. 2. Cíl experimentu

Naším cílem bylo kultivovat bakterii *Pseudomonas aeruginosa* a kvasinky rodu *Candida* (*C. albicans* a *C. parapsilosis*) ve směsných kulturách a pozorovat jejich vzájemné vztahy různými metodami. Protože pro nás bylo toto téma zcela nové, měly jsme na začátku práce jeden zásadní cíl – výběr vhodného a chemicky jasně definovaného kultivačního prostředí, které by zajistilo konstantní podmínky studia těchto mikroorganismů. Proto jsme plánovaly kultivovat mikroorganismy v různých médiích a přitom sledovat sekreci proteinů, morfologii buněk a životnost různých mikroorganismů ve směsných kulturách v různých časových bodech kultivace. Získané údaje by pak měly sloužit jako výchozí bod rozsáhlejšího projektu.

2. 3. Metodika

2.3.1. Kultivace mikroorganismů

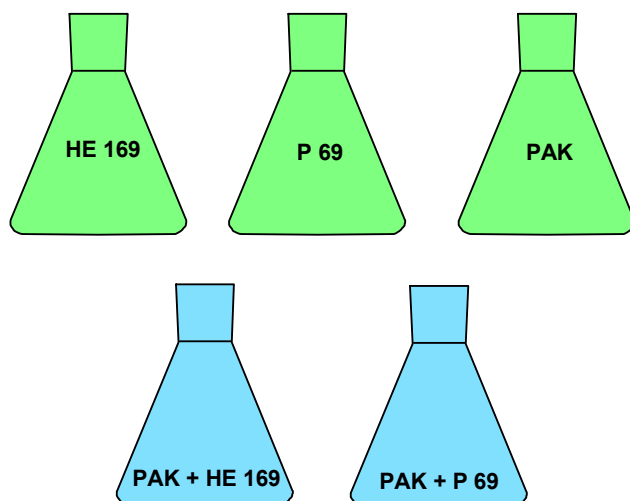
Jednotlivé kmeny (*C. albicans* HE 169, *C. parapsilosis* P 69, *P. aeruginosa* PAK) byly očkovány z kultur uskladněných v mrazicím boxu (-70°C) na agar obsahující YPD. Po jejich inkubaci v inkubátoru při 37°C byly použity na přípravu inokula. Do prvních 5 ml média YPD bylo připraveno inokulum *C. albicans* HE 169 a do dalších 5 ml shodného média bylo připraveno inokulum *C. parapsilosis* P69. Do 5 ml média LB byl zaočkován kmen bakterie *P. aeruginosa* PAK. Buňky byly kultivovány přes noc a poté bylo provedeno přeočkování do sterilních Erlenmayerových baněk uzavřených buničínovým uzávěrem, které obsahovaly jedno ze tří testovaných médií- pufrované YNB médium s glukosou (YNB-glu) nebo galaktosou (YNB-gal), nebo minimální (M9) médium. Během přeočkování bylo pipetováno vždy 50 µl inokula do 250 ml Erlenmayerových baněk, které obsahovaly 50 ml daného média podle obr. 12 (str. 31).

Kultury v Erlenmayerových baňkách byly kultivovány při 37°C v rotační třepačce. V průběhu kultivace byla měřena optická denzita vzorků (absorbance při 600 nm) a z těchto údajů byla posléze konstruována růstová křivka.

YNB-glu: 0,7 % YNB, 2 % glukosa, 20 mM kyselina citronová, pH upraveno 4 M roztokem NaOH na 5

YNB-gal: 0,7 % YNB, 2 % galaktóza, 20 mM kyselina citronová, pH upraveno 4 M roztokem NaOH na 5

Minimální médium M9: roztok 16,8 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 5 mM NaCl, 49 mM NH₄Cl, sterilizace v autoklávu, přes 0,22 µm filtr přidán roztok 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂ a 0,2 % glukosa



obr. 12: Přeočkování kultur, **zeleně** znázorněné kontrolní kultury, **modře** znázorněné směsné kultury

2.3.2. Mikroskopické snímky

V průběhu kultivace byly pravidelně odebírány vzorky na přípravu mikroskopických preparátů. 3 µl kultury byly vždy pipetovány na podložní sklíčko a vzorek byl překryt krycím sklíčkem. Nebylo využíváno žádného barvení ani fluorescence. Takto připravené preparáty byly pozorovány pod celkovým zvětšením 100 krát a průběžně byly pořizovány fotografické snímky preparátů.

2.3.3. Semikvantitativní vyhodnocení přežití kandid v kulturách s pseudomonádou

Pro účely sledování životnosti kandid v průběhu kultivace byly nanášeny směsné vzorky na mikrobiologické misky s agarem obsahujícím YPD a antibiotika tetracyklin (60 µg/ml) a gentamicin (30 µg/ml) podle Brand et al. [26] – na tomto agaru by měly narůstat pouze kolonie kandid, nikoli kolonie pseudomonád. V určených časových bodech (volených dle předpokládaného průběhu růstové křivky) byly odebírány vzorky kultur, které byly ředěny sterilní destilovanou vodou v závislosti na předpokládané buněčné hustotě- bylo použito ředění 100 krát a 1000 krát pro médium YNB-glu a M9 a 1000 krát a 2000 krát pro médium YNB-gal. Z naředěných kultur bylo pipetováno vždy 100 µl vzorku, který byl důkladně rozetřen na povrch agaru. Misky byly inkubovány při 37°C po dobu 24-48 hodin (podle nárůstu kolonií). Poté byly kolonie spočítány a jejich

počet v závislosti na čase byl vyneseno do sloupcového grafu. Výsledky byly porovnány s hodnotami optické denzity v těch samých časových bodech.

2.3.4. Ukončení kultivace, filtrace a zahušťování média

Kultivace byla ukončena centrifugací kultur na centrifuze Multifuge 3 S-R Heraeus při 3500 g, teplotě 4°C a po dobu 10 min. K odstranění zbytkových buněk byla posléze provedena filtrace supernatantů přes 0,2 µm mikrofiltry pomocí injekční stříkačky. V těchto vzorcích bylo měřeno pH, aby bylo zjištěno, zda během kultivace došlo k jeho změně. V dalším kroku bylo provedeno zahuštění supernatantů za pomoci filtrů Amicon Ultra-0,5, které dokážou zadržet molekuly o minimální molekulové hmotnosti 10 kDa (Millipore). Zahuštění bylo provedeno v centrifuze Eppendorf Minispin Plus. 400 µl supernatantů bylo pipetováno do filtrační nádoby a zahušťováno při 10 000 g po dobu 5 minut. Po zahuštění byla celá operace opakována, celkově bylo 5 x 400 µl supernatantů zahuštěno na přibližně 35 až 40 µl koncentrovaného vzorku (v závislosti na daném supernatantu). Bylo tedy provedeno přibližně 50-ti násobné zahuštění supernatantu.

2.3.5. SDS-PAGE

Filtrované a zahuštěné médium bylo analyzováno pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Po zahuštění byl ke vzorkům přidán vzorkový pufr (30-35 µl podle objemu zahuštěného vzorku). Vzorky byly poté krátce povařeny a nanoseny do jamek gelu (5% zaostřovací a 15% separační polyakrylamidový gel). Jako elektroforetický roztok byl použit Tris-glycinový pufr. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V. Jako standard byl použit komerční standard molekulových hmotností Kaleidoscope Standards. Po ukončení elektroforézy byl gel obarven stříbrem (pro vizuální kontrolu přítomných proteinů) [64], nebo byl proveden přenos proteinů na PVDF membránu (viz 2.3.6.)

Vzorkový pufr: 3 ml 0,5 M Tris-Cl (pH 6,8), 2 ml 80 % glycerolu, 1 ml mercaptoethanolu, 4 ml 10 % dodecyl sulfátu sodného (SDS), 4 ml 0,1 % bromfenolové modři v 0,5 M Tris-Cl (pH 6,8)

pufr Tris-Glycin: na 1 litr 30,2 g Tris-Cl, 188 g glycinu, 100 ml 10 % SDS, doplnit vodou, ředění 10x

2.3.6. Přenos proteinů na membránu, N-koncová sekvenace

Po ukončení elektroforézy byl získaný gel ponořen na 20 min do transferového pufru spolu s komerčními filtračními papíry. PVDF membrána byla omyta nejprve methanolem a posléze vodou, nakonec byla také ponořena do transferového pufru. Na plochu přenosového zařízení byly skládány vrstvy v pořadí filtrační papír, membrána, gel a opět filtrační papír. Přenos probíhal po dobu 20 min pod napětím 20 V. Membrána byla poté barvena roztokem Coomassie Brilliant Blue po dobu 10 min. Nakonec bylo přebytečné barvivo odstraněno odbarvovacím roztokem a membrána byla promyta vodou. Pokud byla barvením zjištěna přítomnost unikátního proteinu ve vzorku směsné kultury, byla membrána předána sekvenačnímu servisu ÚOCHB (Ing. Zdeněk Voburka), kde byla provedena N-koncová sekvenace. Ze získané sekvence jsme se pokusili o identifikaci proteinu [60].

Transferový pufr: vodný roztok 390 mM glycin, 480 mM Tris-Cl, 0,37 % SDS, ředění 10x

Odbarvovací roztok: 500 ml methanolu, 120 ml kyseliny octové, 380 ml vody

3.3.7. Western blot- identifikace sekretovaných aspartátových proteinas

Metodou Western blot byla zjišťována přítomnost sekretovaných aspartátových proteinas *C. parapsilosis* ve vzorcích kontroly *C. parapsilosis* a směsné kultury *C. parapsilosis* + *P. aeruginosa*. Po přenosu proteinů (viz 3.3.6.) byla membrána promývána 5% roztokem nízkotučného mléka v pufru TBS po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána přemístěna do polyethylenového sáčku, který byl naplněn 2% roztokem nízkotučného mléka v TBS, do nějž byl pipetován 1 µl primárních králičích polyklonálních protilátek anti-Sapp interagujících se třemi isoenzymy Sapp. Po zatavení byl sáček ponechán přes noc v chladové místnosti při 4°C. Druhý den byl sáček rozstřížen a membrána byla 3x promývána pufrem TBS po dobu 10 min. Posléze byla membrána umístěna do sáčku s 2% roztokem nízkotučného mléka a 1 µl sekundárních protilátek SwAR (swine anti rabbit, protilátky značené peroxidázou). Sáček byl opět zataven. Po 2 hodinách byl sáček rozstřížen a membrána byla opět 3x promývána pufrem TBS po dobu 10 min. Pro vizualizaci byl použit komerční luminiscenční substrát a výsledek byl zaznamenán pomocí CCD kamery.

pufr TBS: na 1 litr vody 121 g Tris-Cl (pH 7,5), 87,6 g NaCl, 10 ml Triton X-100, ředění 10x

3. VÝSLEDKY

3.1. Výběr vhodných médií

Hledaly jsme taková média, na kterých by bylo možno kultivovat kvasinky i bakterie a to jak jednotlivě, tak i ve směsných kulturách. Zásadním faktorem pro výběr kultivačního média byl požadavek jasně definovaného chemického prostředí růstu mikroorganismů. Z tohoto důvodu bylo zvoleno médium YNB, jehož chemické složení je definováno mnohem přesněji, nežli chemické složení médií YPD nebo LB – tato média totiž obsahují nejasně chemicky určené složky jako pepton nebo kvasnicový extrakt. YNB médium muselo být pufováno, neboť při různých kultivacích docházelo v médiích ke změně pH a my jsme potřebovaly eliminovat tuto proměnnou, protože naším cílem bylo sledovat jiné parametry kultivace.

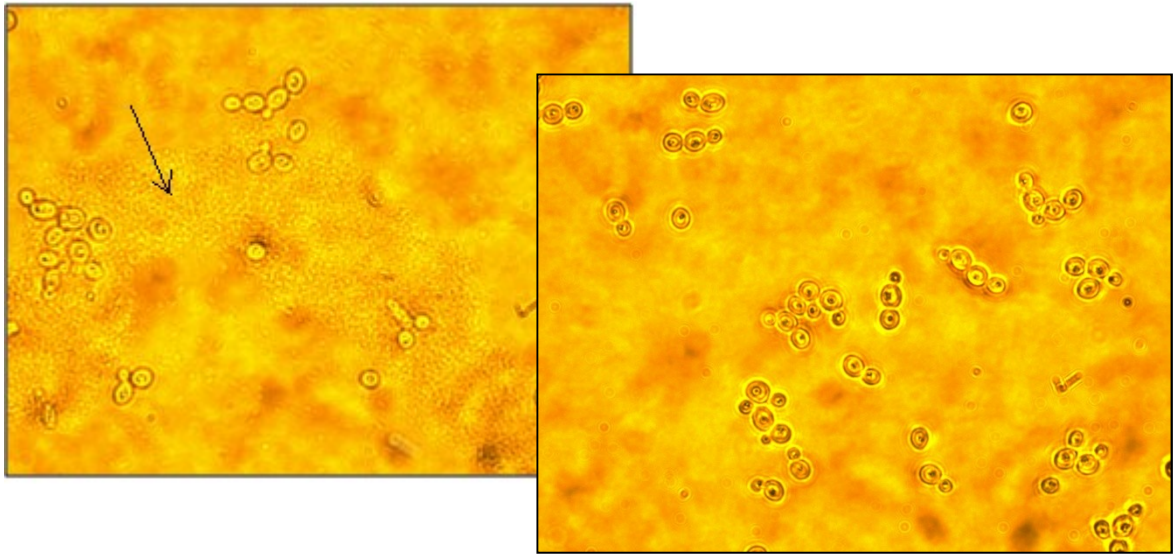
Glukosa byla zvolena jako klasický zdroj uhlíku. Galaktosové médium YNB bylo testováno z důvodu budoucího možného využití plasmidů s galaktózovým promotorem pro expresi některých proteinů v *C. parapsilosis*. Minimální médium je využíváno k růstu *P. aeruginosa* a jeho chemické složení je také velmi dobře definováno. Výhodou tohoto média je také fakt, že je bezbarvé a barviva vyloučená mikroorganismy jsou tak dobře viditelná pouhým okem.

3.2. Mikroskopické fotografie

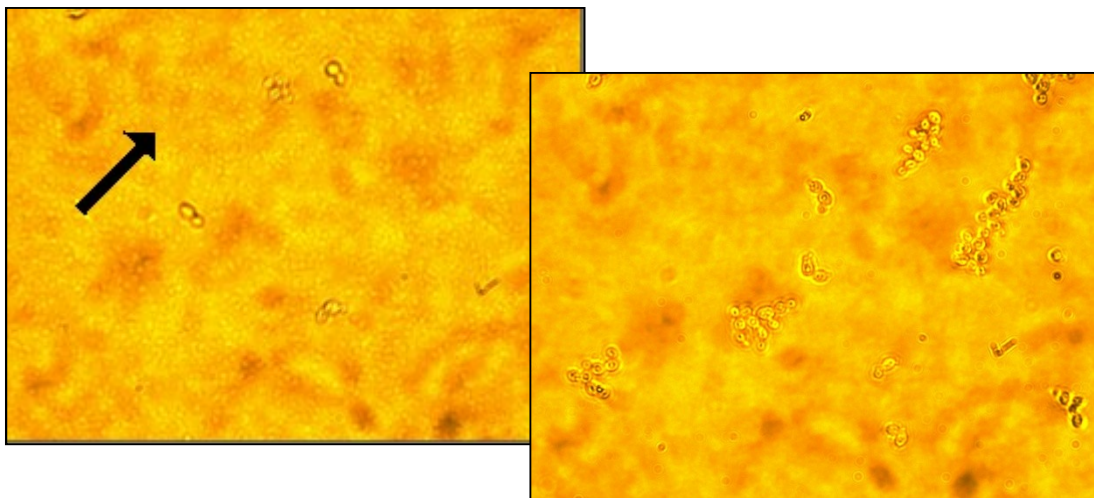
3.2.1. YNB-glu

Na obr. 13 (str. 35) je fotografie směsné kultury *C. albicans* s *P. aeruginosa* a kontrolní kultury *C. albicans*. Na médiu YNB-glu *C. albicans* v přítomnosti *P. aeruginosa* přežívala a rostla, ačkoli ke konci kultivace již začala vytvářet hyfy. Původ zrnitého povlaku okolo buněk, který je viditelný na první fotografii (označení šipkou), nebyl objasněn, ale objevoval se ve směsných kulturách často a ve větší míře byl pozorován u *C. parapsilosis*. Na fotografii kontroly *C. albicans* tento povlak nepozorujeme.

Z obr. 14 (str. 35) je jasně patrné, že *C. parapsilosis* na médiu přežívala s obtížemi. Na tomto obrázku jsou dobře viditelné pseudomonády, které v médiu rostly bez problémů a na obrázku jsou označeny šipkou, jako menší buňky na pozadí. V kontrolní kultuře rostla *C. parapsilosis* standardně.



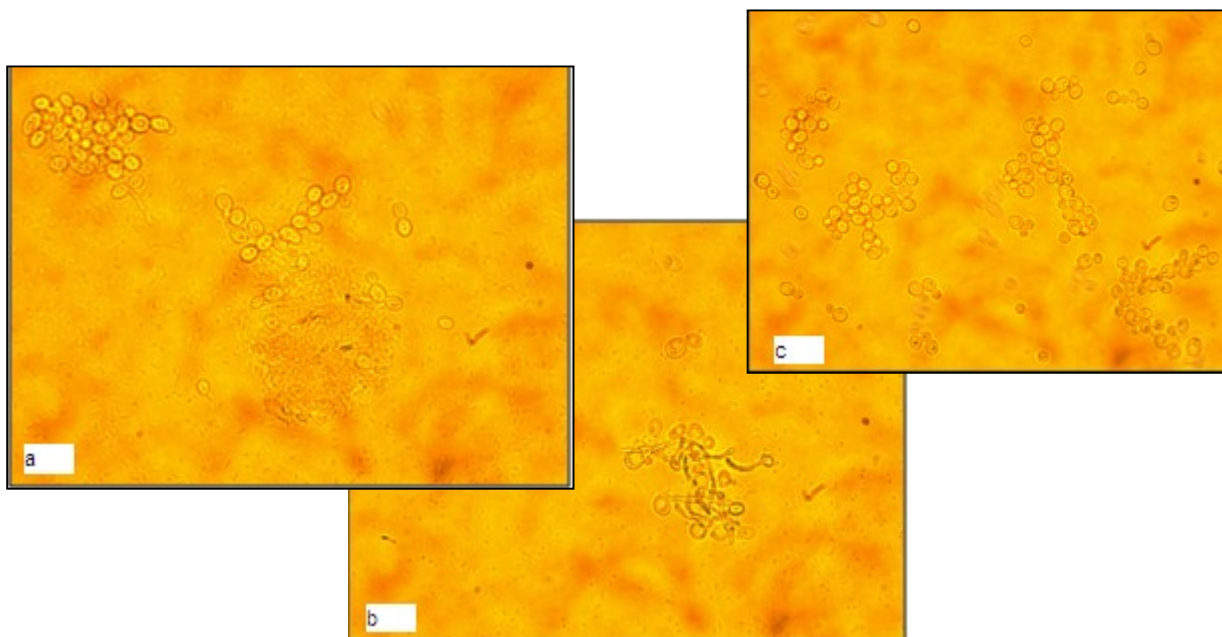
obr. 13: směsná kultura *C. albicans* a *P. aeruginosa* a kontrolní kultura *C. albicans* sledované v čase 19 hodin na médiu YNB-glu, šipka označuje shluky neznámého původu



obr. 14: směsná kultura *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa* a kontrolní kultura *C. parapsilosis* sledované v čase 19 hodin na médiu YNB-glu, šipka označuje bakterie na pozadí

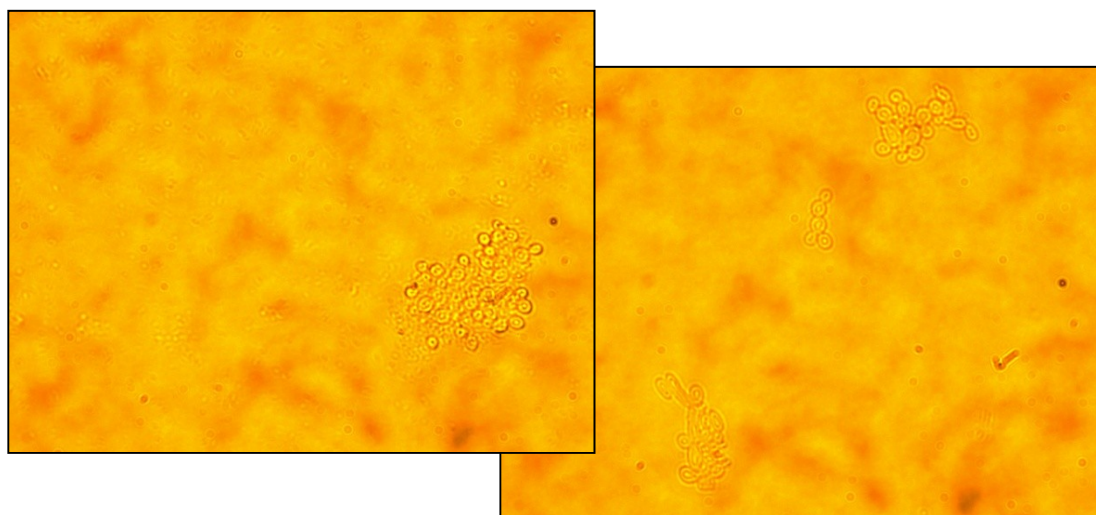
3.2.2. YNB-gal

Ve směsné kultuře *C. albicans* a *P. aeruginosa* na médiu YNB-gal se začaly u *C. albicans* v čase 43 hodin tvořit hyfy (viz obr. 15, str. 36). Vzhledem k tomu, že pseudomonády mají schopnost napadat *C. albicans* v její hyfální podobě, je možné, že po vytvoření vláknité formy klesla obranná schopnost kandid.



obr. 15: směsná kultura *C. albicans* a *P. aeruginosa* sledovaná v čase a) 17 a b) 43 hodin a c) kontrolní kultura *C. albicans* sledovaná v čase 43 hodin na médiu YNB-gal

C. parapsilosis vytvářela na tomto médiu v přítomnosti pseudomonády shluky, které nebyly patrné v kontrolní kultuře (obr. 16). Jednotlivé buňky zde nemají ostré ohraničení – je možné, že kandidy již v těchto kulturách nebyly životaschopné.

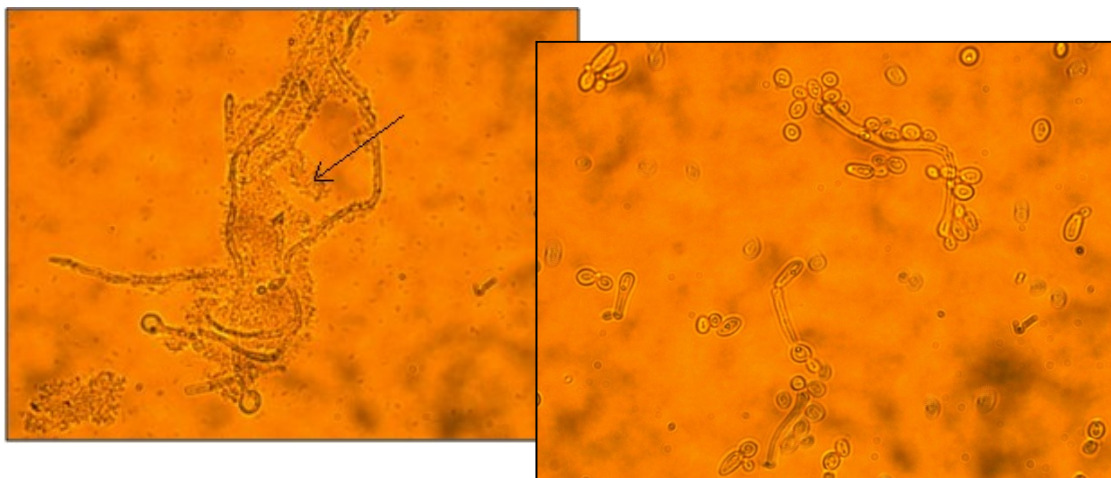


obr. 16: směsná kultura *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa* a kontrolní kultura *C. parapsilosis* sledované v čase 24 hodin na médiu YNB-gal

3.2.3. Minimální médium- M9

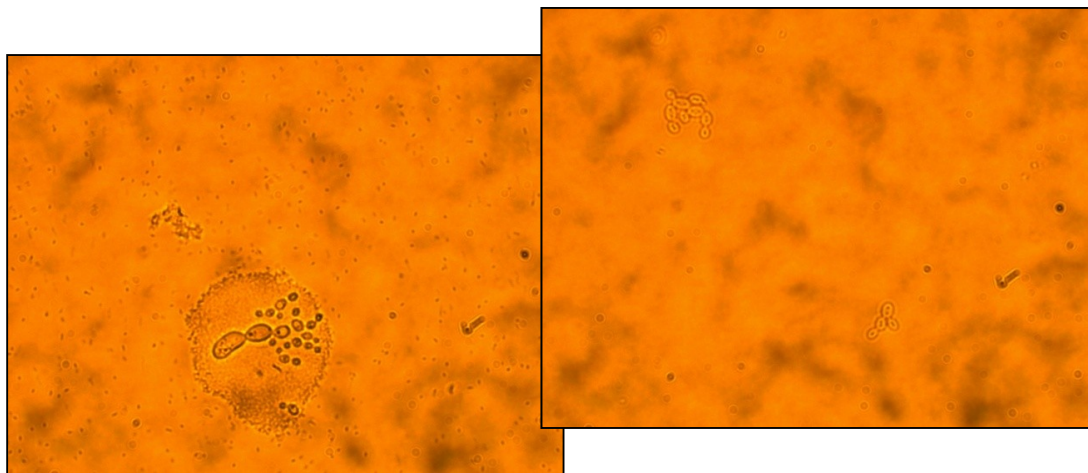
Ve směsné kultuře na minimálním médiu pozorujeme dlouhá a početná hyfální uskupení *C. albicans*. Optická denzita v těchto kulturách dosahuje obecně velmi nízkých hodnot. Na obr. 17 (str. 37) z pozdní stacionární fáze kultivace opět pozorujeme

neostře ohraničené shluky kolem hyf (označení šipkou), které v kontrolní kultuře nepozorujeme. Domníváme se, že by se mohlo jednat o pozůstatky buněk, ale nemáme proto žádné důkazy.



obr. 17: směsná kultura *C. albicans* a *P. aeruginosa* a kontrolní kultura *C. albicans* sledované v čase 17 hodin na M9 médiu, šipka označuje shluky neznámého původu

Ve směsné kultuře *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa* nacházíme již v exponenciální fázi růstu místo obvyklých buněk kulovitého tvaru běžných v kontrolní kultuře jen malé množství deformovaných buněk kandid (viz obr. 18).



obr. č. 18: směsná kultura *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa* a kontrolní kultura *C. parapsilosis* sledované v čase 17 hodin na M9 médiu

3.3. Test přežití kandid v kulturách

Abychom mohly alespoň semikvantitativně určit, kolik buněk kandid přežilo ve směsných kulturách na jednotlivých médiích, roztíraly jsme na povrch agarů s obsahem

antibiotik vzorky kultur a po inkubaci jsme počítaly počet CFU (colony forming unit) na agaru.

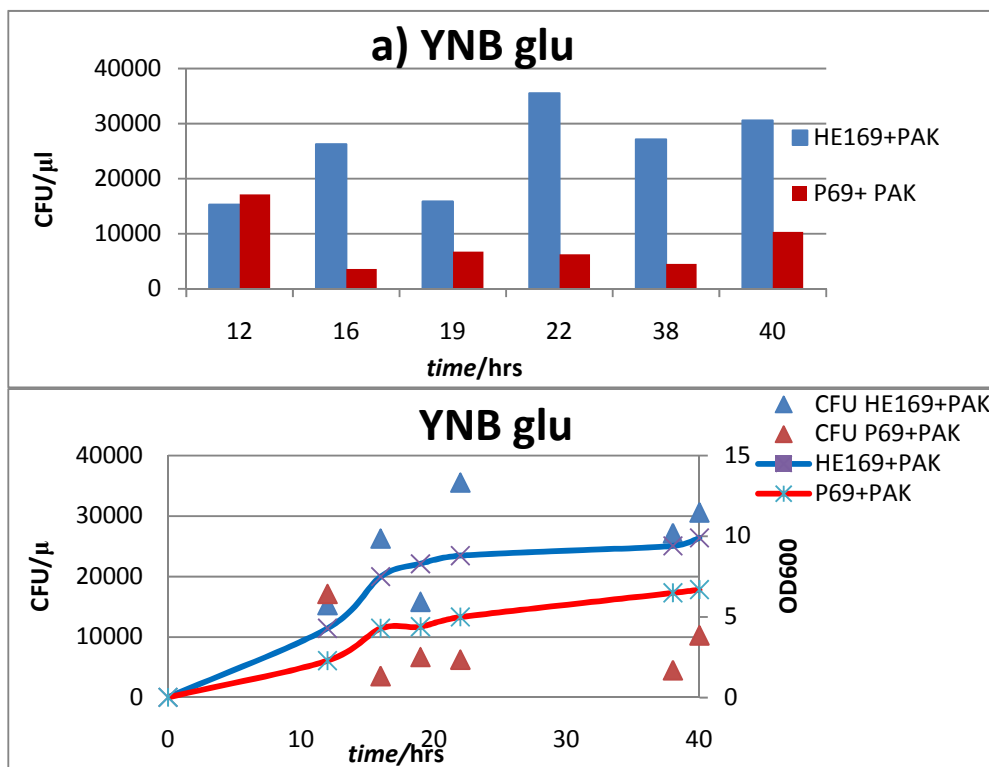
Metodu jsme musely postupně optimalizovat- roztírání koncentrovanějších kultur na povrch agaru většinou končilo příliš hustým nárůstem kolonií. I v případě, že bylo možné tyto kolonie spočítat, byly výsledky v porovnání s méně koncentrovanými vzorky téže kultury často dosti odlišné. Rozhodly jsme se tedy pracovat raději s daty získanými vyšším ředěním kultur, protože jsme braly v úvahu i fakt, že kandidy mohou být v hustých nárůstech limitovány nedostatkem živin.

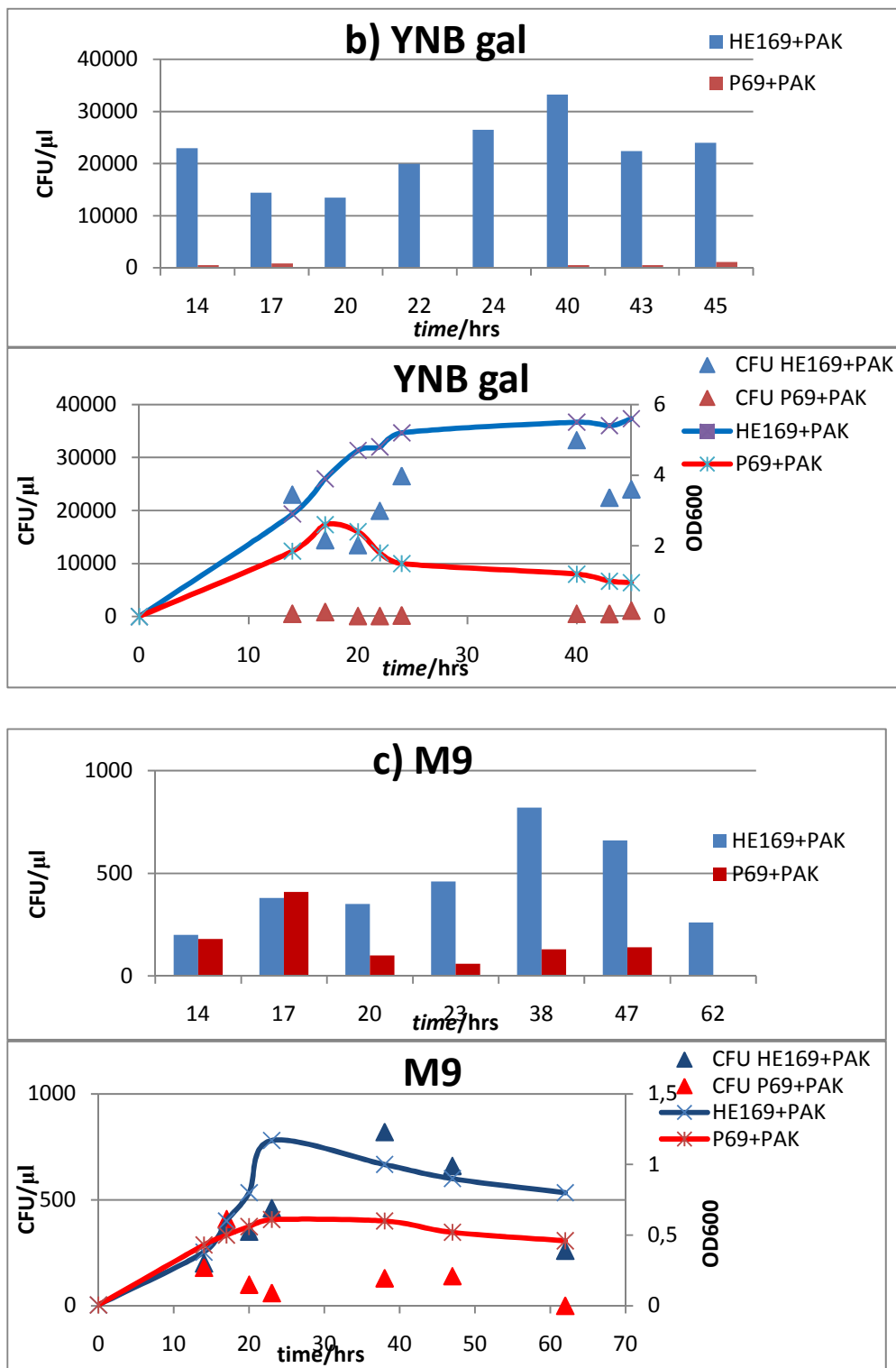
Obr. 19 (str. 39-40) ukazuje časovou závislost počtu kandid v 1 μ l kultury. Porovnáním s růstovou křivkou pro konkrétní kultivace lze vyvodit konkrétní závěry. V první řadě lze s určitostí říct, že ***C. albicans* přežívá ve směsných kulturách s pseudomonádou mnohem lépe, než *C. parapsilosis***. Průběh časové závislosti životnosti *C. albicans* ve směsné kultuře s *P. aeruginosa* se dá v podstatě považovat za očekávaný- nejvyšší hodnoty nacházíme v exponenciální fázi a závislost v zásadě odpovídá růstové křivce. Naproti tomu, ve směsné kultuře pseudomonády a *C. parapsilosis*, v médiích YNB-gal a M9, můžeme sledovat minimální podíl kvasinky na růstové křivce. To znamená, že za výslednou optickou denzitu, kterou jsme v médiu naměřily, zodpovídají hlavně buňky *P. aeruginosa*. V případě média YNB-glu je vyhodnocení složitější, zejména pro *C. parapsilosis*. Během kultivace dochází k fluktuacím počtu buněk kandid, což jsme zatím nedokázaly uspokojivě vysvětlit. V exponenciální fázi je nalezených kolonií spíše méně a na konci kultivace dochází často k prudkému nárůstu (viz tab. 1, str. 41).

Je samozřejmě možné i to, že tyto nejasnosti jsou způsobeny chybou metody. Tento experiment byl pro každé médium proveden jednou v plném rozsahu a poté byla provedena ještě dvě další měření, při nichž byly vyhodnoceny pouze vzorky prvního a posledního časového bodu kultivace. Porovnání ukazuje, že tento experiment je zatížen velkou chybou (viz tab. 1, str. 41). Spočítaly jsme pro všechny kultivace procentuální změnu (přírůstek/úbytek) počtu kolonií mezi prvním a posledním časovým bodem experimentu. Při kultivaci *C. albicans* a *P. aeruginosa* dosahují vždy alespoň dva ze tří takto spočtených přírůstků podobných hodnot. Na médiu YNB-glu je dokonce reálné spočítat průměrnou hodnotu přírůstku, která činí $108 \pm 14 \%$ ($s_r = 6 \%$). Pro směsné kultury *P. aeruginosa* s *C. albicans* nám tedy tato metoda poskytuje určitou představu o možnostech přežití kvasinky vedle bakterie. Na příklad na médiu YNB-gal vidíme pokles počtu kolonií v čase

43 hodin a mikroskopické snímky nám zároveň ukázaly, že v tomto čase došlo k morfologické změně *C. albicans* z kvasinkové formy na hyfální. Vzhledem k tomu, že hyfální forma narozdíl od kvasinkové je pseudomonádou napadána, je úbytek počtu kolonií *C. albicans* v čase 43 hodin zcela logický a dobře koresponduje s mikroskopickým pozorováním.

Naproti tomu, chování *C. parapsilosis* se zdá být mnohem složitější. Spočtené hodnoty přírůstku se i ve srovnatelných kultivacích liší až o několik řádů. Zatím jsme nedokázaly vysvětlit, proč tomu tak je. I když předpokládáme, že se nemusí jednat pouze o chybu metody, jsme si vědomy řady faktorů, které přesnost provedení a vyhodnocení experimentu výrazně snižují. Jedná se na příklad o buněčnou hustotu inokula (počet kolonií bude jiný již na samém počátku kultivace), kvalitu agaru s obsahem antibiotik, přítomnost vláknité formy kandidy v kultuře (chuchvalce hyf se špatně pipetují), přítomnost kontaminantu rezistentního na tato antibiotika a jiné faktory.





obr. 19 – graf (a,b,c): Přežití kandid ve směsných kulturách v médiu a) YNB-glu b) YNB-gal c) M9. V horní části panelu je vždy časová závislost počtu kolonií v 1μl směsné kultury při kultivaci, v dolní části porovnání počtu kolonií kandid s růstovými křivkami směsných kultur. Modrá barva značí směsné kultury *P. aeruginosa* a *C. albicans*, červená pak směsné kultury *P. aeruginosa* a *C. parapsilosis*.

CFU/ μ l				
YNB glu	série/čas	12 h	40 h	% nárůst (+)/ úbytek (-)
<i>C. a. + PAK</i>	1. kultivace	15290	30600	100
	2. kultivace	22540	47600	111
	3. kultivace	18600	38600	108
<i>C. p. + PAK</i>	1. kultivace	17170	10320	-40
	2. kultivace	1440	16210	1026
	3. kultivace	5850	40000	584
YNB gal	série/čas	14 h	45 h	
<i>C. a. + PAK</i>	1. kultivace	22980	24000	4,4
	2. kultivace	36640	124000	238
	3. kultivace	26920	122000	353
<i>C. p. + PAK</i>	1. kultivace	520	1140	119
	2. kultivace	3020	101400	3258
	3. kultivace	5240	64800	1137
M9	série/čas	14 h	62 h	
<i>C. a. + PAK</i>	1. kultivace	200	260	30
	2. kultivace	2150	1170	-45
	3. kultivace	2140	230	-89
<i>C. p. + PAK</i>	1. kultivace	180	0	-100
	2. kultivace	2750	3400	24
	3. kultivace	3840	5610	46

tab. 1: Počet CFU (colony-forming unit) kandid v 1 μ l směsné kultury v daném časovém bodě. *C. albicans* + *P. aeruginosa*, *C.a.* + *PAK*; *C. parapsilosis* + *P. aeruginosa*, *C.p.* + *PAK*. Procento určuje přírůstek/úbytek počtu kolonií v druhém časovém bodě.

3.4. Barva supernatantů

Protože předmětem naší práce bylo vytvořit podmínky pro zahájení rozsáhlejšího výzkumu interakcí kandid s pseudomonádou, zaznamenávaly jsme i různá empirická pozorování, jako na příklad zbarvení médií během kultivace. Barva se odvíjela od typu použitého média a stala se tak jedním z poznávacích znaků kultur, stejně jako na příklad specifická vůně. V průběhu kultivace měla média různou barvu, některé kultury obsahující *P. aeruginosa* měly až zelenomodré zbarvení (neuvedená data) způsobené s největší pravděpodobností sekretovaným barvivem pyocyaninem (viz 1.4.3.2.). Konečné zbarvení supernatantů po ukončení kultivace je popsáno v tab. 2. (str. 42) Z tabulky vyplývá, že v následujících experimentech by bylo přínosné stanovit barvivo

pyocyanin ve směsných kulturách kandid a *P. aeruginosa*, na příklad podle metody Brand et al. [26].

KULTURA	YNB-glu	YNB-gal	M9
<i>C. albicans</i>	sv.žlutá	sv.žlutá	bezb.
<i>C. parapsilosis</i>	žlutá	žlutá	bezb.
<i>P. aeruginosa</i> (PAK)	oranžová	sv.žlutá	nažloutlá
<i>C.albicans</i> + PAK	žlutá	oranžová	nažloutlá
<i>C.parapsilosis</i> + PAK	oranžová	sv.oranžová	nažloutlá

tab. 2: Barva médií po odstranění buněčného materiálu

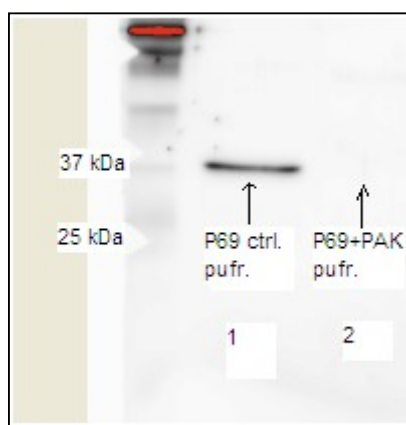
3.5. Sapp v médiích

Test na přítomnost sekretovaných aspartátových proteínas *C. parapsilosis* metodou Western blot byl proveden díky tomu, že Sapp jsou dlouholetým předmětem výzkumu v naší laboratoři, a tak jsme měly k dispozici králičí polyklonální protilátky proti třem isoenzymům Sapp. Analyzovaly jsme zahuštěné vzorky médií po ukončení jednotlivých kultivací (2.3.4.). Uvádím pouze výsledky pro média YNB-glu a M9, protože výsledky analýzy média YNB-gal nebyly jednoznačné.

3.5.1. YNB-glu

Na obr. 20 (str. 43) vidíme Western blot médií kontrolní *C. parapsilosis* a směsné kultury *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa*, analyzované pomocí protilátek proti celé molekule Sapp1p, které reagují i s isoenzymy Sapp2p a Sapp3p. Kontrolní kultura *C. parapsilosis* sekretuje některou z proteas Sapp1p až Sapp3p, zatímco ve směsné kultuře jsme žádnou z těchto molekul nedetekovaly. Podle mikroskopických snímků rostla *C. parapsilosis* ve směsné kultuře velmi špatně. Tomu odpovídá i výsledek SDS-PAGE – pokud *C. parapsilosis* sekretovala nějaké enzymy, pak v příliš malé míře na to, abychom byly schopny je detekovat a všechny proteiny nalezené SDS-PAGE ve směsné kultuře *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa* byly shodné s proteiny v kontrolní kultuře *P. aeruginosa* (viz 3.6.1., obr. 22).

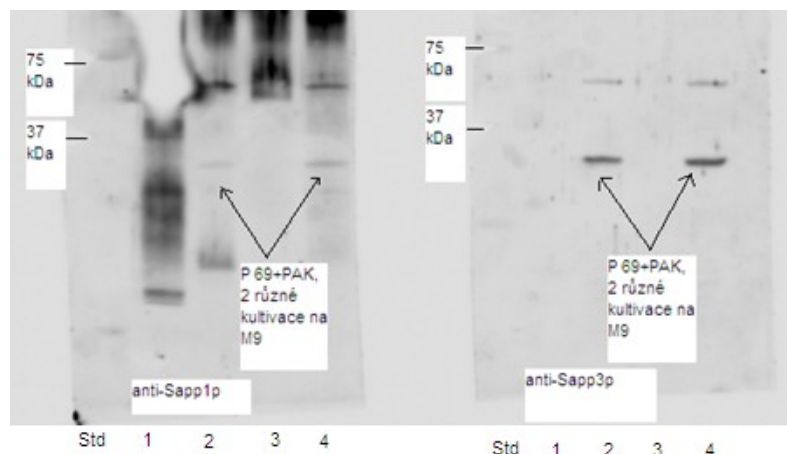
Vzhledem k tomu, že jsme ve směsné kultuře nepozorovaly žádné proteínasy, netestovaly jsme vzorky dále na přítomnost jednotlivých isoenzymů Sapp.



obr. 20: výsledek Western blotu s využitím polyklonálních králičích protilátek proti všem isoenzymům Sapp- vzorky z média YNB-glu
 1- *C. parapsilosis* kontrola, 2- *C. parapsilosis* +*P. aeruginosa*

3.5.2. Minimální médium- M9

Naopak, na minimálním médiu M9 jsme zaznamenaly proteinasy ve směsných kulturách, proto jsme zjišťovaly, které konkrétní isoenzymy jsou v médiích přítomny. Na obr. 21 (str. 44) je vidět, že ve směsných kulturách se vyskytují proteinasy Sapp1p a Sapp3p, zatímco v kontrolních kulturách jsme jejich přítomnost nezaznamenaly. Test na přítomnost Sapp2p byl negativní pro všechny vzorky minimálního média (neuvedená data). Co se týče isoenzymu Sapp3p, existuje předpoklad, že ve skutečnosti není kandidou sekretován. Pokud by pseudomonáda byla příčinou menší životnosti *C. parapsilosis*, bylo by možné, že se enzym snadněji uvolní z poškozené buňky do média. Přítomnost isoenzymu Sapp1p ve směsné kultuře je pozoruhodná, a to ze dvou důvodů. Jednak *C. parapsilosis* na M9 roste velmi málo, a proto by bylo možné očekávat, že i sekrece proteinas bude velmi omezená, podobně jako je tomu na médiu YNB-glu v přítomnosti *P. aeruginosa*. Za druhé, je známo, že produkce isoenzymu Sapp1p je indukována přítomností exogenního proteinu v kultuře a tento předpoklad v minimálním médiu naplněn nebyl. Proto bude vhodné věnovat v budoucnu pozornost právě indukci Sapp v *C. parapsilosis* v přítomnosti *P. aeruginosa* právě v minimálních médiích.



obr. 21: výsledek Western blotu s využitím králíčích polyklonálních protilátek proti Sapp1p a Sapp3p- vzorky z minimálního média M9
Std- standard Kaleidoscope, 1- *C. parapsilosis* kontrola (1. kultivace), 2- *C. parapsilosis* +PAK (1. kultivace), 3- *C. parapsilosis* kontrola (2. kultivace), 4.- *C. parapsilosis* +PAK (2. kultivace)

3.6. Výsledky stanovení N-terminální sekvence proteinů sekretovaných do médií

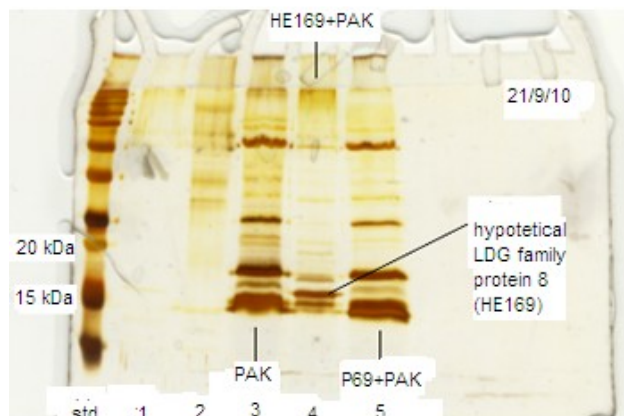
Z široké škály proteinů nalezených v různých vzorcích zahuštěných supernatantů ze tří médií byly přednostně analyzovány ty, které se nacházely pouze ve směsných kulturách a u kterých lze předpokládat, že souvisejí se vzájemnou interakcí bakterie a kvasinky. Zde je výčet nalezených proteinů z různých kultivací – na následujících obrázcích jsou zobrazeny výsledky SDS-PAGE, proteiny jsou obarveny stříbrem [64]. Aminokyselinové sekvence byly porovnány s genomovými databázemi kandid a pseudomonády a s databází NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.6.1. YNB-glu

Kultivace v tomto médiu byla několikrát opakována a výsledky SDS-PAGE se pro jednotlivé kultivace v médiu YNB-glu velmi liší. Příčina tohoto jevu nám není známa.

Na obr. 22 (str. 45) vidíme výsledky první kultivace. Ve směsné kultuře *C. albicans* a pseudomonády byl nalezen protein, který se nenacházel v žádném z kontrolních vzorků. Bylo zjištěno, že se jedná o hypotetický protein č. 8 z rodiny LDG z *C. albicans* (viz tab. 3, str. 49). Kompletní proteinová sekvence obsahuje o 20 aminokyselin více, než protein nalezený v našem vzorku. Tento úsek je lokalizován na N-konci proteinu a je pravděpodobné, že se jedná o signální peptid (v tab. 3, str. 49 jsou uvedeny N-koncové sekvence, které byly získány sekvenací a porovnávány s genomovými databázemi). Podle literatury byl protein LDG8 již dříve identifikován v sekretovaných

materiálech *C. albicans*- v biofilmu a klasických kulturách [57], jinak o něm však není mnoho známo.

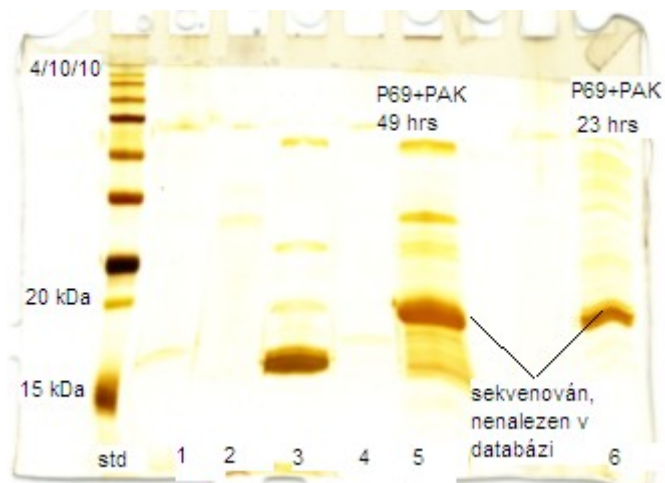


obr. 22: SDS PAGE vzorků z YNB-glukózového média (1).

std- standard Kaleidoscope, 1- *C. albicans* (HE 169) kontrola, 2- *C. parapsilosis* (P 69) kontrola, 3- *P. aeruginosa* (PAK) kontrola, 4- směsná kultura *C. albicans* +PAK, 5-směsná kultura *C. parapsilosis* +PAK

Proteiny nalezené v kultivačním médiu směsné kultury pseudomonády a *C. parapsilosis* byly totožné s proteiny kontrolní kultury bakterie, *C. parapsilosis* tak zřejmě nesekretovala žádné proteiny detekovatelné metodou SDS-PAGE ve sledovaném rozsahu molekulových hmotností (viz 3.5.1.).

Na obr. 23 (str. 46) je označen protein, který se vyskytoval pouze ve směsné kultuře *C. parapsilosis* a *P. aeruginosa* během 2. kultivace na médiu YNB-glu. Sekvence zde byla provedena, ale příslušný protein bohužel nebyl následně nalezen v databázi. Na médiu YNB-glu z různých kultivací se nalezené proteiny lišily- protein 8 z rodiny LDG byl na příklad nalezen ve vzorku z první kultivace, ve vzorku z druhé ani třetí kultivace se ale již nenacházel.

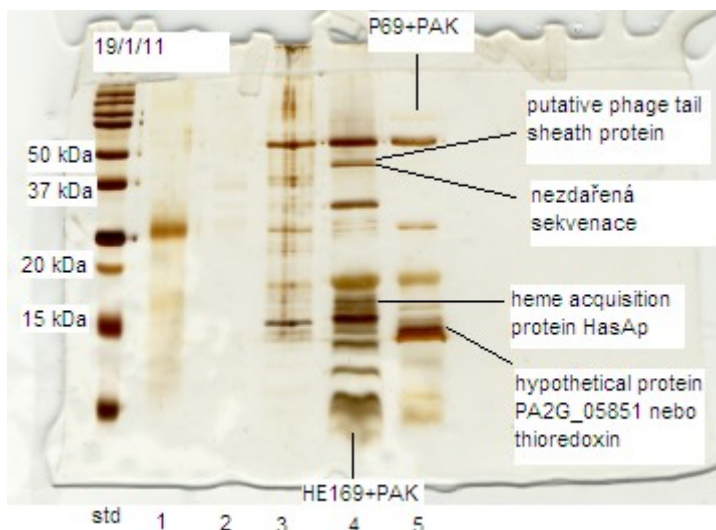


obr. 23: SDS PAGE vzorků z YNB-glukózového média (2) standard Kaleidoscope, 1- *C. albicans* (HE 169) kontrola, 2- *C. parapsilosis* (P 69) kontrola, 3- *P. aeruginosa* (PAK) kontrola, 4- směsná kultura *C. albicans* +PAK, 5- směsná kultura *C. parapsilosis* +PAK (po 49 h kultivace), 6- *C. parapsilosis* +PAK (po 23 hod kultivace)

Ve vzorcích ze třetí kultivace bylo nalezeno hned několik enzymů *P. aeruginosa* ve směsné kultuře s *C. albicans* (obr. 24, str. 47). Jednalo se na příklad o „putative phage tail sheath protein“ (*P. aeruginosa* 39016) (viz tab. 3, str. 49), který je strukturně příbuzný s proteiny, které nacházíme na bakteriofázích- podobné proteiny u gram-negativních bakterií slouží k transportu proteinů přes buněčnou stěnu a někdy také do hostitelské buňky [58].

„Heme acquisition protein HasAp“ (*P. aeruginosa* PA7) (viz tab. 3, str. 49) je sekretovaný protein, který má specifickou oblast se schopností vázat hem. Bakterie ho využívá především v situacích, kdy postrádá železo a to je přítomno v okolí právě v podobě hemu [59].

Thioredoxin (*P. aeruginosa* PA7) (viz tab. 3, str. 49) byl nalezen ve směsné kultuře bakterie a *C. parapsilosis*. Je to významný antioxidant, je tedy sekretován v odpovědi na oxidativní stres – ten může být vyvolán na příklad přítomností těžkých kovů.



obr. 24: SDS PAGE vzorků z YNB-glukózového média (3)

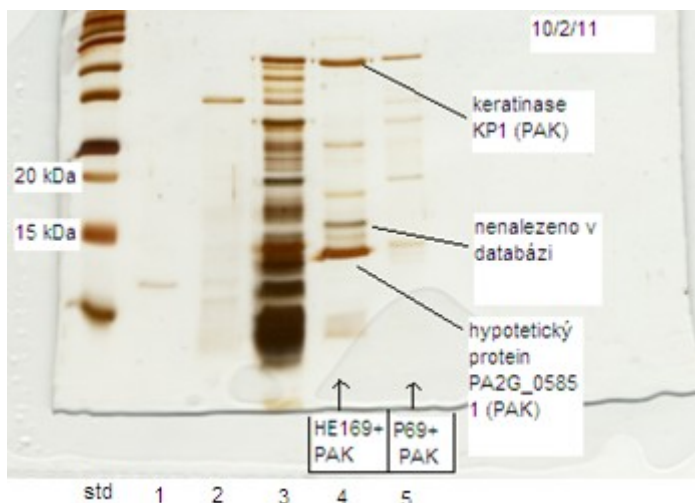
std- standard Kaleidoscope, 1- *C. albicans* (HE 169) kontrola, 2- *C. parapsilosis* (P 69) kontrola, 3- *P. aeruginosa* (PAK) kontrola, 4- směsná kultura *C. albicans* +PAK, 5- směsná kultura *C. parapsilosis* +PAK

3.6.2. YNB-gal

Na médiu YNB-gal se výsledky mezi jednotlivými kultivacemi také lišily. Na obr. 25 (str. 48) je výsledek druhé kultivace, první kultivace nepřinesla žádné důležité výsledky. Dva proteiny nalezené ve směsné kultuře *C. albicans* a pseudomonády na tomto obrázku se ve výsledcích první kultivace v tomto médiu vůbec nenacházely nebo byla jejich přítomnost neprůkazná.

Jeden z proteinů byl zpočátku považován za LDG family protein, bohužel N-koncová sekvence aminokyselin tomu neodpovídala a protein nebyl nalezen v databázi.

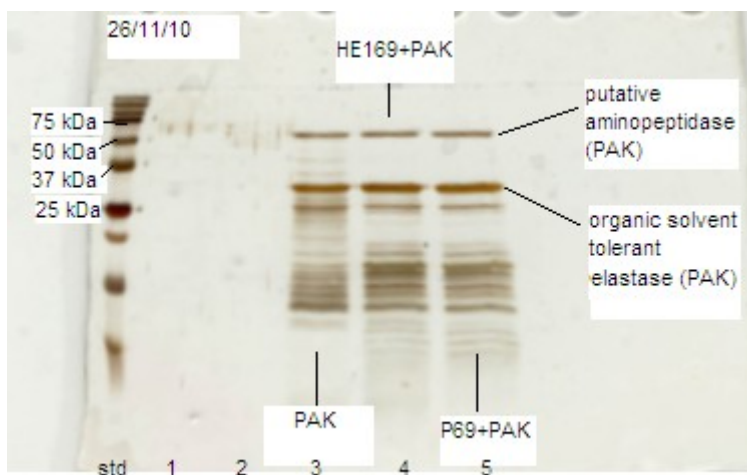
Dalším z nalezených enzymů je bakteriální keratinasa KP1 (*P. aeruginosa* strain KS-1). *P. aeruginosa* dokáže degradovat různé substráty jako β -keratin, želatinu nebo fibrin. Substráty keratinas jsou obecně struktury typu vlasů, peří a jiných kožních derivátů a to řadí keratinasy do speciální třídy proteas. O dalším nalezeném hypotetickém proteinu PA2G_05851 (*P. aeruginosa* 2192) nebyly zjištěny žádné bližší informace (obr 25, str. 48).



obr. 25: SDS PAGE vzorků z YNB-galaktózového média (2)
std- standard Kaleidoscope, 1- *C. albicans* (HE 169) kontrola, 2- *C. parapsilosis* (P 69) kontrola, 3- *P. aeruginosa* (PAK) kontrola, 4- směsná kultura *C. albicans* +PAK, 5- směsná kultura *C. parapsilosis* +PAK

3.6.3. Minimální médium- M9

Při kultivacích na minimálním médiu byla sekrece proteinů poměrně konstantní a výsledky všech kultivací byly téměř shodné. Směsné kultury ovšem obsahovaly pouze proteiny totožné s proteiny v kontrolním vzorku *P. aeruginosa* (viz obr. 26). Pomocí Western blotu jsme sice našly v těchto směsných kulturách isoenzymy Sapp, což naznačuje, že v médiu mohou být přítomny proteiny sekretované kvasinkou *C. parapsilosis*. Jejich koncentrace je však natolik nízká, že běžnou SDS-PAGE je nezachytíme.



obr. 26: SDS PAGE vzorků z minimálního média
std- standard Kaleidoscope, 1- *C. albicans* (HE 169) kontrola, 2- *C. parapsilosis* (P 69) kontrola, 3- *P. aeruginosa* (PAK) kontrola, 4- *C. albicans* +PAK, 5- *C. parapsilosis* +PAK

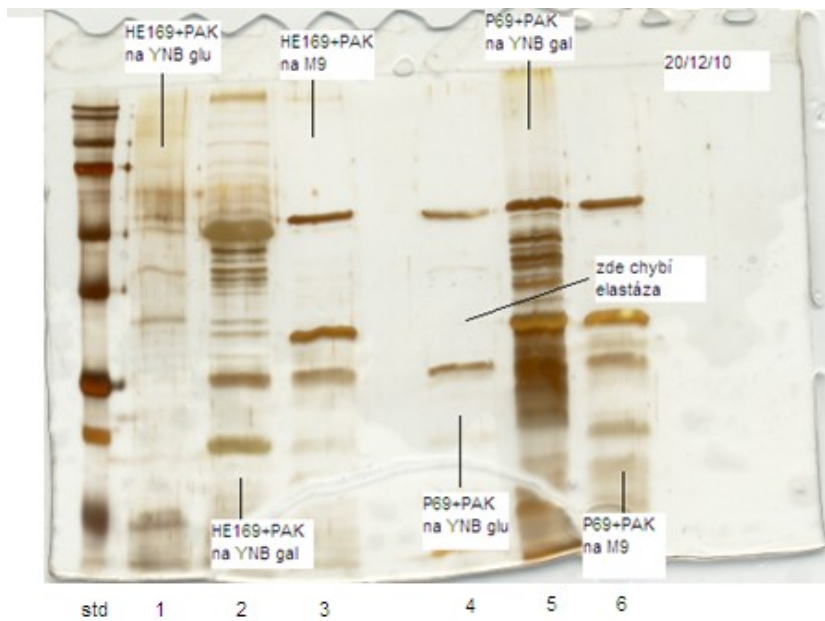
Pravděpodobnou příčinou vysokého zastoupení bakteriálních proteinů ve vzorcích minimálního média je fakt, že kandidy rostou na M9 poměrně špatně.

Dominantními enzymy vyskytujícími se ve většině kontrolních kultur *P. aeruginosa* a také v několika směsných kulturách je aminopeptidasa (*P. aeruginosa* 39016) a elastasa (Zn metaloproteasa, *P. aeruginosa* strain K). V tab. 3 si můžeme povšimnout, že N-koncová sekvence aminopeptidasy je totožná se sekvencí keratinasy. Není zcela jasné, zda se ve skutečnosti nejedná o totožné proteiny, protože jsou si dost podobné i svými molekulovými hmotnostmi. Jedná se však o enzymy s podobnou funkcí, neboť i keratinasa patří mezi předpokládané aminopeptidasy [60]. Elastasa je jedním z faktorů virulence bakterie (1.3.5.3.). Ovšem, vzhledem k tomu, že se oba enzymy nacházejí i v kontrole, nelze předpokládat, že by konkrétně jejich sekrece byla vyvolána přítomností kandidy.

Název proteinu/ORF	N-koncová sekvence	počet aminokyselin	molekulová hmotnost[kDa]
hypotetický protein č. 8 z rodiny LDG/CaO19.3499	LRTVTLKTFGYPPPQ	167	18,33
putative phage tail sheath protein/PA39016_004010029	SFFHQVTVTNVD	386	41,18
heme acquisition protein HasAp/PSPA7_1721	SISISYSTTYSG	205	20,85
thioredoxin/PSPA7_5983	SEHIVNVTD	108	11,81
hypotetický protein /PA2G_05851	GYTLFQYAQDKDY	152	16,81
keratinase KP1/KS-1	FWTPQKPNPSI	531	56,94
organic solvent tolerant elastase/K	AEAGGPGGNQKIG	498	53,54
putative aminopeptidase/PA39016_001300010	FWTPQKPNPSI	536	57,54

tab. 3: Proteiny nalezené sekvenací N-koncového peptidu

Pro sjednocení kultivačních podmínek a eliminaci chyb způsobených různými vnějšími faktory byla provedena ještě jedna kultivace. Zaočkovány byly pouze směsné kultury, a to do všech tří médií. Z této kultivace bylo získáno 6 vzorků, jejichž charakter můžeme posoudit na obr. 27 (str. 50).



obr. 27: SDS PAGE směsných vzorků ze všech médií
std- standard Kaleidoscope, 1- *C. albicans* +PAK (YNB-glu), 2- *C. albicans* +PAK (YNB-gal),
 3- *C. albicans* + PAK (M9), 4- *C. parapsilosis* +PAK (YNB-glu) 4- *C. parapsilosis* +PAK
 (YNB-gal) 4- *C. parapsilosis* +PAK (M9)

Z tohoto obrázku lze vyčíst, že enzym elastasa se v mnohem větší míře vyskytuje v kulturách *C. parapsilosis*. Jedinou výjimkou je médium YNB-glu, kde tento enzym vůbec nepozorujeme.

4. DISKUZE

Smyslem předkládané práce bylo nalezení praktických podmínek pro zahájení projektu zabývajícího se studiem interakcí dvou druhů patogenních kandid s bakterií *P. aeruginosa*. Testování metodických postupů položilo základ pro nové téma a nyní z něj můžeme odvíjet další experimentální činnost. Na příklad, v případě mikroskopických snímků jsme si udělaly hrubý obraz zejména o kvalitativní stránce přežití mikroorganismů ve směsných kulturách. V případě výskytu hyfální formy *C. albicans* ve směsné kultuře s *P. aeruginosa* jsme pozorovaly podobné struktury jako Brand a spol., jejichž mikroskopické snímky jasně zobrazovaly adhezi pseudomonády na povrch *C. albicans* [26]. Protože ale máme řadu nejasností ohledně původu některých pozorovaných struktur a shluků, mohly bychom v mikroskopii využít metody, které by umožnily přesněji identifikovat předmět našeho zájmu, na příklad barvení za účelem zjištění některého z typů buněčné smrti kvasinek.

Stejně tak, díky semikvantitativní analýze počtu kolonií kandid ve směsných kulturách, máme jistou představu o rozdílu v životnosti mezi *C. albicans* a *C. parapsilosis*, ale zároveň neznáme příčinu toho, proč se *C. albicans* dokáže pseudomonádě ubránit lépe, než *C. parapsilosis*. Metody této analýzy jsme převzaly od Brand a spol. [26], kteří takto zkoumaly rozdílnou životaschopnost hyfální a kvasinkové formy *C. albicans* v přítomnosti *P. aeruginosa*. Používali dva typy médií, z nichž první indukovalo růst kandidy v podobě blastospor a druhé bylo vhodné k růstu hyfální formy. My jsme ale také objevily různé morfologické formy na námi testovaných médiích – při kultivaci na médiích YNB jsme pozorovaly blastospor, na minimálním médiu zase hyfy *C. albicans*, a to jak ve směsných kulturách s *P. aeruginosa*, tak i v kontrolních kulturách *C. albicans*. Porovnáme-li výsledky Brand a spol. a naše výsledky, můžeme potvrdit, že životnost *C. albicans* je ve směsné kultuře v minimálním médiu o poznání nižší, než v médiích YNB, ačkoli naše kultivace probíhaly v užším časovém horizontu. Je to jediné médium, na kterém jsme zaznamenaly úbytek životaschopných buněk v koncovém bodu kultivace (ve dvou ze tří měření).

Hypotetický protein 8 z genové rodiny *LDG*, který jsme analyzovaly ve směsné kultuře *P. aeruginosa* a *C. albicans* a který je sekretován *C. albicans*, by nám mohl pomoci odhalit příčiny vyšší životaschopnosti *C. albicans* ve směsné kultuře s *P. aeruginosa* oproti *C. parapsilosis*. Další postupy by tak mohly zahrnovat expresi genu *LDG 8* v *C. parapsilosis* s využitím plazmidu s galaktózovým promotorem. Na druhou stranu nás však limituje fakt,

že tento protein byl námi zatím nalezen pouze v jediné kultivaci a navíc neznáme jeho funkci. Je zásadní nalézt vhodné kultivační podmínky, abychom mohly protein opět identifikovat a lépe mu porozumět. Thomas a spol. se ve své práci již s tímto proteinem setkali, možná by tedy bylo užitečné zvolit podobné kultivační podmínky a další metodické postupy využité v jejich experimentu [57].

Pro tento typ výzkumu se také nabízí možnost využití DNA čipů ke sledování genové exprese kandid ovlivněné přítomností bakterie. Tato metoda by výrazně pomohla najít rozdíl v genové expresi ve směsných a kontrolních kulturách a usnadnila by tak odhalení faktorů odpovědných za obranu před pseudomonádou. Problém sledování exprese by se však mohl vyskytnout, pokud bychom nebyly schopny oddělit bakteriální buňky od buněk kandid. Tuto situaci bychom mohly obejít, pokud by se nám podařilo udržet buňky kandid a bakterie oddělené vhodnou membránou již během kultivace. Pokud by se však ukázalo, že významnou roli v interakci obou kandid s *P. aeruginosa* hraje přímý kontakt buněk a adheze bakterie na povrchové struktury kandid, pak by tato metoda nebyla vhodná ke sledování genové exprese. Jinou možností je izolace buněk *C. albicans* v klíčovém okamžiku kultivace, kdy dochází k vymizení pseudomonády v kultuře nebo využití gradientové centrifugace, která by zaručila oddělení buněk pseudomonády a kandid.

5. ZÁVĚR

- V rámci našeho sledování interakce *P. aeruginosa* s *C. albicans* a *C. parapsilosis* jsme testovaly tři různá kultivační média a zjistily, že všechna tři jsou vhodná pro studium vzájemných interakcí obou mikroorganismů.
- Mikroskopické snímky, konstrukce růstové křivky a test přežití kandid ukazuje, že životnost *C. albicans* je v přítomnosti *P. aeruginosa* vyšší, než životnost *C. parapsilosis*. Potvrdily jsme ovšem zvýšenou citlivost hyfální formy *C. albicans* na přítomnost pseudomonády.
- Odhalily jsme mnohé sekretované enzymy včetně izoenzymů sekretovaných aspartátových proteinas *C. parapsilosis* (Sapp) a enzymů bakterie *P. aeruginosa*, které jsou, nebo by mohly být potenciálními virulenčními faktory (elastasa).
- Nalezly jsme a identifikovaly jediný protein, který byl sekretován do média kandidou (*C. albicans*) pouze ve směsných kulturách s *P. aeruginosa*. Tento protein je hypotetickým proteinem č. 8 z genové rodiny *LDG* a jeho funkce je prozatím neznámá.

6. SEZNAM LITERATURY

1. Kocková-Kratochvílová, A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Alfa, Bratislava (1990)
2. Šipický, M., Šubík, J.: Genetika kvasiniek. VEDA, Bratislava (1992)
3. Bednář, M., rod *Candida* v knize Lékařská mikrobiologie, Marvil, Praha, str. 352-355 (1996)
4. Calderone, R.A.: *Candida* and candidiasis. ASM Press, Washington (2002)
5. Kocková-Kratochvílová, A.: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Alfa, Bratislava (1982)
6. De Sordi, L., Muhlschlegel, F., A.: FEMS yeast research 9, 990-999 (2009)
7. Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D.: Clinical Microbiology Reviews 21, 606-625 (2008)
8. Hube, B., Naglik, J.: Microbiology 147, 1997-2005 (2001)
9. Berman, J., Sudbery, P. E.: Nature 3, 918-930 (2002)
10. Laffey, S.F., Butler, G.: Microbiology 151, 1073-1081(2005)
11. Poikonen, E., Lyytikäinen, O., Anttila, V., Koivula, I., Lumio, J., Kotilainen, P., Syrjala, H., Ruutu, P.: BMC Infectious Diseases 10, 1-7 (2010)
12. Krcméry, V. Jr., Kovacicová, G.: Diagnostic Microbiology Infectious Disease 36 7-11 (2000)
13. Trick, W. E., Fridkin, S. K., Edwards, J. R., Hajjeh, R. A., Gaynes, R. P.: Clinical Infectious Diseases 35, 627-630 (2002)
14. Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., Filler, S. G. Jr, Hube, B.: PLoS Pathogens 4, 1-17 (2008)
15. Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A.: Infection and Immunity 70, 878-888 (2002)
16. Gácsér, A., Trofa, D., Schäfer, W., Nosanchuk, J. D.: The Journal of Clinical Investigation 117, 3049-3058 (2007)
17. Butler et al.: Nature 459, 657-662 (2009)
18. Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S. H., Zhao, X.: Medical Mycology 46, 1-15 (2008)
19. Staab, J. F., Sundstrom, P.: Yeast 14, 681-686 (1998)
20. Sonneborn, A., Tebarth, B., Ernst, J. F.: Infection and Immunity 67, 4655-4660 (1999)
21. Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., Soll, D. R.: Journal of Bacteriology 169, 189-197 (1987)
22. Nigam, S., Ciccoli, R., Ivanov, I., Sczepanski, M., Deva, R.: Current Microbiology 2011, 55-63 (2010)
23. Martínez, P. Ljungdahl, P. O.: Molecular and Cellular Biology 25, 9435-9446 (2005)
24. Hrušková-Heidingsfeldová, O., Dostál, J., Majer, F., Havlíková, J., Hradílek, M., Pichová, I.: Biological Chemistry 390, 259-268 (2009)

25. Havlíková, J.: Proteasa Sapp3p *Candida parapsilosis*: bakalářská práce, Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie, str. 37 (2007)
26. Brand, A., Barnes, J.D., Mackenzie, K.S., Odds, C.F., Gow, N.A.R.: FEMS Microbiol Lett 287, 48-55 (2008)
27. Jedličková, A.: Systémové mykózy. MAXDORF s.r.o., nakladatelství odborné literatury, Praha (2006)
28. Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C., Rex, J. H.: Nature Reviews 9, 719-727 (2010)
29. Silva, L., Coutinho, A., Fedorov, A., Prieto, M.: Biophysical Journal 90, 3625-3631 (2006)
30. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Andes, D., Arendrup, M. C., Brown, S. D., Lockhart, S. R., Motyl, M., Perlin, D. S.: Drug Resistance Updates 474, 1-13, (2011)
31. Rehm, B.: *Pseudomonas*: Model organism, Pathogen, Cell factory. Wiley VCH, Weinheim (2008)
32. Toxikon http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/pseudomonas_aeruginosa.php (9/3/11)
33. Govan, J. R. W., Deretic, V.: Microbiological Reviews 60, 539-574 (1996)
34. Prince, A., *Pseudomonas aeruginosa* verstaile attachment mechanisms v knize Bacterial adhesion, Molecular and Ecological Diversity, (Madilyn Fletcher ed.), Wiley Liss, str. 183-199, New York (1996)
35. Davies, J. C.: Pediatric Respiratory Reviews 3, 128-134 (2002)
36. Döring, G., Conway, S. P., Heijerman, H. G. M., Hodson, M. E., Høiby, N., Smyth, A., Touw, D. J.: European Respiratory Journal 16, 749-767 (2000)
37. Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A.: Infection and Immunity 66, 43-51 (1998)
38. Hahn, H. P.: SciVerse 192, 99-108 (1997)
39. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T: Molecular Microbiology 48, 1511-1524 (2003)
40. Hamood, A. N., Griswold, J. A., Duhan, Ch. M.: Journal of Surgical Research 1, 425-432 (1996)
41. Cryz, S. J. jr., Pitt, T. L., Fürer, E., Germanier, R.: Infection and Immunity 44, 508-513 (1984)
42. Iglewski, B. H., Kabat, D.: Proceedings of the National Academy of Sciences 72, 2284-2288 (1975)
43. Iglewski, B. H., Sadoff, J., Bjorn, M. J., Maxwell, E. S.: Proceedings of the National Academy of Sciences 75, 3211-3215 (1978)
44. Berk, R. S., Brown, D., Coutinho, I., Meyers, D. : Infection and Immunity 55, 1728-1730 (1987)

45. Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., Tulkens P. M.: Antimicrobial agents and Chemotherapy 43, 727-737 (1999)
46. Pizzo, P.: Pseudomonas Hospital Practice 26, 18-21(1991)
47. Sykes, R. B., Bonner, D. P., Bush, K., Georgopapadakou, N. H.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 21, 85-92 (1982)
48. Fish, D. N., Choi, M. K., Jung, R.: Journal of Antimicrobial Chemotherapy 50, 1045-1049 (2002)
49. Hamer, D. H.: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 162, 328-330 (2000)
50. Hogan, D. A. Eukaryotic Cell 5, 613-619 (2006)
51. Williams, P., Cámara, M.: Current opinion in Microbiology 12, 182-191 (2009)
52. De Sordi, L., Muhlschlegel, F. A.: Federation of European Microbiological Societies yeast research 9, 990-999 (2009)
53. Weber, K., Schulz, B., Ruhnke, M.: Yeast 27, 727-739 (2010)
54. Rossignol, T., Logue, M. E., Reynolds, K., Grenon, M., Lowndes, N. F., Butler, G.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51, 2304-2312 (2007)
55. Cugini, C., Calfee, M.W. Farro, J.M., Morales, D.K., Pesci, E.C., Hogan, D.A: Molecular Microbiology 65, 896-906 (2007)
56. Price-Whelan, A., Dietrich, L.E.P., Newman, D.K.: Journal of bacteriology 189, 6372-6381 (2007)
57. Thomas, D. P., Bachmann, S. P., Lopez-Ribot, J. L.: Proteomics 6, 5795-5804 (2006)
58. Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzi, S., Burley, S. K., Almo, S. C., Mekalanos, J. J.: Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 4154-4159 (2009)
59. Alontaga, A.Y., Rodriguez, J.C., Schönbrunn, E., Becker, A., Funke, T., Yukl, E.T., Hayashi, T., Stobaugh, J., Moënné-Loccoz, P., Rivera, M.: Biochemistry 48, 96-109 (2009)
60. NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (10/5/11)
61. Uniprot: <http://www.uniprot.org/> (10/5/11)
62. The *Candida* genome database: <http://www.candidagenome.org/> (10/5/11)
63. The *Pseudomonas* genome database: <http://www.pseudomonas.com/> (10/5/11)
64. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular cloning, A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory Press, USA (1989)

