



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studijní obor Biochemie**



**Bc. Lenka Mynářová**

**Studium vzájemných interakcí patogenních kvasinek rodu *Candida* a  
bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v průběhu kokultivací**

**The study of mutual interaction between pathogenic yeasts of the genus  
*Candida* and bacterium *Pseudomonas aeruginosa* during cocultivation**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

**Konzultant: RNDr. Olga Hrušková-Heidingsfeldová, CSc.**

**Praha 2013**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a konzultantky RNDr. Olgy Hruškové-Heidingsfeldové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho cenné rady a připomínky a za pomoc při formálním zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Olze Hruškové-Heidingsfeldové, CSc. za to, že mi poskytla laboratorní zázemí, pomáhala mi řešit problémy spojené s touto prací a vždy mě plně podporovala. Mé díky patří také Prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc., která mi umožnila zrealizovat celý experiment s DNA čipy *C. albicans* a RNDr. Vratislavu Šťovíčkovi, Ph.D., neboť mě naučil všem pracovním postupům nezbytným pro techniku DNA čipů. Dále bych chtěla poděkovat Vladimíru Vrkoslavovi, Ph.D. za významnou pomoc při analýze kultivačních médií.

## ABSTRAKT

Oportunisticky patogenní druhy kvasinek rodu *Candida* jsou častým původcem kvasinkových infekcí člověka. Ačkoli se pozornost dnešní medicíny soustředí spíše na vývoj léku proti rakovině, AIDS nebo Alzheimerově chorobě, není možné opominout ani hrozbu systémových kandidóz. Ty představují velké nebezpečí pro jedince se sníženou imunitou a jsou spojeny s vysokou mortalitou, přičemž terapie je finančně náročná a ne vždy účinná. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* by mohla být jistou inspirací v boji proti patogenním kvasinkám, protože dokáže inhibovat růst nejrozšířenějšího původce rodu *Candida*, *C. albicans*. *P. aeruginosa* jednak produkuje řadu toxických nízkomolekulárních látek a zároveň ne zcela známým mechanismem interaguje s buněčnou stěnou *C. albicans* a tak podporuje její lyzi. Nicméně, koexistence těchto mikroorganismů je také možná a jejich vzájemný vztah záleží na různých faktorech. Tato skutečnost byla zjištěna díky tomu, že některé nemoci a patologické stavy se vyznačují koinfekcí pacienta vyvolanou jak původcem *P. aeruginosa*, tak *C. albicans*.

V této práci jsem studovala mechanismy interakce mezi patogenní kvasinkou *C. albicans* a bakterií *P. aeruginosa* pomocí a) sledování genové exprese *C. albicans* v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* b) analýzy filtrovaných médií obou mikroorganismů a jejich kokultury metodou plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC/MS).

Zjistila jsem, že v kokultuře docházelo ke změnám v expresi 107 genů, které kódují z větší části proteiny s regulační funkcí v transkripci, translaci a modifikaci proteinů, ale exprese se měnila také u genů zodpovědných za biosyntézu buněčné stěny kvasinky (*KRE5*, ortolog *S.c. MNT2*), transport malých molekul (*CDR1*, ortolog *S.c. VBA5*) nebo metabolismus aminokyselin (*ARO2*, *ARO7*) a mnoha jiných. Ve shodě s těmito výsledky odhalila analýza médií GC/MS sníženou produkci autoinduktoru fenethylalkoholu (inhibitor hyfálního růstu *C. albicans*) a zároveň přítomnost neobvyklé oxidované formy jiného autoinduktoru *C. albicans* *E,E*-farnesolu (také inhibitor hyfálního růstu *C. albicans*) v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa*.

## ABSTRACT

The genus *Candida* includes several opportunistically pathogenic species which are common causative agents of the yeast infections in humans. Although current medical research is focused mostly on cancer, AIDS, or Alzheimer disease, the problem of systemic candidiases cannot be neglected. These infections represent a real threat to the immunocompromised patients, they are connected with a high mortality rate and expensive medication with poor prognosis. *Pseudomonas aeruginosa* could be an inspiration in a way of how to eliminate the pathogenic yeasts. The bacterium can inhibit growth of the most common yeast species of the genus *Candida*, *C. albicans*. This effect is based on production of toxic substances by the bacterium and on interaction of the bacterium with the *C. albicans* cell wall, which leads to the lysis of the yeast cells and which is not fully understood. Nevertheless, coexistence of these microorganisms is also possible and their relationship is affected by various factors. Knowledge of these inter-microbial interactions was obtained from studies of diseases and pathologies, during which *C. albicans* + *P. aeruginosa* coinfections occur.

In this thesis I studied mechanisms of interaction between pathogenic yeast *C. albicans* and bacterium *P. aeruginosa* by a) *C. albicans* gene expression monitoring in coculture of *C. albicans* + *P. aeruginosa* b) analysis of filtered culture media of both microorganisms and their cocultures by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) method.

I found that transcription of 107 genes was changed in the coculture. These genes encode mainly proteins with regulatory function in transcription, translation or protein modification but also other genes were influenced – genes responsible for *C. albicans* cell wall biosynthesis (*KRE5*, ortholog *S.c. MNT2*), small molecule transport (*CDR1*, ortholog *S.c. VBA5*) or amino acids metabolism (*ARO2*, *ARO7*) and many others. In agreement with the gene expression results, GC/MS analysis revealed decreased production of autoinductor phenethyl alcohol (inhibitor of *C. albicans* hyphal growth) and simultaneously occurrence of unusual oxidized form of another *C. albicans* autoinductor *E,E*-farnesol (inhibitor of hyphal growth, too) in coculture *C. albicans* + *P. aeruginosa*. (In Czech)

# Obsah

Seznam použitých zkratk	5
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	6
1.1.1. Patogenita	6
1.1.1.1. <i>Candida albicans</i>	7
1.1.2. Virulenční faktory	7
1.1.2.1. Morfologie a vratné změny fenotypu	7
1.1.2.2. Ostatní virulentní faktory	9
1.2. Interakce kvasinek rodu <i>Candida</i> s lidským imunitním systémem	9
1.2.1. Systémové kandidózy	9
1.2.1.1. Nespecifické imunitní reakce	10
1.2.1.2. Únikové mechanismy kandid	10
1.2.1.3. Specifické imunitní reakce	11
1.2.2. Povrchové kandidózy	11
1.2.2.1. Vaginální kandidózy	11
1.2.2.2. Orální kandidózy	12
1.3. Interakce kvasinek rodu <i>Candida</i> a bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a cystická fibróza	12
1.3.2. Interakce mikroorganismů <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i>	13
1.4. Genom patogenních kvasinek rodu <i>Candida</i>	14
1.4.1. Úvod do problematiky genetického výzkumu kvasinek rodu <i>Candida</i>	14
1.4.2. První poznatky o genomu kvasinek rodu <i>Candida</i>	15
1.4.3. Pohlavní rozmnožování kvasinek rodu <i>Candida</i> („mating“)	15
1.4.4. Karyotyp kvasinek rodu <i>Candida</i>	17
1.4.5. Genové manipulace patogenních kvasinek rodu <i>Candida</i>	18
1.4.5.1. Náhodná mutageneze	18
1.4.5.2. Cílená mutageneze	18
1.4.6. Sekvence a mapování genomu <i>C. albicans</i>	22
1.4.6.1. Genetický model <i>C. albicans</i> – porovnání s ostatními modely	22
1.4.7. Geny a genové rodiny kvasinek rodu <i>Candida</i>	24
1.4.7.1. Hyfálně specifické geny	24
1.4.7.2. Geny specifické pro produkci biofilmu	26
1.4.7.3. Genová regulace vratné změny fenotypu – „white-opaque switching (WOS)“	26
1.4.7.4. Geny zprostředkující získávání železa	26
1.4.7.5. Genové rodiny spojené s virulencí <i>C. albicans</i>	27
1.5. DNA čipy – princip metody	30
2. MATERIÁL A METODY	32
2.1. Chemikálie a přístroje	32
2.1.1. Běžné chemikálie	32
2.1.2. Speciální chemikálie	32
2.1.3. Sady	33
2.1.4. Buněčný materiál	33
2.1.5. Přístroje	33
2.1.6. Ostatní materiál	34
2.2. CÍL PRÁCE	35
2.3. Metodika	35
2.3.1. Kultivace mikroorganismů	35

2.3.2. Růstová křivka	36
2.3.3. DNA čipy	36
2.3.3.1. Izolace celkové RNA	37
2.3.3.2. Kvantitativní a kvalitativní analýza vzorků RNA	37
2.3.3.3. Izolace mRNA pomocí sady „Micro Fast Track (MFT) 2.0“	38
2.3.3.4. Syntéza cDNA a značení	39
2.3.3.5. Srážení a purifikace cDNA s použitím sady „QIAquick PCR Purification Kit“	40
2.3.3.6. Hybridizace na DNA čip <i>C. albicans</i>	40
2.3.3.8. Skenování DNA čipu	41
2.3.3.9. Vyhodnocení dat	41
2.3.3.10. Statistické vyhodnocení dat	43
2.3.4. Kultivace <i>C. albicans</i> v přítomnosti <i>P. aeruginosa</i> a fluconazolu	43
2.3.4.1. Semikvantitativní test přežití	44
2.3.4.2. Analýza kultivačních médií metodou plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)	44
3. VÝSLEDKY	46
3.1. Růstová křivka	46
3.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza vzorků RNA	46
3.3. Změny na úrovni genové exprese <i>C. albicans</i> v kokultuře <i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i>	48
3.3.1. Buněčná stěna	52
3.3.2. Cytoplasmatická membrána	53
3.3.3. Cytoskeleton	54
3.3.4. Metabolismus mastných kyselin a lipidů	54
3.3.5. Transport proteinů	54
3.3.6. Transport malých molekul	54
3.3.7. Metabolismus aminokyselin a peptidů	55
3.3.8. Metabolismus sacharidů	55
3.3.9. Energie	55
3.3.10. Pohlavní rozmnožování („mating“), white-opaque switching, signalizace	56
3.3.11. Mitóza	57
3.3.12. Chromatin a struktura chromozomu	57
3.3.13. Replikace a metabolismus nukleotidů	57
3.3.14. Transkripce a proteosyntéza	57
3.3.15. Modifikace a degradace proteinů	57
3.3.16. Metabolismus koenzymů a kofaktorů	58
3.3.17. Geny s neznámou funkcí	58
3.4. Kultivace <i>C. albicans</i> v přítomnosti <i>P. aeruginosa</i> a fluconazolu	58
3.5. Analýza kultivačních médií metodou plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)	62
4. DISKUSE	66
5. SOUHRN	70
SEZNAM LITERATURY	71

## Seznam použitých zkratk

ABC	„ATP-binding cassette“
ALS	„agglutinin-like sequence“
a.u.	„arbitrarily unit“ (arbitrární jednotka)
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CF	cystická fibrosa
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
CFU	„colony forming unit“ = počet kolonií
DTT	dithiothreitol
FA	„farnesolová kyselina“
FS	„first strand“
GC/MS	plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
LT	laboratorní teplota
mRNA	mediátorová RNA
MFT	Micro Fast Track 2.0
MRS	„major repeated sequence“
oligo dT	krátká sekvence deoxythymidinových nukleotidů
OPT	oligopeptidový transportér
OD <sub>600</sub>	optická denzita při 600 nm
p.a.	pro analýzu
QS	quorum sensing
RNA	ribonukleová kyselina
SAP	sekretovaná aspartátová proteinasa
SF	selekční faktor
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
WOS	„white-opaque switching“
WO-1	„white opaque-1“ kmen <i>C. albicans</i>

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1. Rod *Candida*, *Candida albicans*

### 1.1.1. Patogenita

Známe přibližně 200 druhů kvasinek rodu *Candida* a asi desetina z nich jsou oportunistické patogeny, které mohou ohrožovat jedince s oslabenou imunitou [1].

Některé druhy se často vyskytují jako součást přirozené lidské mikroflóry a nechovají se invazivně. Až ve chvíli, kdy dojde k určité dysfunkci imunitní odpovědi jedince, se tento neškodný eukaryotní mikroorganismus promění ve skutečný patogen. Ten je původcem infekcí, které se zásadně liší svou závažností.

Infekce, které jsou vyvolány kandidami, obecně nazýváme kandidózy. Mezi relativně neškodné kandidózy řadíme **povrchové infekce**, tedy kožní a slizniční onemocnění, jakými jsou například vaginální či orální kandidózy. Tyto infekce jsou sice nepříjemné, ale obvykle neznamenaají velkou hrozbu pro pacienta a nezanechávají trvalé následky. Dochází k nim často po léčbě antibiotiky [2], anebo změní-li se charakter slizničního či kožního prostředí organismu, typicky pH. Kandidy jsou na pH vnějšího prostředí citlivé už proto, že má vliv na regulaci jejich genové exprese [3]. Jiným rizikovým faktorem je onemocnění diabetes mellitus (cukrovka) [4]. Především pacienti, kteří nedodrží předepsanou léčbu cukrovky a mají tak v krvi příliš vysokou hladinu glukosy (hyperglykémie), jsou náchylní ke kandidózám. Kvasinka využívá krevní cukr jako výživu a zároveň je chráněna před imunitním systémem, který v hyperglykemickém prostředí nepracuje tak, jak by měl [5].

Opravdu závažné jsou však **systémové infekce**, které mají za následek vysokou úmrtnost napadených pacientů. Jedním z projevů systémových kandidóz je stav zvaný **kandidémie**, neboli přítomnost kandidy v krevním oběhu. Pokud se kandida dostane do krevního oběhu pacienta se zdravým imunitním systémem, pravděpodobně u něj k systémové infekci nedojde a kandidémie sama odezní. V opačném případě může kandida začít napadat vnitřní orgány a systémová infekce bohužel často vede až k septickému šoku a smrti pacienta [6]. Příčinou systémových infekcí je vážné potlačení nebo celkový kolaps imunitního systému. Dochází k nim tedy především po transplantacích (léčba imunosupresivy), při léčbě leukémie a jiných forem rakoviny (chemoterapie), u pacientů s nemocí AIDS [7], anebo

v případě jiných onemocnění, mezi jejichž průvodní znaky patří ztráta přirozené obranyschopnosti. Riziková je také léčba širokospektrými antibiotiky [1].

Různé druhy kvasinek rodu *Candida* se liší v mnoha ohledech, ale z medicínálního hlediska je asi nejzásadnější, že každá z nich přednostně vyvolává různé druhy infekcí u různých typů pacientů a rozdíl je také ve způsobu přenosu infekce.




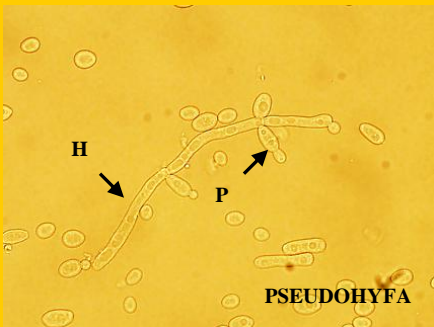
#### **1.1.1.1. *Candida albicans***

*C. albicans* je modelovou kvasinkou mezi kandidami, protože je stále nejčastějším a proto i nejstudovanějším původcem infekcí v rámci rodu *Candida*. Tyto infekce však nejsou nutně vázány na nějaký vnější zdroj, protože *C. albicans* se typicky vyskytuje v přirozené lidské mikroflóře většiny jedinců a přenáší se již v okamžiku narození z matky na potomka (endogenní přenos) [8], čímž se odlišuje od většiny ostatních druhů kvasinek rodu *Candida*. Ke změně komenzálního soužití v infekci tak stačí již zmíněná porucha imunity. *C. albicans* je stále nejčastěji izolovanou kandidou z ústní sliznice a trávicího traktu [9]. Je také typickým původcem vaginálních kandidóz, ačkoli je zde často doprovázena i jinými druhy, například *C. glabrata*, *C. tropicalis* aj. [10]. Nicméně, *C. albicans* stále drží prvenství i jako původce systémových kandidóz, ačkoli výskyt tak zvaných non-*C. albicans* druhů se zvyšuje, a to zřejmě i pod vlivem léčby azolovými antimykotiky [9]. Začátek 21. století znamenal velký nárůst výskytu těchto non-*C. albicans* druhů, ale až na výjimky je *C. albicans* stále celosvětově nejrozšířenější patogenní kvasinkou [11].

#### **1.1.2. Virulenční faktory**

##### **1.1.2.1. Morfologie a vratné změny fenotypu**

Morfologické znaky se i v rámci rodu *Candida* mohou lišit a různé morfologické formy jsou významnou podmínkou pro úspěšný vznik a vývoj infekce. Patogenní kvasinky jsou v závislosti na okolním prostředí schopny přecházet z jednoho morfologického typu na druhý. V průběhu invaze mikroorganismu se podmínky neustále mění, a proto jsou různé fáze infekce spojeny s různými morfologickými znaky kandid. Není tedy nijak překvapivé, že schopnost morfogeneze je jedním z důležitých virulentních faktorů těchto kvasinek. Mezi základní morfologické formy řadíme kvasinkovou buňku (blastospora) a vláknité formy, jakými jsou hyfa nebo pseudohyfa (viz obr. 1, str. 8) [12]

Morfológická forma	Popis
 <p style="text-align: right;"><b>BLASTOSPORA</b></p>	<p><b>Blastospora</b> představuje oválnou kvasinkovou buňku, která vzniká výhradně nepohlavně, tedy dělením. Její velikost se pohybuje v řádu jednotek <math>\mu\text{m}</math>.</p>
 <p style="text-align: right;"><b>ZÁRODEČNÉ KLÍČKY</b></p>	<p><b>Zárodečné klíčky (germ tubes, označeny šipkou)</b> jsou jemná vlákna, která vyrůstají z blastospor. Proces tvorby zárodečných klíčků se nazývá germinace. Zárodečné klíčky jsou základem pro vznik pravé hyfy.</p>
 <p style="text-align: right;"><b>HYFA</b></p>	<p><b>Hyfa (pravé mycelium, označena šipkou)</b> vyrůstá ze zárodečného klíčku jeho prodloužením, nebo větvením z již existující hyfy. Přepážky (septum) oddělují jednotlivé buňky hyfy. Větvení nebo pučení probíhá vždy přímo za přepážkou.</p>
 <p style="text-align: right;"><b>PSEUDOHYFA</b></p>	<p><b>Pseudohyfa</b> je také vláknitá morfológická forma, ale vzniká řetěžením buněk, které se po pučení dokonale neoddělí. Přepážky jsou tedy umístěny vždy na spojení dvou buněk vlákna. (na obrázku H = hyfa, P = pseudohyfa)</p>

**obr. 1: Morfológické formy patogenních kvasinek rodu *Candida*.**

Mikroskopické snímky byly pořízeny ze vzorků kultur *C. albicans* (fotografie poskytla Ing. Václava Bauerová, ÚOCHB AV ČR, v.v.i.)

### Morfologie *C. albicans*

*C. albicans* kromě typické blastospory vytváří i hyfy a pseudohyfy. Testy na myších odhalily, že v počáteční fázi infekce hraje hlavní roli kvasinková forma *C. albicans* a že

mutanti, jejichž fenotyp je vázán pouze na vláknitou formu, bývají prokazatelně méně virulentní [13]. Vlákniťa forma je nicméně nepostradatelná v dalších stádiích infekce, takže kvasinka, která je odkázaná pouze na fenotyp blastospor, také ztrácí na své virulenci. S tímto faktem úzce souvisí také jev zvaný vratná změna fenotypu, který se vyznačuje spontánní přeměnou fenotypu kolonií kvasinek nezávislou na změnách prostředí. Nejznámější je takzvaný „**white-opaque switching**“ (**WOS**) u kmenu WO-1 *C. albicans*, který způsobuje nepřítis časté přeměny mezi buňkami formujícími bílé a hladké kolonie a těmi, které tvoří kolonie šedé a ploché. Fenotyp je obvykle dědičný a buňky různých fenotypů se liší v mnoha ohledech. Zajímavé je, že u bílého fenotypu je zcela běžná tvorba hyf, kdežto šedý fenotyp je spojen s vláknitou formou spíše vzácně [14]. Tomu odpovídá i pozorování, podle kterého kvasinky šedého fenotypu oproti bílým úspěšně kolonizují povrch pokožky, ale při systémových infekcích je více virulentní fenotyp bílý [15].

#### **1.1.2.2. Ostatní virulentní faktory**

Důležitý je úzký vztah mezi morfologií kvasinek a dalšími virulentními faktory, jakými jsou tvorba biofilmu (typicky hyfální a pseudohyfální formy) [16] nebo různé adhezní a povrchové faktory. Pro podrobnější informace ohledně virulentních faktorů (adherence, biofilm, sekretované hydrolasy) a léčby kandidóz (antimykotika) odkazují na svou bakalářskou práci Interakce mezi patogenními kvasinkami rodu *Candida* a bakterií *Pseudomonas aeruginosa* [17].

## **1.2. Interakce kvasinek rodu *Candida* s lidským imunitním systémem**

### **1.2.1. Systémové kandidózy**

Léčba systémových kandidóz je velmi obtížná, jednak proto, že si kandidy vytvářejí rezistenci na antimykotika a dále díky obranným strategiím, které jim zaručují ochranu před imunitním systémem. Vztah mezi imunitním systémem člověka a infekcí původcem *Candida* je velmi problematický, a ačkoli lidské B-lymfocyty produkují specifické protilátky proti antigenům kandid, jejich potenciál zlepšit stav pacienta je zatím sporný, protože výsledky studií terapeutického účinku specifických protilátek jsou často protichůdné [18, 19].

V následujících odstavcích uvádím mechanismy přirozené (vrozené) a adaptivní (získané) imunity, které umožňují rozpoznat a následně eliminovat kvasinky rodu *Candida* a ochránit tak pacienta v rámci systémové odpovědi organismu.

#### **1.2.1.1. Nespecifické imunitní reakce**

Základním obranným faktorem nespecifické imunity je fagocytóza cizorodých částic. Při infekcích vyvolaných původci rodu *Candida* je zároveň nejzásadnějším imunitním mechanismem obrany vůbec. Fagocytózy se účastní makrofágy a neutrofilů a velmi důležitým prostředníkem prezentace kvasinkového antigenu jsou dendritické buňky, které mají i výhodnou lokaci, neboť se nacházejí na povrchu sliznic, v kůži i v tkáních [20]. Nezralá dendritická buňka nejprve fagocytuje kandidu prostřednictvím mannosového receptoru (rozeznává N-mannosylové zbytky kvasinky) a receptoru toll-like 4 (rozeznává O-mannosylové zbytky kvasinky). Poté prezentuje kvasinkové antigeny a dále stimuluje zránění T-lymfocytů [21].

#### **1.2.1.2. Únikové mechanismy kandid**

Fagocytóza je bezesporu životně důležitá, ale kandidy si bohužel vyvinuly řadu strategií, které jim umožňují tento obranný mechanismus obejít. Některé z nich dokážou zabít buňky makrofágů a neutrofilů a konkrétně *C. albicans* je vůči fagocytujícím buňkám mnohem agresivnější, než jakýkoli jiný druh kvasinky rodu *Candida* [22]. Pokud je *C. albicans* fagocytována, zahajuje růst hyf, které prorůstají makrofágem. Makrofág umírá a kvasinka uniká ven, kde se může dále dělit [23]. *C. albicans* zabíjí i neutrofilů ve větší míře, než ostatní patogenní kvasinky rodu *Candida* [22].

*Candida glabrata* je sice striktně vázána na morfologii blastospor, ale přesto dokáže fagocytující buňku zahubit. Je-li *C. glabrata* pohlcena, přežívá, a množí se nepozorována uvnitř makrofága tak dlouho, dokud makrofág nepraskne [22, 24].

*C. lusitaniae* vytváří pseudohyfy a někdy produkuje kratší řetězky buněk, které jsou makrofágem špatně rozpoznávány a které se tak mohou opět nepozorovaně množit uvnitř fagocytující buňky [22].

### **1.2.1.3. Specifické imunitní reakce**

Součástí specifické (adaptivní) buněčné imunity jsou T-lymfocyty, B-lymfocyty a plazmatické buňky. Humorální složkou jsou protilátky a cytokiny.

T-lymfocyty se dělí na dva základní typy, a to pomocné (Th) a cytotoxické (Tc) T-lymfocyty. Pomocné T-lymfocyty jsou dále dvojího hlavního typu, Th1 a Th2. Tyto imunitní buňky hrají důležitou roli ve vztahu ke kvasinkovým infekcím a především mají zcela odlišný mechanismus účinku. T-lymfocyty produkují cytokiny (rozpuštěné signální molekuly) které ovlivňují celou řadu imunitních procesů, včetně fagocytózy. Produkce cytokinů má velmi zásadní význam pro to, zda bude kandida invazivní, anebo bude žít s člověkem v komensálním vztahu [25]. Cytokiny produkované lymfocyty Th1 fagocytózu podporují, kdežto cytokiny lymfocytů Th2 ji potlačují. Cytokiny jednoho typu T-lymfocytů působí proti zrání druhého typu, takže pokud jsou produkovány především cytokiny Th2, systém ochranného účinku lymfocytů Th1 před kvasinkovou infekcí kolabuje [26].

### **1.2.2. Povrchové kandidózy**

U povrchových kandidóz je funkce imunitního systému člověka velmi sporná. Uplatňuje se zde nejen systémová, ale i slizniční imunita a také fakt, že některé kandidy jsou přirozenou součástí lidské mikroflóry [27].

#### **1.2.2.1. Vaginální kandidózy**

Jedním z častých problémů jsou vaginální mykózy. Udává se, že 75 % žen se v průběhu života setkalo s vaginální kandidózou minimálně jednou. Na základě experimentů na různých zvířecích modelech bylo zjištěno, že v průběhu vaginální infekce kandidou dochází k potlačení systémových imunitních reakcí prostředím vaginální sliznice. Potlačení buněčné imunity je pravděpodobně důsledkem snahy o eliminaci zánětlivých reakcí v reprodukčním traktu a také prostředkem k zachování komenzálního vztahu člověka a kvasinky. Bohužel však mohou být také příčinou chronických infekcí, a to pokud se komenzální soužití změní ze strany kandidy v invazivní. V takové situaci se ukazuje nedokonalost imunoregulačního systému, tedy příliš mírná imunitní odpověď na infekci kandidou. Složitá imunoregulace bohužel zatím brání vývoji vakcíny, která by dokázala vaginálním kandidózám zabránit [27, 28].

### 1.2.2.2. Orální kandidózy

Orální kandidózy jsou častou infekcí, která postihuje pacienty s onemocněním AIDS. HIV pozitivní pacienti mají nedostatek lymfocytů Th1 a na jejich úkor se u nich prosazuje buněčná imunita zprostředkovaná lymfocyty Th2. Takové prostředí je vhodné pro vývoj infekce, protože buňky Th2 nepodporují fagocytózu kandid [29]. Nepostradatelnou součástí obrany proti orálním kandidózám jsou samotné epitelální buňky ústní sliznice. Dokážou totiž inhibovat růst několika druhů kvasinek rodu *Candida* prostřednictvím přímého kontaktu s blastosporami i hyfami [30]. Epitelální buňky rozpoznávají buněčnou stěnu kandid (konkrétní struktury zapojené do této interakce nejsou známy). Infekce aktivuje jednu z MAP kinasových drah, která podněcuje zánětlivé reakce a systém dokáže rozlišit mezi komenzalismem a infekcí *C. albicans*, zřejmě na základě převažující morfologické formy kvasinky [31]. I když je podobný jev pozorován i u epitelálních buněk vaginální sliznice, v případě orálních kandidóz hraje významnější roli, protože orální epitelální buňky mají až dvakrát vyšší účinnost inhibice růstu kvasinek [27].

## 1.3. Interakce kvasinek rodu *Candida* a bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.3.1. *Pseudomonas aeruginosa* a cystická fibróza

*Pseudomonas aeruginosa* je gramnegativní bakterie, která je stejně jako některé kvasinky rodu *Candida* oportunistickým patogenem (viz bakalářskou práci [17]). *P. aeruginosa* je původcem různých, převážně plicních infekcí, které vážně komplikují život osobám s diagnózou nemoci cystické fibrosy (CF). Jedná se o závažné geneticky podmíněné onemocnění, které ovlivňuje prakticky všechny orgánové soustavy, především pak dýchací a trávicí. Je způsobeno mutací na genu pro proteinový kanál **CFTR** (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který je zodpovědný za přenos chloridových iontů a je lokalizován na buňkách epitelu. Tato mutace způsobuje iontovou nerovnováhu, jejímž projevem je například slaný pot (malým pacientům se říká „slané děti“), ale především velice viskózní slizniční hlen, který způsobuje mnoho komplikací především v rámci dýchací soustavy [17, 32].

Hustý hlen znemožňuje přirozenou očistu plic a ty jsou pak náchylnější k infekcím. Kromě *P. aeruginosa* je jejich častým původcem také bakterie *Burkholderia cepacia* [33], ale spolu s těmito bakteriemi jsou z plic pacientů izolovány i patogenní kvasinky rodu *Candida*.

Studium interakce mezi přítomnými původci infekce by nám tak mohlo pomoci porozumět vztahu mezi mikroorganismy a přinést nové metody léčby plicních infekcí pacientů s cystickou fibrosou.

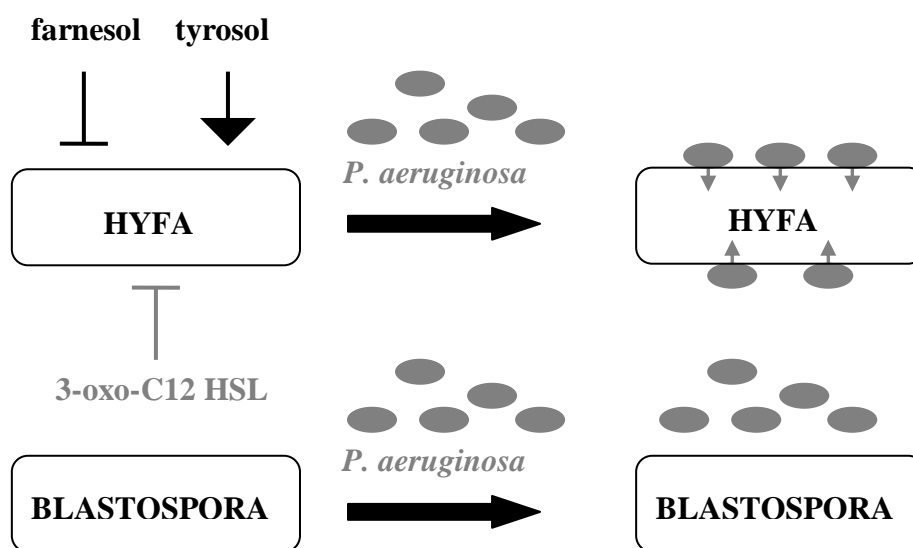
### 1.3.2. Interakce mikroorganismů *in vivo* a *in vitro*

První známky ovlivnění růstu kvasinek rodu *Candida* bakterií *P. aeruginosa* byly pozorovány u pacientů, kteří onemocněli plicní infekcí po operačním zákroku. Dokud byly plíce kolonizovány oběma druhy mikroorganismů, růst kandid byl potlačen na úkor infekce pseudomonádou. Nicméně, v okamžiku vymýcení bakterie antibiotiky se invazivní růst kandidy obnovuje a někdy je obtížné ji eliminovat i při použití antimykotik. Tento princip funguje *in vivo* i *in vitro* [34].

Co se týče *C. albicans*, *P. aeruginosa* je zaručeně invazivní vůči její **hyfální formě** [35]. Charakter plicních infekcí tak předurčuje *C. albicans* k omezení růstu, neboť mikroorganismy produkují při povrchových infekcích biofilm a ten je spjat právě s výskytem vláknité formy *C. albicans*. Zdá se, že pro tuto interakci je nutný přímý kontakt obou mikroorganismů, který vyvolává lokální lyzi kvasinky. Citlivost *C. albicans* na přítomnost *P. aeruginosa* je pravděpodobně ovlivněna i některými jejími povrchovými glykoproteiny – *O*-mannanové glykoproteiny jsou zřejmě důležitým protektivním faktorem hyfální formy kvasinky. Mutanti s defektem v tvorbě *O*-mannosylačních proteinů Mnt1p a Mnt2p měli totiž v přítomnosti *P. aeruginosa* ještě nižší životnost) [35] a v jiném experimentu byla navíc pozorována i jejich snížená virulence [36]. Typicky hyfálně specifické glykoproteiny (Hyr1p, Hwp1p a Als3p, viz kap. 1.4.7.1.) však zřejmě při interakci s bakterií nehrají roli [35].

Ukázalo se ovšem, že růst *C. albicans* je inhibován i v přítomnosti prostého filtrátu z média *P. aeruginosa*. Je to způsobeno produkcí toxických látek (pyocyanin, fosfolipasa C) a také četných virulentních faktorů bakterie. Samostatnou kapitolou by byla produkce malých molekul komunikačního systému quorum sensing, které produkují jak kvasinky, tak bakterie, ovšem jejich chemická povaha je u obou mikroorganismů odlišná. Jedna z takto sekretovaných molekul *P. aeruginosa* nicméně dokáže ovlivnit komunikační systém kandidy a způsobuje přechod z její hyfální formy na kvasinkovou. (viz obr. 2, str. 14)

Problematika systému quorum sensing je podrobně popsána v mé bakalářské práci a proto se jí zde dále nezabývám [17, 35, 37].



**obr. 2: Interakce *C. albicans* a *P. aeruginosa***

Farnesol a tyrosol jsou autoinduktory komunikačního systému quorum sensing (QS) *C. albicans*. Farnesol je negativní regulátor hyfálního růstu a tyrosol naopak hyfální růst indukuje. 3-oxo-C12 HSL (3-oxo dodekanoylhomoserinlaktón) je autoinduktorem *P. aeruginosa*, ale zasahuje i do regulačního drah *C. albicans* a způsobuje obdobně jako farnesol inhibici hyfálního růstu.

*P. aeruginosa* přisedá na hyfu prostřednictvím adhezivních faktorů a způsobuje lokální poškození hyfy a inhibici jejího růstu. Bakterie napadá pouze hyfální formu *C. albicans*, protože kvasinková forma (blastospora) má zřejmě na svém povrchu odlišné glykoproteiny, které jí jsou protektivním faktorem (upraveno podle [37]).

## 1.4. Genom patogenních kvasinek rodu *Candida*

### 1.4.1. Úvod do problematiky genetického výzkumu kvasinek rodu *Candida*

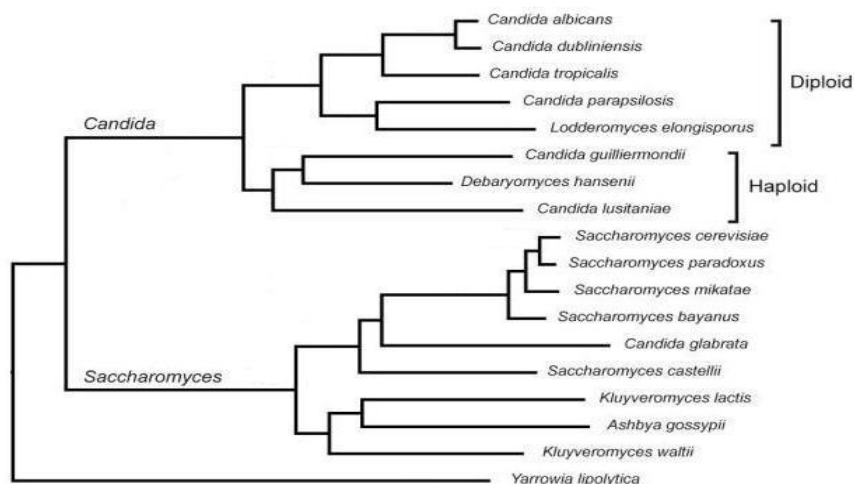
Vzrůstající počet infekcí, jejichž původcem jsou patogenní kvasinky rodu *Candida*, zásadně zvýšil zájem o studium těchto mikroorganismů. Ve snaze pochopit mechanismus proměny neškodné kvasinky v nebezpečný patogen byly odhalovány a izolovány důležité geny, které nějakým způsobem přispívají k patogenitě [38] nebo jsou důležité pro metabolické pochody [39] či pohlavní cyklus patogenních kvasinek rodu *Candida* [40]. Vzniklo také mnoho prací, které se zabývají studiem genů, které souvisejí s rezistencí na antimykotika [41].

### 1.4.2. První poznatky o genomu kvasinek rodu *Candida*

Počátky výzkumu genomu patogenních kvasinek rodu *Candida* sahají do devadesátých let. Nejprve byla pozornost věnována hlavně **náhodné mutagenezi** a izolaci jí vytvořených **auxotrofních** kmenů. V roce 1980 Whelan a spol. potvrdili domněnku, že *C. albicans* je **diploidní** a **heterozygotní** z hlediska genu pro syntézu methioninu (syntéza methioninu vyžaduje obě alely tohoto genu). Využili metodu působení slabého UV záření, které může způsobit, že se při mitose špatně oddělí alely daného genu. Jedna z dceřinných buněk pak obsahuje pouze jednu alelu, která však nemůže zajistit úspěšnou syntézu daného metabolitu a to se projeví auxotrofním fenotypem – kvasinka nedokáže sama syntetizovat methionin a roste pouze v případě, že jej přidáme do růstového média [42]. Později bylo prokázáno, že heterozygocie je u *C. albicans* mnohem frekventovanějším jevem [43].

Spolu s otázkou **ploidie** (standardní počet sad chromozomů) se neustále objevovala snaha o objasnění **pohlavního cyklu** *C. albicans*, protože se zdálo, že se rozmnožuje výhradně dělením. Poulter a spol. uměle spojili sféroplasty (buněčný útvar s porušenou buněčnou stěnou) auxotrofních diploidních buněk, čímž uměle simulovali pohlavní splynutí a vytvořili tak tetreploidní buňky *C. albicans* [44].

### 1.4.3. Pohlavní rozmnožování kvasinek rodu *Candida* („mating“)

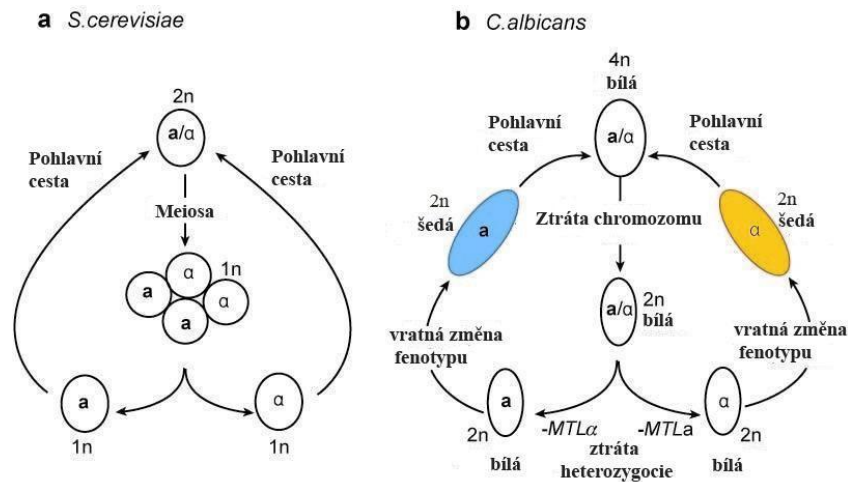


obr. 3: Fylogenetický strom rodu *Candida* a *Saccharomyces* [45]

Pohlavní rozmnožování je u kvasinek rodu *Candida* překvapivě různorodé a souvisí s jejich ploidií (viz obr. 3, str. 15). *Sacharomyces cerevisiae*, nepatogenní pekařská kvasinka, která je významným modelem pro výzkum ostatních kvasinek, je například typicky haploidní (1 sada chromozomů) a pohlavní rozmnožování je u ní běžné. Naopak *C. albicans* je téměř výhradně diploidní (2 sady chromozomů) a po dlouhou dobu byla považována za striktně nepohlavně se rozmnožující kvasinku s výjimkou umělého splývání sféroplastů [44, 45].

V posledních letech se však zjistilo, že za jistých podmínek u *C. albicans* dochází k takzvanému parapohlavnímu cyklu. Skutečnost, že oblast DNA *C. albicans* na **pátém chromosomu**, která je označována jako *MTL* (mating type-like locus) se velmi podobá dobře charakterizovanému lokusu *MAT* *S. cerevisiae* (určuje pohlavní typ kvasinky **a** nebo  $\alpha$ ), spustila vlnu zájmu o výzkum pohlavního rozmnožování *C. albicans* [46]. S určitou frekvencí totiž dochází ke ztrátě pátého chromozomu *C. albicans* (např. roste-li na sorbose), splývání diploidních buněk na tetraploidní a následné mitotické dělení spojené se ztrátou chromozomů, která vede ke vzniku diploidních buněk [47, 48]. Toto takzvané parapohlavní chování je zároveň spjato s **fenotypickým přepínáním** „white-opaque switching“, protože pouze buňky šedého fenotypu vytvářejí tetraploidní generaci (viz obr. 4, str. 17). Význam parapohlavního chování je nejasný, ale náhodné ztráty úseků DNA mezi alelami **a** a  $\alpha$  na pátém chromosomu spolu s pohlavním rozmnožováním kandid mohou zvyšovat jejich diverzitu při infekcích, nehledě na možný vliv regulace white-opaque switching prostřednictvím lokusu *MTL* [46].

Non-*C. albicans* druhy se pak dále liší ve svém pohlavním rozmnožování jeden od druhého. Diploidní kvasinky *C. parapsilosis* nebo *C. tropicalis* se zřejmě rozmnožují striktně nepohlavně, kdežto haploidní *C. guilliermondii* a *C. lusitinae* mají pohlavní cyklus kompletní. Diploidní kandidy schopné pohlavního rozmnožování však podstupují meiosis prostřednictvím alternativních drah, anebo musí operovat s meiotickým aparátem redukovaným oproti tomu, který využívá *S. cerevisiae* [45].



obr. 4: Pohlavní cyklus *S. cerevisiae* a parapohlavní cyklus *C. albicans*

a) Haploidní buňka *S. cerevisiae* (1n) pohlavního typu  $a$  se páruje s haploidní buňkou pohlavního typu  $\alpha$  na diploidní buňku (2n). Pohlavní typ je dán geny na lokusu *MAT*. V prostředí s nedostatkem dusíku a uhlíku dochází k meiose - diploidní buňky se regenerují na haploidní.

b) Diploidní buňky *C. albicans*, typicky heterozygotní, mohou v určitém prostředí ztráct 1 kopii chromosomu 5 (ztráta heterozygocie). S určitou frekvencí dochází u buněk s fenotypem  $a$  nebo  $\alpha$  k masivním změnám v expresi, které vyústí ve vratnou fenotypickou změnu bílých buněk na šedé. Pouze šedé buňky se mohou párovat na tetraploidní potomky. Ty v závislosti na prostředí buď zůstávají tetraploidní, nebo cíleně ztrácejí chromozomy a stávají se diploidními [46].

#### 1.4.4. Karyotyp kvasinek rodu *Candida*

Po odhalení parapohlavního rozmnožování *C. albicans* a zejména jejího diploidního charakteru vzrostl zájem o studium **karyotypu** (soubor všech chromozomů v jádře buňky). Stanovit charakter a počet chromozomů ale bylo dosti obtížné, protože bylo nutné použít metodu, která by umožňovala separaci molekul DNA větších, než 50 kb. Tou se stala **pulzní gelová elektroforéza**, která je využitelná i pro zařazení známých genů na konkrétní chromozom (Southernův přenos), nebo k určení chromozomální polymorfie [49].

Tato metoda ukázala velké rozdíly v rozložení chromozomů mezi *Saccharomyces cerevisiae* a rodem *Candida*. Kandidy disponují spíše většími chromozomy, výjimkou je však *C. glabrata*, jejíž karyotyp obsahuje spíše chromozomy menší, podobně jako je tomu u *S. cerevisiae*. Zároveň je jasné, že mezi různými klinickými izoláty *C. albicans* jsou velké rozdíly na genetické úrovni [50]. Pulzní elektroforéza odhalila 8 chromozomů *C.*

*albicans* [49] a u ostatních kvasinek rodu *Candida* jsou výsledky více či méně rozdílné [50].

#### **1.4.5. Genové manipulace patogenních kvasinek rodu *Candida***

Genové manipulace, které běžně používáme při práci s bakteriemi, nelze automaticky aplikovat na eukaryotní mikroorganismy. Neexistuje dokonce ani žádná univerzální metoda využitelná pro různé druhy kandid či dokonce kvasinky obecně, a to protože

- a) některé kvasinky jsou typicky haploidní a jiné diploidní
- b) kandidy se liší ve schopnosti pohlavního rozmnožování [51]

*C. albicans* je diploidní a zároveň se rozmnožuje nepohlavně. Metody genetického výzkumu modelové kvasinky *S. cerevisiae* tak nejsou beze zbytku využitelné i pro výzkum *C. albicans* a je žádoucí hledat jejich alternativy.

##### **1.4.5.1. Náhodná mutageneze**

**Náhodná** mutageneze je jedna z úplně prvních metod výzkumu genomu *C. albicans*. Oblíbenými prostředky mutageneze bylo UV záření a chemické mutageny, ale také například transposonální sekvence. Náhodná mutageneze je velmi vítanou metodou při výzkumu:

- esenciálních genů
- genů, které kódují multifunkční proteiny
- genů, jejichž exprese nastává až po mutaci jiného, důležitějšího genu [46].

Působení slabého UV záření na buňky *C. albicans* nakonec vedlo i k potvrzení jejího diploidního a heterozygotního charakteru [52].

##### **1.4.5.2. Cílená mutageneze**

Dnes se však stala nenahraditelnou metodou hlavně **cílená** mutageneze, která dala vznik genetickým knihovnám mutantů, z nichž každý má mutovaný právě jeden gen. Využití

takových knihoven je obrovské, a proto se níže zabývám základními metodami cílené mutageneze.

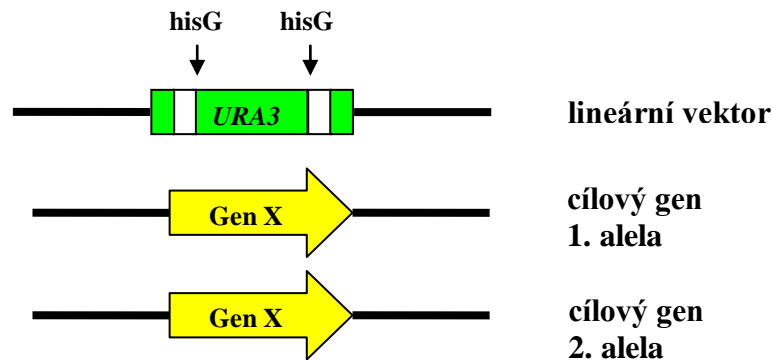
### **Selekční faktory pro cílené mutace**

Nezbytnou součástí genetického výzkumu a přípravy mutantů je správný výběr selekčního faktoru (SF). Díky SF dokážeme identifikovat jedince, u nichž dochází k expresi určitého genu, který může být obsažen buď přímo **v genomu** kvasinky nebo například v transformačním **plasmidu**. Pro genové manipulace *C. albicans* jsou využívány stejné SF, jako v případě *S. cerevisiae* a jedná se převážně o geny pro biosyntézu významných metabolických látek. Velmi využívané jsou selekční faktory **URA3** (syntéza uracilu - orotidine-5'-fosfát dekarboxylasa) a **LYS2** (syntéza lysinu –  $\alpha$ -aminoadipát reduktasa). Selekcce je umožněna po přidání toxických sloučenin, které jsou metabolizovány pouze kvasinkami s funkčním **URA3** nebo **LYS2**. Taková kvasinka nepřežívá narozdíl od kvasinky, která syntézy uracilu (lysину) není schopná [51, 53]. Dále se jako selekční faktory využívají **ADE1** (kóduje fosforibosylaminoimidazol sukcinokarboxamid synthetasu) a **ADE2** (kóduje fosforibosylaminoimidazole karboxylasu), které se účastní biosyntetické dráhy adeninu. Mutanti postrádající tyto geny mají odlišný fenotyp, protože u nich dochází k polymerizaci hromadících se intermediátů na červeně zbarvenou sloučeninu. Kolonie takových kvasinek pak mají červenou barvu [54]. Jako SF lze použít také promotory **GALI** anebo **lacZ** [53].

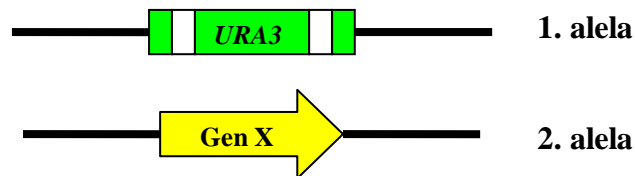
### **Metody cílené mutageneze**

Základní komplikací, která doprovází přípravu cílených mutantů diploidní *C. albicans*, je podmínka **homozygocie** pro mutovanou alelu. Mutace se totiž projeví pouze v případě, že bude dominantní, takže nestačí mutovat jen jednu alelu genu. Ve výsledku to znamená nejprve provést mutaci jedné alely (můžeme použít například některou z metod určenou pro *S. cerevisiae*) a následně mutaci rozšířit i na alelu druhou. To lze provést působením slabého UV záření, které podporuje mitotickou rekombinaci [52] nebo postupnou mutací jednotlivých alel, což je ovšem postup, který vyžaduje více selekčních faktorů. Jedna z velmi efektivních metod využívá selekčního faktoru **URA3**, který má tu výhodu, že s jeho pomocí lze provádět pozitivní i negativní selekci. Podmínkou pro tento postup je dostupnost auxotrofního kmenu kvasinky, jehož obě alely jsou mutantní pro gen **URA3** [46]. Toto je postup:

- vytvoření lineárního vektoru, který obsahuje gen *URA3* a sekvence **hisG** na jeho koncích a konce tohoto vektoru jsou homologní s konci cílového genu (viz obr. 5)
- homologní rekombinace tohoto vektoru s cílovým genem lokalizovaným na 1. alele chromozomu kvasinky, která postrádá gen *URA3* (viz obr. 6)



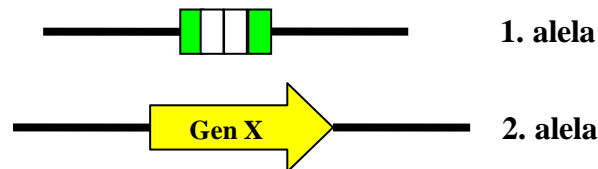
**obr. 5: Lineární vektor pro metodu cílené mutagenese** obsahuje kromě genu pro syntézu uracilu (*URA3*) také opakující se sekvence histidinového operonu (*hisG*) z mikroorganismu *Salmonella typhimurium*, které jsou schopné vzájemné rekombinace (upraveno podle [46])



**obr. 6: Delece cílového genu** na 1. alele vyvolaná homologní rekombinací lineárního vektoru a cílového genu (upraveno podle [46])

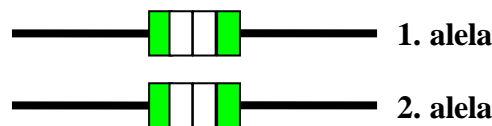
- selekce na médiu bez uracilu – získáme jedince, u nichž došlo k homologní rekombinaci a dokážou tak syntetizovat uracil

- selekce na médiu s obsahem 5-fluoroorotové kyseliny (toxická po metabolizaci) – získáme jedince, u nichž došlo k intramolekulární rekombinaci sekvencí hisG (viz obr. 7) a tedy delecí genu *URA3*, recyklujeme selekční faktor *URA3* (viz obr. 8)



**obr. 7: Rekombinace opakujících se sekvencí hisG** vede k delecí genu *URA3*. Jedinci, u nichž k rekombinaci došlo, jsou vybírání negativní selekcí na médiu s obsahem 5-fluoroorotové kyseliny (upraveno podle [46]).

- celý postup opakujeme pro druhou alelu



**obr. 8: Recyklace selekčního faktoru *URA3*** je výhodná, protože gen můžeme dále využít při mutaci druhé alely cílového genu kvasinky (upraveno podle [46])

Bohužel, řada dějů, mezi něž patří morfogeneze, vratné změny fenotypu, adheze a jiné záležitosti spojené s virulencí *C. albicans*, vyžaduje pro správnou funkci zvýšenou expresi genu *URA3* [55]. Zmíněná metoda je pak nevyužitelná a nezbyvá než volit jiné selekční faktory. Příkladem je systém *SATI-FLP*. Lineární vektor v tomto systému obsahuje gen pro rezistenci kvasinky na antimykotikum nourseothricin (*SATI*) a gen pro flipasu, který je pod kontrolou maltosového promotoru. Po homologní rekombinaci tak vybereme jedince, kteří přežijí selekci nourseothricinem a po přemístění na maltosové médium se aktivuje flipasa. Ta způsobí vystřížení celého komplexu *SATI-FLP* a tedy jeho regeneraci. Regenerace selekčního faktoru je velkým usnadněním, protože jej můžeme dále využít pro mutaci druhé alely [56].

Je zřejmé, že obě výše zmíněné metody využívají obdobný princip a liší se pouze v selekčním faktoru a ve způsobu jeho regenerace. Poněkud rozdílnou metodu vyvinula Suzanne Noble spolu s Alexandrem Johnsonem. Tato metoda využívá fúzní PCR pro přípravu vektorů s dlouhými sekvencemi homologními k okrajovým oblastem cíleného

genu a je mnohem účinnější, než předchozí dvě metody. Vektory obsahují gen pro syntézu aminokyseliny, pro první alelu je to *HIS3* a pro druhou *LEU2*. Opět samozřejmě potřebujeme auxotrofní kmen (defektní *HIS3* a *LEU2*) Po transformaci první alely pak probíhá selekce na médiu bez obsahu histidinu a po transformaci druhé alely je k selekci použito médium bez histidinu a leucinu [57].

#### **1.4.6. Sekvenace a mapování genomu *C. albicans***

Konec 20. století znamenal ve výzkumu genomu *C. albicans* průlom – Tait a spol. jej sekvenovali s využitím kosmidové knihovny a postupně proběhlo i **mapování** jednotlivých chromozomů [58, 59].

V roce 2004 Jones a spol. sekvenovali **celý diploidní genom** *C. albicans* (kmen SC5314) metodou „shotgun“ [60]. Anotovaný genom *C. albicans* je dostupný na internetu na webových stránkách *Candida* Genome Database [61], kde nalezneme i kompletní sekvenace genomu *C. parapsilosis* a *C. glabrata*, jejichž anotace však není tak rozsáhlá.

R. Braun a spol. následně zkontrolovali data z různých zdrojů a po vyřazení některých sporných sekvencí stanovili počet genů *C. albicans* na 6354. Zároveň je blíže popsali, prostudovali jejich expresi za různých, například stresových podmínek a opravili několik chybných sekvencí. Navíc byly nalezeny geny, které jsou specifické pouze pro kvasinky a mohli by tak být cílem nových antimykotik (geny kódující enzymy pro syntézu buněčné stěny nebo enzymy metabolických drah) [62].

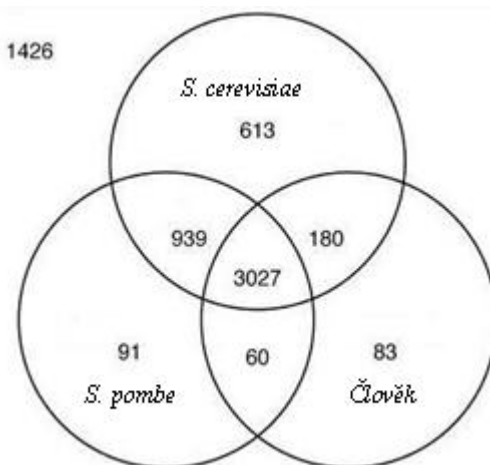
Další sekvenační projekty se pak zabývaly i non-*C. albicans* druhy a jejich genetickými a evolučními rozdíly. Sekvenace kmenu WO-1 *C. albicans* odhalila další chyby (například četné genové duplikace) v počtu genů a ten se záhy snížil na 6159 [45].

##### **1.4.6.1. Genetický model *C. albicans* – porovnání s ostatními modely**

###### **Obecné charakteristiky genomu *C. albicans***

Porovnání s genetickou mapou *S. cerevisiae* podporuje myšlenku, že *C. albicans* je velmi rozdílnou kvasinkou nejen z hlediska počtu a velikosti chromosomů. U mnohých genů umístěných na jednom a též chromosomu *C. albicans* zjišťujeme, že jejich homology v genomu *S. cerevisiae* jsou umístěny na chromozomech různých. Často se liší také vzdálenost mezi jednotlivými geny. Nejdůležitější je ale nalézat u *C. albicans* takové geny, které nemají u *S. cerevisiae* žádné homology, a tudíž mohou být zodpovědné za virulenci

kvasinky. (viz obr. 9). Na chromozomu 7 (nejmenší chromozom) *C. albicans* jsou například lokalizovány dva geny, které jsou příbuzné spíše s lidskými homology (*LRT2*-reverzní transkriptasa a *ALD1*-aldehyd dehydrogenasa) a jeden, který je specifický pro kvasinky, ale ne pro *S. cerevisiae* (*NDH1*-NADH dehydrogenasa) [59].



**obr. 9: Porovnání genů genomu *C. albicans* s genomem modelových kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* a s lidským genomem.**

Přibližně polovina genů *C. albicans* má své homology v genomech ostatních organismů (3027).

Poměrně velká část (1426) naopak nemá žádné homology v ostatních genomech.

Geny společné pro *C. albicans* a *S. cerevisiae* – 613

Geny společné pro *C. albicans* a *S. pombe* – 91

Geny společné pro *C. albicans* a lidský genom – 83

Geny společné pro *C. albicans*, *S. cerevisiae* a *S. pombe* - 613

Geny společné pro *C. albicans*, *S. cerevisiae* a lidský genom – 180

Geny společné pro *C. albicans*, *S. pombe* a lidský genom – 60 [60]

Oproti pekařské kvasince má *C. albicans* také strukturně složitější telomery a obsahuje opakující se sekvence MRS (major repeated sequence), jejichž funkce není jasná [59]. Translokace sekvencí MRS však z větší části určuje rozdíl mezi kmenem WO-1 a SC5314 [45].

Bylo zjištěno, že jenom malá část genů obsahuje introny [60]. Podrobnější data ukázala, že pouze 215 otevřených čtecích rámců má aspoň jednu intronovou sekvenci a z toho 4 geny obsahují introny dva. Pouze gen pro přenašečový protein Hxt4p obsahuje 3 introny a gen pro protein Sin3p dokonce 4 introny. Obecně se jedná o geny kódující ribosomální proteiny, enzymy a také transmembránové proteiny, které mají funkci transportu malých molekul [62].

Zajímavé je také to, že téměř u všech zkoumaných kandid (kromě *C. glabrata* a *C. krusei*) dochází při translaci k odlišnému kódování a **kodónu CUG** je přiřazena aminokyselina serin namísto obvykle přiřazovaného leucinu [63]. Jones a spol. zjistili, že k tomu dochází až u dvou třetin otevřených čtecích rámců *C. albicans* [60].

### **Geny s metabolickou funkcí**

Některé mitochondriálně kódované podjednotky **NADH dehydrogenasy** *C. albicans* jsou dosti rozdílné od těch, které kóduje *S. cerevisiae* a jejich výskyt je specifický pro filamentující kvasinky. Rozdíl je také v respiračním metabolismu, protože *C. albicans* využívá širší škálu peroxisomálních genů a geny dýchacího řetězce jsou u ní vývojově dokonalejší, než u *S. cerevisiae* [60]. Na mírný oxidativní stres *C. albicans* odpovídá expresí genů zodpovědných za biosyntézu argininu [64]. Co se týče metabolismu síry, tak *C. albicans* využívá několik různých drah zpracování cysteinu, což může být důsledkem velké důležitosti glutathionového metabolismu [60].

### **Geny spojené s virulencí kvasinky**

Některé geny *C. albicans* jsou posuzovány jako faktory virulence, obzvláště pokud jejich analogy nenacházíme u *S. cerevisiae*. Jedná se například o geny z genové rodiny sfingomyelinas, fosfolipas B, oligopeptidových přenašečů a pasivních přenašečů aminokyselin, které jsou u *C. albicans* zastoupeny v mnohem větší míře [62].

Větší množství genů zodpovědných za regulaci pH zase zřejmě pramení z extrémních podmínek, v nichž se může *C. albicans* nalézat (žaludeční šťávy aj.) Odlišnosti *C. albicans* a *S. cerevisiae* se samozřejmě odvíjejí i z odlišného morfologického potenciálu těchto kvasinek. *C. albicans*, jakožto filamentující kvasinka, kóduje odlišné strukturní proteiny [60].

## **1.4.7. Geny a genové rodiny kvasinek rodu *Candida***

### **1.4.7.1. Hyfálně specifické geny**

Schopnost změny morfologie z kulatých buněk blastospor na vláknité hyfy/pseudohyfy výrazně zvyšuje invazivitu patogenních kvasinek rodu *Candida*. Vlákňitý růst (hyfální, pseudohyfální) vyžaduje zvýšenou expresi genů zodpovědných za **zahájení morfologického přechodu** z blastospory na hyfu a **strukturních** hyfálně specifických

genů. *C. albicans* zahajuje hyfální růst pod vlivem různých faktorů a platí, že čím víc přiblížíme růstové podmínky vnitřním podmínkám lidské organismu, tím více buněk podstoupí morfologický přechod na vláknitou formu (teplota 37°C, pH 7, sérum) [65].

V posledních letech se při studiu expresního profilu začaly hojně využívat DNA čipy. Tato metoda založená na hybridizaci cDNA s geny nanesenými na podložní sklíčko je velmi dobře využitelná právě pro studium genů, jejichž exprese se liší v různých morfologických formách. D. Kadosh a A. D. Johnson takto identifikovali 61 genů, jejichž exprese se zvyšuje při filamentárním růstu *C. albicans*. Nejvyšší exprese byla pozorována u těchto genů – *HYR1*, *ALS3*, *HWP1*, *SAP5* [66].

<b>Hyr1p</b>	protein hyfální buněčné stěny s GPI kotvou
<b>Als3p</b>	hyfální adheziny z genové rodiny <i>ALS</i> , adhezuje na epiteliální buňky,
<b>Hwp1p</b>	protein hyfální buněčné stěny, kovalentně se váže na epiteliální buňky, je závislý na expresi <i>URA3</i> (viz kap. 1.4.5.2. Cílená mutagenese)
<b>Sap5p</b>	sekretovaná aspartátová proteinasa, spolu se Sap4p a Sap6p štěpí proteiny a využívají je jako zdroj C, zvýšená exprese při infekci, poškozuje tkáň, je závislý na expresi <i>URA3</i> (viz kap. 1.4.5.2. Cílená mutagenese) [61]

Je zřejmé, že *SAP5* nemá na první pohled přímou souvislost s hyfálním růstem a přesto je jeho exprese zvýšená. Dnes již totiž víme, že regulace hyfálně specifických genů je úzce svázána s geny kódujícími proteinasy, povrchové adheziny a jiné virulentní faktory a to je pravděpodobně jedna z důležitých taktik patogenních kandid. Kombinace proteinů Hwp1p (adheze na epitel), Als1p (adheze na endotel) a Als3p (adheze na epitel i endotel) zaručuje filamentující kvasince schopnost napadat různé tkáně, což ji činí velmi nevyzpytatelným a přizpůsobivým patogenem [67].

Genová exprese hyfálně specifických genů (i některých dalších virulenčních faktorů) je regulována třemi hlavními negativními transkripčními faktory – Rfg1, Nrg1 a Tup1 [68, 69, 70]. Bez nich *C. albicans* roste výhradně ve formě hyfy, což zásadně snižuje její virulenci.

#### 1.4.7.2. Geny specifické pro produkci biofilmu

Produkce biofilmu (tenká vrstva mikroorganismů na povrchu různých předmětů) je pro kandidy velkou výhodou, protože usnadňuje jejich komunikaci, zvyšuje rezistenci na antibiotika/antimykotika a umožňuje jim přežití v nepříznivých podmínkách a na široké škále tkání a povrchů. V první fázi produkce biofilmu adhezuje *C. albicans* na povrch a zahajuje hyfální růst. V okamžiku adheze byla pozorována zvýšená rezistence kandid na antimykotikum fluconazol, a to z důvodu zvýšené exprese genů *CDR1* a *MDR1* (kódují proteinové pumpy - aktivní eliminace antimykotik) [71]. Murillo a spol. objevili 41 genů, jejichž exprese se zvyšuje během prvních 30 min produkce biofilmu a čtvrtina z nich kóduje geny účastnící se metabolismu síry. Jeden z nich, *MET3* (kóduje ATP sulfurylasu), je inhibován již velmi nízkými koncentracemi cysteinu a methioninu a přesto byla jeho exprese při tvorbě biofilmu v prostředí s obsahem těchto aminokyselin velmi vysoká. Geny tohoto typu jsou možným cílem nových antimykotik, ale příčina jejich zvýšené exprese během produkce biofilmu zatím není známa [72, 73].

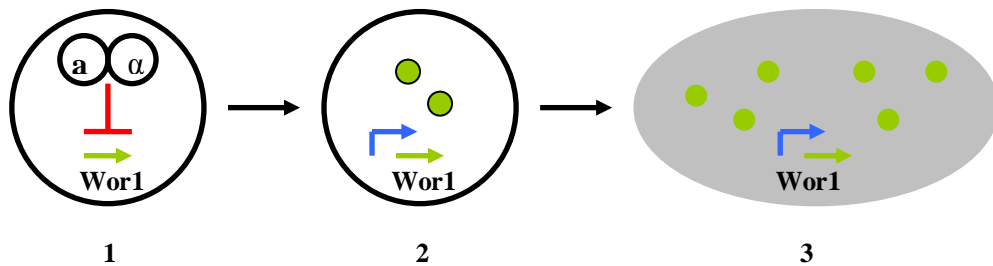
#### 1.4.7.3. Genová regulace vratné změny fenotypu – „white-opaque switching (WOS)“

Morfologická změna z hladké a světlé kolonie na plochou a šedou je proces doprovázený masivní změnou fenotypu i genotypu *C. albicans* WO-1. WOS je proces regulovaný skrze lokus *MTL* (viz kap.1.4.3. Pohlavní rozmnožování kvasinek rodu *Candida*) a přeměna bílé buňky na šedou vyžaduje ztrátu heterozygocie v lokusu *MTL*. Pokud je v genomu kvasinky přítomna pouze alela *a* nebo  $\alpha$ , ale ne obě dvě současně, nebude vznikat represor *a- $\alpha$* . Tento represor inhibuje expresi genu pro transkripční faktor *Wor1* a v jeho nepřítomnosti tak dochází k mohutné produkci *Wor1*, a tedy ke změně z hladké a světlé kolonie na plochou a šedou (viz obr.10, str. 27) [74].

#### 1.4.7.4. Geny zprostředkující získávání železa

*C. albicans* se musí během infekce přizpůsobit vnitřnímu prostředí organismu, které má samozřejmě řadu specifíků. Jedním z nich je nedostatek železa, které obvykle v lidském těle ve volném stavu nenajdeme. *C. albicans* v prostředí s nedostatkem železa indukuje expresi genu *FTR1*. Ten kóduje permeasu s vysokou afinitou k železu, která zaručuje jeho zachycení i ve velmi nízkých koncentracích. Mutanti bez *FTR1* nedokážou způsobit u myši systémovou infekci, a proto o tomto genu můžeme mluvit jako o virulentním faktoru [75]. Dalšími geny, jejichž exprese se v prostředí s nízkou koncentrací železa zvyšuje, jsou ty

pro vakuolární přenašeče železa (*FTH*), přenašeč „iron-siderophore“ (*ARNI*) nebo vysokoafinitní přenašeč Cu (*CTR1*) [76]



**obr. 10: Regulace „white opaque switching“ *C. albicans***

- 1) Homodimer  $\alpha$ - $\alpha'$  je represorem transkripčního faktoru Wor1 („white“)
- 2) Ztráta heterozygocie vede k nepřítomnosti represoru - zahajuje se exprese Wor1 („white“)
- 3) Wor1 je svým vlastním pozitivním transkripčním faktorem – jeho koncentrace roste a bílá buňka se stává šedou („opaque“). Upraveno podle [74].

#### 1.4.7.5. Genové rodiny spojené s virulencí *C. albicans*

##### **ALS („agglutinin-like sequence“)**

ALS je genová rodina, která kóduje osm velkých povrchových glykoproteinů *C. albicans*. Byla objevena na základě opakujících se charakteristických sekvencí, které jsou typické pro všechny její členy. Als1p je hyfálně specifický protein, jehož analog u *S. cerevisiae* slouží jako adhezni faktor, který drží pohromadě haploidní buňky při pohlavním rozmnožování kvasinek. *C. albicans* ale meiosu nepodstupuje a Als1p u ní slouží k adhezi na povrch epitelu [77].

Ostatní geny této rodiny se liší na základě počtu a uspořádání opakujících se charakteristických sekvencí a jejich delece obvykle vede ke snížení virulence *C. albicans*. *ALS3* je z 81% identický s *ALS1* [78]. *ALS2* je zřejmě potřebný pro zahájení hyfálního růstu a jeho delece vede ke zvýšení hladiny Als4p, takže *ALS4* může sloužit jako kompenzační gen [79].

##### **SAP („secreted aspartyl proteinase“)**

Sekretované aspartátové proteinasy jsou proteiny kódované genovou rodinou SAP. V první řadě slouží ke štěpení extracelulárních proteinů, jakožto zdroje dusíku pro vlastní růst. Jsou ale také významným virulentním faktorem kvasinek obecně, protože přispívají k degradaci epiteliálních, endoteliálních a možná také imunitních buněk [80]. Genová rodina *SAP*

obsahuje 10 genů, jejichž exprese je velmi rozdílně regulována v závislosti na prostředí a také na ostatních virulenčních faktorech (hyfální růst, adheze, biofilm) [81].

Expresce členů rodiny SAP je závislá na vnějších a vnitřních podmínkách (viz obr. 11, str. 29):

#### **SAP1-3 – specifické pro kvasinkovou buňku**

*SAP1* – regulace přes „white-opaque switching“, exprese charakteristická pro fenotyp „opaque“

*SAP2* – exprese pouze za přítomnosti extracelulárního proteinu, exprese charakteristická pro fenotyp „white“

*SAP3* – exprese spolu se *SAP2*, charakteristická pro fenotyp „opaque“

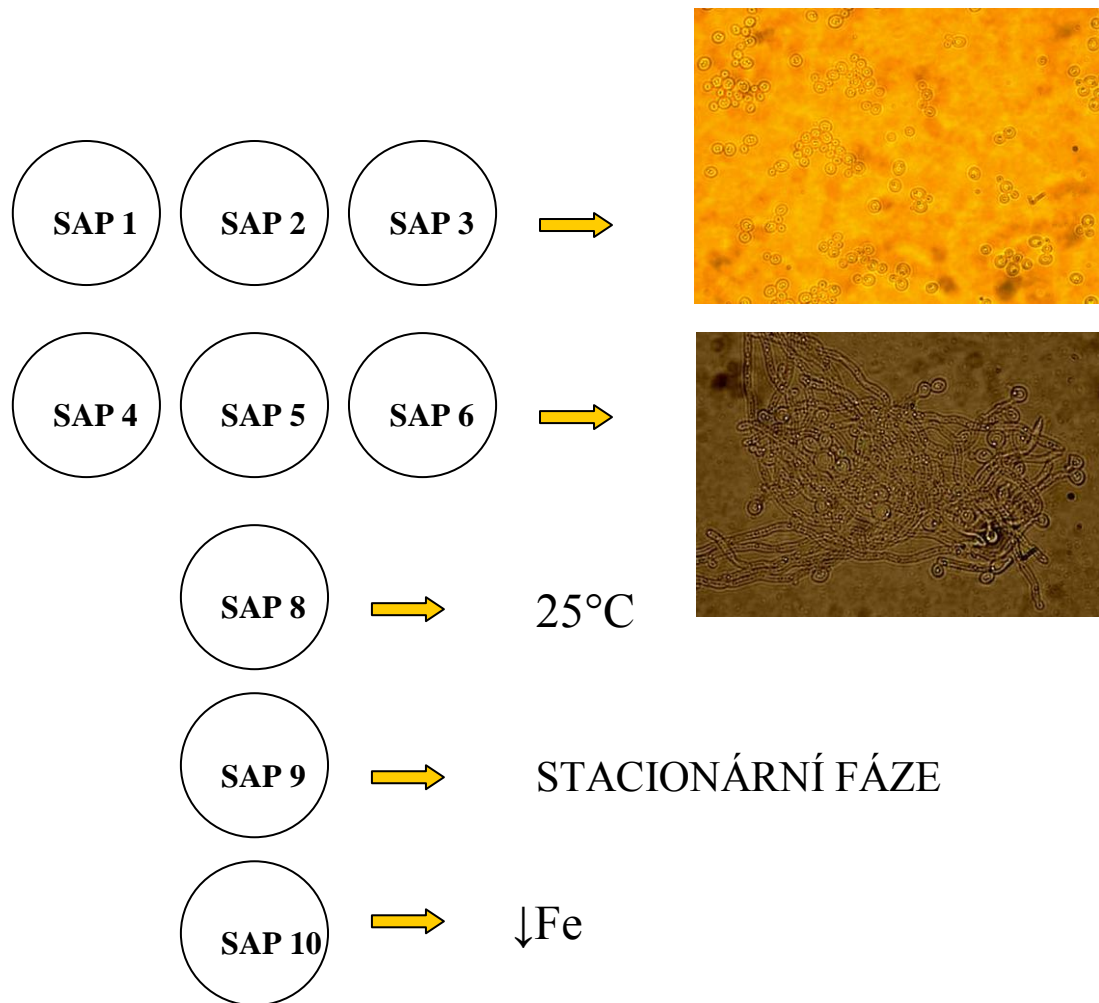
#### **SAP4-6 – hyfálně specifické, jsou regulovány změnou pH**

*SAP8* – regulace teplotou (více při 25°C) a možná i přes „white-opaque switching“, exprese charakteristická pro fenotyp „opaque“

*SAP9-10* – pravděpodobně nejsou sekretované, glykofosfatidylinositolová (GPI) kotva v buněčné membráně/stěně, role v adhezi [61, 81]

#### **Přenašeče ABC („ATP binding cassette“)**

Rodina přenašečů ABC je velmi rozsáhlá (minimálně 27 genů) a zahrnuje 6 podskupin. Podskupiny MDR (multidrug resistance), PDR (pleiotropic drug resistance), MRP/CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) a ALD (aldehyd dehydrogenasa) kódují transmembránové transportní proteiny, kdežto YEF3 (translační elongační faktor) a RLI (RNase L inhibitor) postrádají sekvenci kódující transmembránovou část. Jak již napovídají názvy jednotlivých podskupin, mnoho přenašečů ABC kóduje proteinové pumpy zodpovědné za rezistenci na antimykotika, například *CDR1* a *CDR2* (*CDR* = *Candida* drug resistance) Rizikovým faktorem rezistence *C. albicans* na azolová antimykotika je tedy právě zvýšená exprese těchto genů kvasinkou [62].



**obr. 11: Regulace genů z rodiny SAP**

Zatímco exprese *SAP1-3* je indukována v kvasinkových buňkách, exprese *SAP4-6* je zvýšena během hyfálního růstu. *SAP8* je regulován teplotou, *SAP9* je aktivní až v pozdní fázi růstu a *SAP10* potřebuje k indukci nízkou extracelulární hladinu železa. (upraveno podle [80])

### **MEP („ammonium permease“)**

Geny pro amonium permeasy jsou v genomu *C. albicans* zastoupeny ve větším počtu, než u *S. cerevisiae*. Exprese *MEP1* a *MEP2* se zvyšuje při nedostatku dusíku, takže *C. albicans* využije i dusík z amonných iontů, které jsou přítomny ve velmi malé koncentraci. *MEP2* také slouží jako induktor hyfálního růstu právě za podmínek nízké koncentrace dusíku v prostředí [82].

Jedná se o skupinu genů, kterou najdeme pouze u kvasinek a hub a mohla by tak posloužit jako cíl pro nová antimykotika [62].

## **OPT („oligopeptide transporters“)**

Oligopeptidové přenašeče jsou nezbytné, pokud jsou krátké peptidy jediným extracelulárním zdrojem dusíku. Při invazivním růstu *C. albicans* produkuje proteolytické enzymy a štěpí tak okolní tkáň. Krátké peptidy, které vznikají tímto štěpením, pak mohou být kandidou dále využity [62].

## **1.5. DNA čipy – princip metody**

Analýza transkriptomu pomocí DNA čipu (DNA microarray) označuje molekulárně-biologickou techniku, která umožňuje sledovat genovou expresi na úrovni celého genomu konkrétního organismu. Metoda je založena na hybridizaci testované DNA se sondou imobilizovanou na skleněném či silikonovém podkladu. Jedna sonda je tvořena několika jednovláknovými molekulami DNA oligonukleotidů stejného druhu a jeden čip může obsahovat desetitisíce až miliony takových sond. V podstatě tedy lze na povrch čipu imobilizovat celkovou genetickou informaci organismu.

DNA čipy lze připravit přímo ve výzkumných laboratořích, ale mnoho firem je dnes vyrábí komerčně. Výroba DNA čipů zahrnuje dva základní postupy:

### **1) Nanášení kapek na podklad**

- sonda je připravena mimo čip, často metodou PCR nebo přímou syntézou oligonukleotidu
- mikrokapka sondy je nanesena na povrch čipu manuálně nebo prostřednictvím robotického zařízení
- metoda využívaná pro přípravu vlastních sond ve výzkumných laboratořích [83]

### **2) Fotolitografická metoda**

- sonda je syntetizována přímo na povrchu čipu
- povrch čipu je pokryt fotosenzitivním materiálem - pokud na čip následně posvítíme, dojde k degradaci fotosenzitivního materiálu a po ponoření čipu do roztoku jednoho z nukleotidů se tento nukleotid naváže na místa odkrytá světelným zábleskem
- povrch čipu se znovu pokryje fotosenzitivním materiálem
- dále se celý postup opakuje s dalšími roztoky nukleotidů, dokud se nenasyntetizují všechny oligonukleotidové sondy na povrchu čipu

- metoda využívaná pro komerční výrobu čipů

Metody přípravy vzorků pro hybridizaci jsou blíže popsány v metodice. Na molekulární bázi tkví princip hybridizace v tvorbě vodíkových můstků mezi bázemi. Tyto vazby se tvoří mezi komplementárními i nekomplementárními vlákny, v druhém případě je však interakce příliš slabá a po promytí se vazby přeruší – pouze komplementární vlákno zůstane navázáno na konkrétní sondu.

Obecně lze při hybridizaci využít dvou základních postupů. Při **jednokanálovém** experimentu na povrch čipu hybridizujeme pouze jeden vzorek, při **dvoukanálovém** uspořádání hybridizujeme vzorky dva, které jsou různě značené. Dvoukanálové provedení má tu výhodu, že „ušetří“ jeden čip, což je výhodné z hlediska ceny. Navíc můžeme sledovat rozdíly v genové expresi relativně mezi dvěma různými vzorky. Nevýhodou je ale to, že pokud je jeden ze vzorků nekvalitní, znehodnotí výsledky celého experimentu [84].

## **2. MATERIÁL A METODY**

### **2.1. Chemikálie a přístroje**

#### **2.1.1. Běžné chemikálie**

Agarosa (Seakem LE)

Dimethylsulfoxid (Penta)

Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich)

*E,E*-farnesol (Sigma-Aldrich)

Ethanol-diamintetraoctová kyselina, sodná sůl, dihydrát (Sigma-Aldrich)

Ethanol pro UV spektroskopii (Penta)

Fenethylalkohol (Sigma-Aldrich)

Fenol:chloroform 5:1 (Sigma-Aldrich)

Formamid deionizovaný (Sigma-Aldrich)

Glukosa (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný (Penta)

Chlorid sodný (Penta)

Chloroform (Sigma-Aldrich)

Chloroform destilovaný analytický (Penta)

Kyselina citronová (Penta)

Kyselina chlorovodíková (Penta)

Octan sodný (Chemapol)

Oktadekan-1-ol (Sigma-Aldrich)

Sabouradův dextrosový agar (Himedia)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva)

Tris borátový-EDTA pufr (Sigma-Aldrich)

Voda Ultra PCR H<sub>2</sub>O (Top Bio)

YNB médium (Difco)

#### **2.1.2. Speciální chemikálie**

Cy3-dUTP (GE Healthcare)

Cy5-dUTP (GE Healthcare)

Deoxyribonukleotidy (Roche)  
DNA telecího brzlíku (Sigma-Aldrich)  
Hybridizační pufr EGT (ClinEuroDiag)  
Vzorkový pufr 2X RNA Loading Dye (Fermentas)  
Primer Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen)  
Primer Random hexamer (Roche)

### **2.1.3. Sady**

Izolace mRNA - Micro Fast Track 2.0 (Invitrogen)  
Purifikace cDNA - QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)  
Reverzní transkripce - Superscript III (Invitrogen), obsahuje Superscript III transkriptasu,  
5x First Strand (FS) Buffer, 0,1 M Dithiothreitol

### **2.1.4. Buněčný materiál**

*Candida albicans* HE 169 (z mykologické sbírky FN Olomouc)

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

### **2.1.5. Přístroje**

centrifuga Allegra X-15R (Beckman Coulter)  
centrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf)  
flow box (Clean Air)  
hmotnostní spektrometr 5975B MSD spojený s plynovým chromatografem  
inkubátor (Mettler)  
mikroskop IX2-UCB (Olympus)  
plynový chromatograf 7890A připojený k hmotnostnímu detektoru 5975C (Agilent  
Technologies)  
rotační třepačka Innova 44 (New Brunswick Scientific)  
scanner DNA čipů Gene Pix Professional 4200 A (Axon Instruments)  
spektrofotometr ND-1000 (Nanodrop)  
termocykler TC-3000X (Techne)

vodní lázeň TW8 (Julabo)

zdroj pro agarosovou elektroforesu Power Pack HC (BioRad)

### **2.1.6. Ostatní materiál**

DNA čipy *C. albicans* (ClinEuroDiag)

filtry 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex)

hybridizační kazety (ArrayIt)

krycí hybridizační sklíčka 60 mm x 24 mm (Sigma-Aldrich)

křemenná kapilární kolona DB-WAX (J & W Scientific)

skleněné korálky (Sigma-Aldrich)

## 2.2. CÍL PRÁCE

Základním cílem této práce bylo stanovit rozdíly v genové expresi kvasinky *C. albicans* kultivované v kokultuře s *P. aeruginosa* a na základě získaných dat tyto rozdíly vysvětlit a navrhnout, jakým způsobem bakterie *P. aeruginosa* ovlivňuje růst a životnost *C. albicans* na úrovni genové exprese.

Druhým cílem bylo analyzovat filtrovaná média po kultivaci *C. albicans* a *P. aeruginosa* a kokultury *C. albicans* s *P. aeruginosa* metodou plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie a určit kvantitativní a kvalitativní rozdíly v produkci malých molekul autoinduktorů.

## 2.3. Metodika

### 2.3.1. Kultivace mikroorganismů

Ze zamrazených vzorků mikroorganismů (-80°C) jsem očkovala kmen **HE 169** *C. albicans* a kmen **PAK** *Pseudomonas aeruginosa* na mikrobiologické misky se Sabouradovým dextrosovým agarem. Misky jsem inkubovala po dobu 48 hod při teplotě 37°C a posléze jsem je uskladnila za teploty 4 °C. Takto připravené nátěry jsem používala maximálně po dobu 1 týdne. Z nich jsem připravovala kapalná inokula. Kmen PAK jsem očkovala do média YNB-glc a kmen HE 169 do 10 x ředěného média YNB-glc. Buňky jsem kultivovala při 37 °C a 220 rpm na rotační třepačce po dobu 20 h. Poté jsem buněčnou suspenzi ředila médiem odpovídajícím danému inokulu tak, aby optická denzita při 600 nm dosahovala hodnot uvedených v tabulce 1.

tab. 1: Optická denzita inokulační suspenze

kmen	OD <sub>600</sub> inokula
<i>C. albicans</i> (HE 169)	~ 1,5
<i>P. aeruginosa</i> (PAK)	~ 0,5

OD<sub>600</sub> = optická denzita při 600 nm

Z takto připravených inokul jsem očkovala vždy 100 µl do 100 ml koncentrovaného média YNB-glc v Erlenmeyerových baňkách. Do první baňky jsem očkovala pouze inokulum *C.*

*albicans* HE 169 (kontrola), do druhé jsem očkovala *C. albicans* i *P. aeruginosa* PAK. Pro účely konstrukce růstové křivky a analýzu GC-MS jsem připravila i kulturu *P. aeruginosa*.

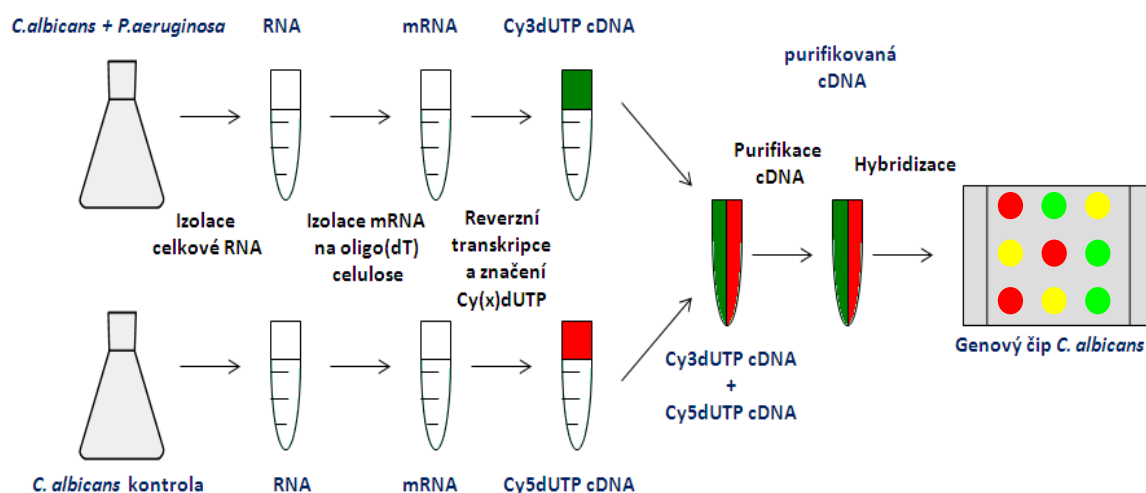
YNB-glc: 0,7 % YNB, 2 % glucosa, 20 mM citrát, pH upraveno roztokem NaOH na 5

### 2.3.2. Růstová křivka

V průběhu kultivace jsem odebírala vzorky kultur a spektrofotometricky jsem měřila optickou denzitu suspenzí při 600 nm ( $A_{600} = OD_{600}$ ). Z těchto hodnot jsem sestavila růstovou křivku (závislost  $OD_{600}$  na čase) pro kultury *C. albicans* a *P. aeruginosa* a kokulturu *C. albicans* + *P. aeruginosa*.

### 2.3.3. DNA čipy

viz obr. 12



obr. 12: Schéma přípravy genových čipů *C. albicans*

Hybridizaci na genový čip předchází izolace celkové ribonukleové kyseliny a následné mediátorové RNA (mRNA). Posléze je nezbytné přepsat mRNA na komplementární DNA (cDNA) a zároveň v průběhu reverzní transkripce označit vzorky fluorescenčními značkami Cy3-dUTP a Cy5-dUTP. Značená cDNA se po purifikaci nanáší na povrch DNA čipu, kde hybridizuje s imobilizovanými oligonukleotidovými sondami (geny *C. albicans*). Po skenování čipu získáme pro každý gen různou intenzitu signálu v zelené (Cy 3) a červené (Cy 5) oblasti fluorescence v závislosti na míře exprese určitého genu v daném biologickém systému (kontrola x kokultura).

### **2.3.3.1. Izolace celkové RNA**

V 800  $\mu$ l pufru TES (níže) jsem resuspendovala asi 100 mg biomasy, kterou jsem získala centrifugací suspenzní kultury (1000 g, 5 min, 4°C) *C. albicans* nebo kokultury *C. albicans* + *P. aeruginosa* s následným zamrazením pelety v kapalném dusíku. Tuto suspenzi jsem poté rovnoměrně rozdělila do dvou šroubovacích zkumavek, které obsahovaly 400  $\mu$ l fenol-chloroformu (5:1) a 200  $\mu$ l skleněných korálků. Zkumavky jsem okamžitě uzavřela a jejich obsah jsem promíchala na vortexu. Dále jsem vzorky umístila do vodní lázně temperované na 65 °C. Zde po dobu 30 min probíhala degradace buněčných stěn a následné oddělení RNA od proteinů a většiny DNA. Každých 5 min jsem zvyšovala účinnost tohoto procesu mícháním vzorků na vortexu po dobu 30 s.

V dalším kroku jsem inkubovala vzorky 30 min při teplotě -80 °C. Poté jsem je centrifugovala po dobu 15 min při 20 °C a 13000 rpm. Vodnou fázi jsem přenesla z každé zkumavky do nové šroubovací zkumavky s 400  $\mu$ l fenol-chloroformu. Její obsah jsem třikrát promíchala na vortexu, vždy po dobu 30 s, a dále jsem vzorky opět centrifugovala po dobu 15 min při 20 °C a 13000 rpm. Dále jsem celý krok od přenosu vodné fáze až po centrifugaci ještě dvakrát opakovala. Poté jsem vodnou fázi přidala k 300  $\mu$ l chloroformu, obsah jsem třikrát promíchala na vortexu, vždy po dobu 20 s, a vzorky jsem centrifugovala 2 min při 20 °C a 13000 rpm. Nakonec jsem vodnou fázi přidala do nové zkumavky k 600  $\mu$ l ethanolu a 30  $\mu$ l 3 M roztoku octanu sodného o pH 5,3. V tomto prostředí jsem srážela ribonukleovou kyselinu při teplotě -20 °C a zároveň jsem ji takto i dlouhodobě uchovávala.

**pufr TES: 10 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,5% SDS**

### **2.3.3.2. Kvantitativní a kvalitativní analýza vzorků RNA**

Nejprve jsem připravila vodné roztoky vzorků celkové RNA. Precipitovanou ribonukleovou kyselinu jsem oddělila z roztoku ethanolu a octanu sodného centrifugací, která probíhala po dobu 30 min při 4°C a 13000 rpm. Po odstranění supernatantu jsem pelety volně sušila, dokud se ethanol zcela nevypařil. Poté jsem každou peletu rozpustila v 52  $\mu$ l vody (Ultra PCR H<sub>2</sub>O) a vzorky jsem chladila na ledu.

### **Kvantitativní analýza**

Z každého vodného roztoku vzorku RNA jsem přidala 1  $\mu$ l do připravené zkumavky s 9  $\mu$ l vody (Ultra PCR H<sub>2</sub>O). Takto jsem připravila 10x ředěný roztok pro měření koncentrace RNA na přístroji Nanodrop. Koncentraci jsem změřila pro každý vzorek třikrát.

### **Kvalitativní analýza**

Metodou pro určení kvality vzorků RNA a její případné degradace byla agarosová elektroforesa. Nejprve jsem připravila 1,5 % agarosový gel smícháním a zahřátím agarosu bez obsahu RNAs s Tris borátovým-EDTA komerčním pufrům v Erlenmeyerově baňce. Po mírném ochlazení jsem gel nalila do připravené formy s vloženým hřebenem a nechala jsem ho ztuhnout.

K 1  $\mu$ l vzorku RNA jsem přidala 6  $\mu$ l formamidu a vzorky jsem denaturovala 10 min při teplotě 65 °C. Poté jsem přidala 1  $\mu$ l komerčního vzorkového pufru pro RNA elektroforesu, a každý vzorek jsem kvantitativně nanasla do jamek gelu. Elektroforesa probíhala v prostředí Tris borátového-EDTA pufru při napětí 50 V.

#### **2.3.3.3. Izolace mRNA pomocí sady „Micro Fast Track (MFT) 2.0“**

Pro účely hybridizace jsme potřebovali izolovat mRNA ze vzorků celkové ribonukleové kyseliny. Sada Micro Fast Track 2.0 pro izolaci mRNA je původně určena pro přímou izolaci mRNA z tkání, proto jsme mohli vynechat první kroky protokolu dodaného výrobcem a začali jsme přímo od inkubace vzorků celkové RNA s nosičem oligo dT.

#### **Změna oproti protokolu: Izolace mRNA**

Připravila jsem lyzační pufr smícháním 20  $\mu$ l proteiny „Protein Degradar“ (MFT) a 1 ml pufru „Stock Buffer“ (MFT). Lyzační pufr jsem smíchala s RNA do celkového objemu 1,1 ml tak, aby celkové množství RNA v každém vzorku bylo 600-800  $\mu$ g. Vzorky jsem inkubovala 5 min při 65°C a poté 1 min na ledě. Ke každému jsem pak přidala 64  $\mu$ l 5 M NaCl (MFT). Po promíchání jsem supernatant přenesla do zkumavky s nosičem „oligo(dT)celulosa“, kde jsem jej nechala inkubovat za mírného rotování po dobu 3 h při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace při 4000 g a po dobu 5 min a LT.

Promytí, eluce a precipitace již byla provedena dle komerčního protokolu. Vzorky izolované mRNA jsem uložila do mrazicího boxu (-80°C), kde jsem je zároveň dlouhodobě uchovávala.

Precipitovanou mRNA jsem centrifugovala po dobu 30 min při 4°C a 13000 rpm, Získanou peletu jsem následně vysušila a rozpustila v 10,5 µl vody. Dále jsem 0,5 µl z každého roztoku mRNA přidala k 4,5 µl vody a změřila jsem koncentraci vzorků mRNA na Nanodropu.

#### **2.3.3.4. Syntéza cDNA a značení**

Dalším krokem nezbytným pro hybridizaci vzorku na DNA čip byla reverzní transkripce mediátorové RNA na komplementární DNA a současně značení Cy3/Cy5-dUTP. Na následující reakci jsem použila takový objem vzorku mRNA, aby se jeho celkové množství pohybovalo v rozmezí 2-3 µg, ale aby bylo vždy stejné pro oba vzorky. Do každé zkumavky na PCR jsem pipetovala primery - 5 µl randomních hexamerů ( $c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) a 4 µl „oligo (dT)“ ( $c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), dále vypočítané množství mého vzorku mRNA a vodu do celkového objemu 32 µl. Roztoky jsem inkubovala 10 min při 70°C a poté jsem je ochladila na ledu (1 min). Dále jsem přidala 2 µl Cy3-dUTP k jednomu vzorku mRNA (HE 169 kontrola) a 2 µl Cy5-dUTP k druhému vzorku (HE 169 + PAK) nebo naopak.

Ke každému vzorku mRNA jsem posléze přidala 24 µl roztoku, který jsem připravila z:

25 µl pufru FS (first strand buffer, Superscript)

12,5 µl DTT (dithiothreitol, Superscript)

6,25 µl dNTP ( $C_{\text{dATP}}, C_{\text{dCTP}}, C_{\text{dGTP}} = 2,5 \text{ mM}$ ,  $C_{\text{dTTP}} = 1,25 \text{ mM}$ )

6,25 µl reverzní transkriptasy (200 U/ µl, Superscript)

Vzorky jsem vložila do termocykleru a nastavila tento program:

- 23°C 12 min
- 42°C 2,5 hrs
- PAUZA

Přerušila jsem program a do každé zkumavky jsem přidala 3 µl 20 mM EDTA a 30 µl 0,1 M NaOH, abych zastavila reakci.

- 70°C 10 min

Poté jsem do každé zkumavky přidala 30 µl 0,1 M HCl pro neutralizaci NaOH.

### **2.3.3.5. Srážení a purifikace cDNA s použitím sady „QIAquick PCR Purification Kit“**

Oba vzorky cDNA získané předchozí reakcí (značené Cy3-dUTP a Cy5-dUTP) jsem smíchala v nové zkumavce. Přidala jsem 24  $\mu$ l 3 M octanu sodného (pH 5,3) a 660  $\mu$ l 96 % ethanolu. Obsah zkumavky jsem promíchala a zkumavku jsem inkubovala 30 min při teplotě -80 °C. Poté jsem roztok cDNA centrifugovala po dobu 30 min při 4 °C a 13000 rpm. Po odstranění supernatantu jsem peletu rozpustila ve 40  $\mu$ l vody a přidala jsem 4  $\mu$ l 3 M octanu sodného a 200  $\mu$ l pufru PB z purifikační sady QIAquick. Vzorek jsem přenesla na kolonku (QIAquick) a centrifugovala jsem jej po dobu 1 min při 13000 rpm a laboratorní teplotě. Poté jsem na kolonku pipetovala 600  $\mu$ l promývacího pufru PE (QIAquick) a opět jsem ji centrifugovala (1 min, 13000 rpm). Po odstranění pufru, který protekl kolonou, jsem centrifugovala obsah kolonky ještě jednou po dobu 2 min, abych odstranila i poslední zbytky promývacího pufru. Poté jsem kolonku přemístila do nové zkumavky a provedla jsem eluci cDNA 30  $\mu$ l vody temperované na 37 °C. Tu jsem nejprve inkubovala po dobu 1 min na kolonce a následně jsem jímala purifikovanou cDNA při 13000 rpm (1 min). Roztok cDNA jsem poté nanasla ještě jednou na kolonku a znovu centrifugovala při 13000 rpm (1 min).

### **2.3.3.6. Hybridizace na DNA čip *C. albicans***

Hybridizační pufr jsem inkubovala 30 s při 65 °C. Připravila jsem hybridizační roztok – k 30  $\mu$ l vzorku značené cDNA přidala 60  $\mu$ l hybridizačního pufru a 5  $\mu$ l DNA telecího brzlíku (o koncentraci 10 mg/ml). Roztok jsem pak inkubovala 2 min při 65 °C. Do hybridizační kazety jsem nejprve pipetovala 15  $\mu$ l vody do dvou jamek a poté jsem dovnitř vložila hybridizační sklíčko. Na něj jsem pipetovala roztok cDNA, který jsem přikryla krycím sklíčkem. Po odstranění bublin jemným poklepáváním na krycí sklo jsem kazetu uzavřela a zašroubovala a vložila jsem ji do vodní lázně temperované na 37 °C, kde jsem ji ponechala 16 hodin.

Po inkubaci jsem za pomoci pinzety vložila DNA čip do zkumavky (50 ml) s 50 ml 0,2 x SSC + 0,1 % SDS, kde jsem opatrně odstranila krycí sklo. Pinzetou jsem pak čip přemístila do druhé zkumavky se stejným roztokem, kde jsem jej inkubovala 5 min za pomalého rotování. Dále jsem čip obdobně promývala v roztoku 0,2 x SSC po dobu 5 min a každou minutu jsem zkumavku obrátila.

Čip jsem nakonec osušila jemným klepáním na buničinu a pinzetou jsem ho přemístila do nové prázdné zkumavky. Zbytek promývacího roztoku jsem odstranila centrifugací (5 min, 1000 rpm, LT). Nakonec jsem sklíčko vložila do krabičky a tu jsem překryla alobalem.

**2 x SSC: vodný roztok 17,5 g/l NaCl; 8,8 g/l NaAc; úprava pH HCl na 7**

**1 % SDS: 1% vodný roztok dodekansulfátu sodného**

Promývací roztoky jsem připravila ze zásobních roztoků 2x SSC a 1 % SDS a sterilní destilované vody a následně jsem je filtrovala přes 0,22 µm filtry.

### **2.3.3.8. Skenování DNA čipu**

DNA čip jsem skenovala na přístroji Gene Pix Professional 4200 A. Parametr „PMT Gain“ jsem nastavila vždy nejprve na 900 pro červenou a 700 pro zelenou barvu a poté jsem intenzitu snižovala, abych eliminovala body s vysokou intenzitou fluorescence a získala skeny v různé intenzitě. Dále jsem nastavila tyto parametry:

Power	100
Velikost pixelů	10 µm
Focus Position	- 50 µm

### **2.3.3.9. Vyhodnocení dat**

Pro každý čip jsem získala dva obrázky ve formátu „TIF“, které odpovídají intenzitám fluorescence Cy3 a Cy5 jednotlivých genů imobilizovaných na čipu.

V programu **TIGR Spotfinder** jsem otevřela naskenovaný čip (TIF) v obou barvách současně a nasadila jsem na něj anotovanou mřížku od výrobce ve formátu „GAL“. V programu jsem nastavila minimální velikost bodů 7 a v nabídce „Cell Editor“ jsem zadala možnost „Flag“ a „Contour“. Takto jsem postupně vybrala body, které nesvítí a odebrala jsem je ze souboru dat. Body, jejichž intenzita byla dostatečná, byly označeny konturou a takto zpracovány pro další postup. Výsledný soubor jsem uložila do formátu „MEV“.

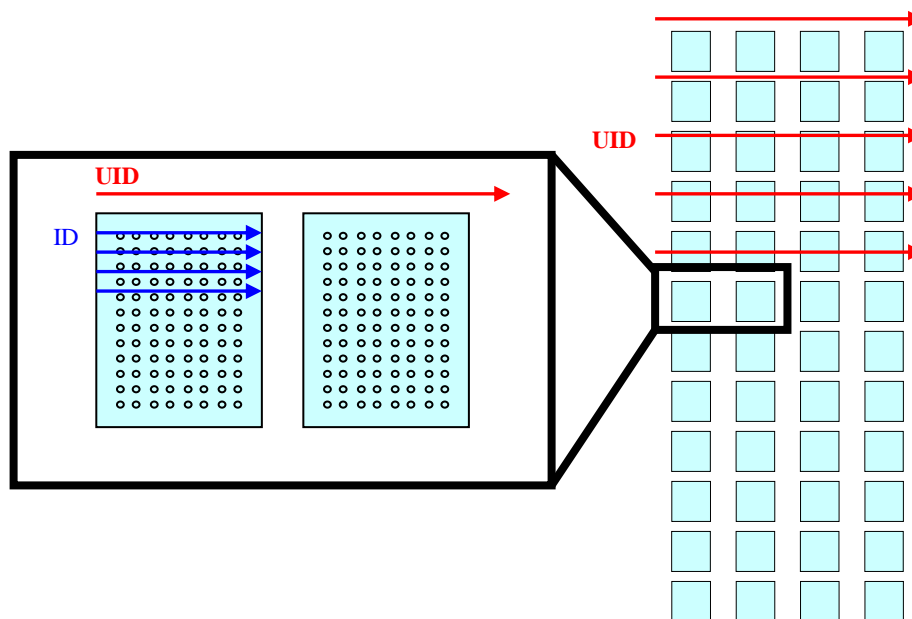
Soubor „MEV“ jsem otevřela v programu **MS Office Excell** a data jsem upravila tak, aby identifikační číslo **anotační mřížky (ID)** odpovídalo identifikačnímu číslu přiřazenému programem **TIGR Spotfinder (UID)** (viz obr. 13, str. 42). Zároveň jsem určila jako hlavní soubor dat mediány A (Cy3) a B (Cy5) a název Med A a Med B jsem přepsala na IA a IB.

V dalším kroku jsem provedla normalizaci dat v programu **TIGR MIDAS** . Nastavila jsem tyto parametry:

Read single data file → One Bad Channel Tolerance Policy = Generous

Lockfit normalization → Mode = global → Output Processed File → Execution

Po normalizaci dostal soubor novou koncovku „MDS“.



**obr. 13: Rozdílný systém určení identifikačního čísla v anotační mřížce a v programu TIGR Spotfinder**

Program TIGR Spotfinder přiřazuje genům identifikační číslo odlišně, než anotační mřížka. Geny jsou na čipu immobilizovány ve 48 obdélníkových oblastech. Program TIGR Spotfinder určuje UID tak, že čísluje celou řadu čipu nezávisle na obdélníkových oblastech. Anotační mřížka však očíslovává nejprve celou první obdélníkovou oblast a teprve potom přechází na druhou. Data se proto musí vhodně seřadit v souboru, aby nedošlo k chybě přiřazení genu a jeho signálu.

Normalizovaný soubor „MDS“ jsem otevřela v programu **MS Office Excell** a uměle jsem stanovila minimální hodnotu mediánů na 400 pro nenulové hodnoty menší, než 400 (korekce). Data jsem pak seřadila tak, aby byly hodnoty pro dvojice stejných genů uvedené vedle sebe ve stejném řádku. Do souboru jsem dále kopírovala anotační data od výrobce.

Nakonec jsem spočítala poměr intenzity fluorescence Cy5/Cy3 (IB/IA) pro celý soubor dat a z výsledků pro dva body charakterizující dva shodné geny jsem spočítala průměr. Průměrné hodnoty jsem seřadila od nejnižší po nejvyšší. Zvýšenou expresi ve vzorku

značeném Cy3-dUTP jsme stanovili pro hodnoty do 0,5 – 0,6; exprese zvýšená ve vzorku značeném Cy5-dUTP pak byla určena pro hodnoty nad 1,8.

### 2.3.3.10. Statistické vyhodnocení dat

Výsledky DNA čipů pro různé biologické repliky nebo opačné barvení jsem dále vyhodnotila funkcí matematické statistiky *t* test v programu **MS Office Excell**. Pro účely této matematické operace jsem podíl intenzity fluorescence (IB/IA neboli Cy5/Cy3) pro data pocházející z čipu o značení „Cy3-dUTP-kontrola“ přepočítala na kladný logaritmus. Data, která jsem získala z experimentu o opačném barvení (Cy5dUTP-kontrola), jsem přepočítala na **záporný** logaritmus. Parametry funkce jsou uvedeny v tab. 2.

tab. 2: Parametry funkce *t* test v programu MS Office Excel

FUNKCE	POLE1	POLE2	STRANY	TYP
TTEST	$\log_2$ (IB/IA)	0	2	3

typ 3 = dvouvýběrový s nerovností rozptylů

Stanovili jsme 5 % hladinu významnosti. Označila jsem data, jejichž hodnota signifikance byla nižší, než 5 % - zde byla zamítnuta nulová hypotéza a bylo potvrzeno, že rozdíly nebyly náhodné. Dále jsem vypočítala průměr z logaritmičkových hodnot odpovídajících si dat a ten jsem převedla zpět na hodnotu průměrného podílu IB/IA. Data jsem poté seřadila podle IB/IA od nejmenších až po největší. Následně jsem označila data s hodnotou IB/IA menší, než **0,67** a větší, než **1,5** (statistické vyhodnocení umožňuje rozšířit interval určený pro data z jediného čipu). Pouze data, která se nacházela v těchto dvou rozmezích, a zároveň splňovala podmínku hladiny signifikance < 5 %, byla vyhodnocena jako vyhovující. Konkrétní geny, jejichž exprese se signifikantně zvyšuje nebo snižuje v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* oproti kontrolní kultuře *C. albicans*, jsou popsány v tabulce 4, str. 49-51.

### 2.3.4. Kultivace *C. albicans* v přítomnosti *P. aeruginosa* a fluconazolu

Do dvou Erlenmeyerových baněk, které obsahovaly 10 ml média YNB-glc, jsem očkovala inokula mikroorganismů (viz kap. 2.3.1. Kultivace mikroorganismů). Do první baňky, která sloužila jako kontrola, jsem pipetovala 100  $\mu$ l inokula *C. albicans* HE 169. Do druhé baňky jsem pipetovala 100  $\mu$ l inokula *C. albicans* HE 169 a 100  $\mu$ l inokula *P. aeruginosa* PAK. Kultury jsem inkubovala po dobu 4 h za podmínek uvedených výše (viz kap. 2.3.1.

Kultivace mikroorganismů). Po uplynutí této doby jsem asepticky odebrala 5 ml z každé kultury, které jsem pipetovala do sterilních Erlenmeyerových baněk. Tak jsem získala dvě série kultur. Ke vzorkům první série jsem přidala roztok antimykotika fluconazolu v dimethylsulfoxidu (DMSO) tak, aby celková koncentrace fluconazolu v kultuře byla 32 µg/ml [85]. Druhá kultivační série posloužila jako kontrola. Kultury jsem dále kultivovala za standardních podmínek (37°C, 220 rpm) a v průběhu kultivace jsem sledovala růstové parametry – optickou denzitu (OD<sub>600</sub>), mikroskopické pozorování, semikvantitativní test přežití.

#### **2.3.4.1. Semikvantitativní test přežití**

Semikvantitativní test přežití *C. albicans* byl realizován prostřednictvím roztírání kapalných kultur na agar s obsahem YPD a antibiotik gentamicinu (30 µg/ml) a tetracyklinu (60 µg/ml). V různých časových bodech jsem odebírala vzorky kultur, které jsem 1000 krát ředila. Z takto ředěných vzorků jsem nanášela 5 µl na mikrobiologickou misku s YPD agarem a antibiotiky. Každý vzorek jsem roztírala ve třech replikách. Misky jsem posléze inkubovala 24 h při 37°C a poté jsem počítala kolonie kandid (colony forming unit - CFU/µl), které na agaru narostly. Spočítala jsem průměrnou hodnotu CFU/µl ze tří replik:  $CFU_{\text{prům}} = (CFU_1 + CFU_2 + CFU_3) / 3$

a dále průměrnou směrodatnou odchylku:  $\Delta_{\text{průmCFU}} = (\Delta_1 + \Delta_2 + \Delta_3) / 3$  kdy  $\Delta_x = CFU_x - CFU_{\text{prům}}$

a dále relativní odchylku měření:  $\delta = \Delta_{\text{průmCFU}} / CFU_{\text{prům}}$ .

Výsledky jsem zanesla do sloupcového grafu.

#### **2.3.4.2. Analýza kultivačních médií metodou plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)**

Kultivační podmínky byly voleny podle kapitoly 2.3.1. Kultivace mikroorganismů. Po 20 h kultivace jsem kultury centrifugovala po dobu 10 min při 4000 g a 4°C. Vodnou fázi jsem posléze filtrovala přes 0,22 µm filtry, abych odstranila zbylé buňky.

Vzorky filtrovaných médií a také vzorek čerstvého média YNB-glc jsem dále vytřepávala do chloroformu p.a. (v poměru 6 ml média na 5 ml chloroformu), který obsahoval standard oktadekan-1-ol o koncentraci 10 µg/ml. Po vytřepávání jsem nechala obsah dělicí nálevky odstát a poté jsem oddělila chloroformovou fázi do skleněných vialek s teflonovým víčkem. Mezi vytřepáváním jednotlivých vzorků jsem dělicí nálevku promývala potravinářským lihem a čistým chloroformem.

Chloroformové extrakty byly nejprve prekoncentrovány odpařením pod proudem dusíku na objem cca 0.5 ml. Dr. Vladimír Vrkoslav provedl analýzy GC/MS na plynovém chromatografu 7890A, který byl připojen k hmotnostnímu detektoru 5975C vybavenému elektronovou ionizací (EI) a kvadrupolovým analyzátozem. Pro separaci byla použita křemenná kapilární kolona DB-WAX (30 m × 250 μm, tloušťka filmu 0,25 μm). Měření probíhalo za konstantního průtoku He 1ml/min. Teplota nástřikové komory byla nastavena na 240°C. Do nástřikové komory byly vstříkovány 2 μl vzorku při nastavení nástřikové techniky „split“ 1:10. Teplota chromatografické pece byl naprogramována takto: počáteční teplota 60°C byla udržována po dobu 2 min, pak teplota stoupala rychlostí 7°C/min do 250°C. Maximální teplota byla udržována 10 min. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 230°C a teplota analyzátoru byla 150°C. Standardní 70 eV EI spektra byla měřena v rozsahu 25-600 m/z.

Naměřená data byla vyhodnocena v programu Enhanced Data Analysis (Agilent Technologies). K identifikaci chemických sloučenin byla použita knihovna NIST verze 2.0. Identifikace nejdůležitějších sloučenin byla navíc potvrzena srovnáním spekter a retenčních časů sloučenin identifikovaných ve vzorku se zakoupenými standardy (*E,E*-farnesol, fenethylalkohol). Relativní kvantifikace vybraných sloučenin byla provedena vzhledem k vnitřnímu standardu oktadekan-1-olu.

Pro každý vzorek byly provedeny tři analýzy GC/MS a pro každý chromatografický pík (zóna) byla integrační metodou spočítána jeho celková plocha. Plochu každé zóny (*A*) jsem dala do poměru s plochou zóny standardu oktadekan-1-olu a tak jsem získala relativní hodnotu koncentrace daného analytu ve vzorku. Ze tří replik jsem spočítala průměrnou hodnotu poměru plochy zóny analytu ku standardu ( $A_a/A_s$ ):

$$A_a/A_s \text{ prům} = (A_a/A_{s1} + A_a/A_{s2} + A_a/A_{s3}) / 3$$

a dále průměrnou směrodatnou odchylku měření:

$$\Delta_{\text{prům} A_a/A_s} = (\Delta_1 + \Delta_2 + \Delta_3) / 3 \text{ kdy } \Delta_x = A_a/A_{s x} - A_a/A_{s \text{ prům}}$$

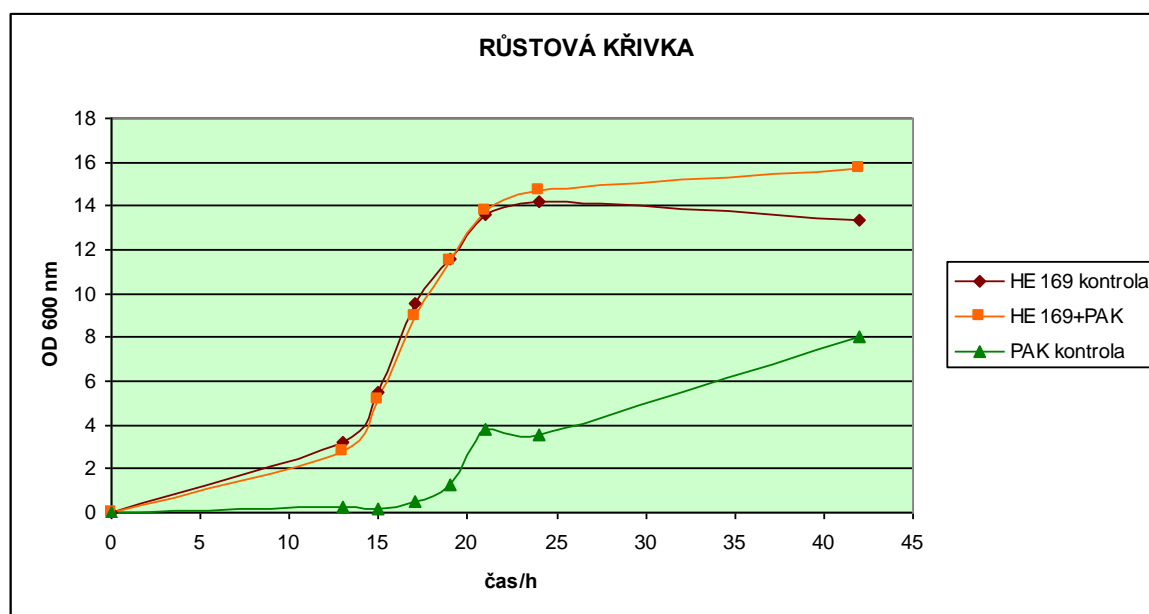
a dále relativní odchylku měření:

$$\delta = (\Delta_{\text{prům} A_a/A_s}) / (A_a/A_{s \text{ prům}}).$$

## 3. VÝSLEDKY

### 3.1. Růstová křivka

Na základě spektrofotometrických dat jsem sestavila růstové křivky kultur mikroorganismů (viz obr. 14).



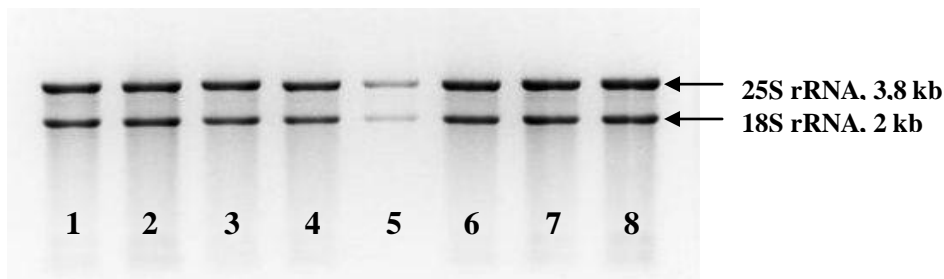
obr. 14: Růstová křivka kultur *C. albicans* (HE 169 kontrola), *P. aeruginosa* (PAK kontrola) a kokultury *C. albicans* + *P. aeruginosa* (HE 169+PAK) v médiu YNB-glc.

Růstová křivka kontrolní kultury *C. albicans* i kokultury *C. albicans* + *P. aeruginosa* si navzájem odpovídají až na mírný pokles optické denzity (OD<sub>600</sub>) v kontrole ve stacionární fázi. Malý vliv bakterie na optickou denzitu v kokultuře je zřejmý i z růstové křivky *P. aeruginosa*, protože OD<sub>600</sub> je v této kultuře zhruba 3 x menší, než v kontrole *C. albicans* a kokultuře (viz obr. 14). Ve stacionární fázi zde však dochází k dalšímu nárůstu optické denzity, podobně jako v kokultuře – růstová křivka kokultury tedy může odrážet opožděný růst *P. aeruginosa*.

### 3.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza vzorků RNA

Na obr. 15 (str. 47) je záznam agarosové elektroforézy vzorků RNA, které byly izolovány horkým fenol-chloroformem (5:1) ze směsné biomasy. Hlavním signálem každého vzorku RNA na agarosové elektroforéze jsou ribosomální podjednotky. Kvasinkový ribosom se

skládá z velké ribosomální podjednotky o velikosti 3,8 kb (25S) a malé ribosomální podjednotky o velikosti 2 kb (18S). DNA byla zjevně úspěšně odstraněna během izolace RNA a její signál tedy na agarosovém gelu nevidíme. Bakteriální ribosomální podjednotky mají velikost 2,9 kb (23S) a 1,5 kb (16S) a jejich signál zde rovněž není patrný, takže bakteriální RNA pravděpodobně nebyla izolována společně s kvasinkovou.



**Obr.15: Agarosová elektroforesa vzorků RNA**

vzorky 1, 2, 3, 4 – kontrolní kultura *C. albicans* (HE 169); 5,6,7,8 – kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa* (HE 169 + PAK). Každý vzorek byl izolován z kvasinkové biomasy o hmotnosti 50 mg.

V tabulce 3 (str. 48) je uvedena koncentrace RNA naměřená na přístroji Nanodrop v jednotlivých vzorcích a také jejich čistota (znečištění proteiny, fenolem). Koncentrace RNA byla dostatečná pro další postup, kterým je izolace mRNA a vyžaduje pro každý vzorek celkové množství RNA 600 – 800  $\mu\text{g}$ . V tomto experimentu jsem tak měla k dispozici dohromady 784  $\mu\text{g}$  RNA ve vzorku kontroly *C. albicans* a 771  $\mu\text{g}$  RNA ve vzorku kokultury *C. albicans* + *P. aeruginosa* (každý vzorek měl objem 50  $\mu\text{l}$ ).

Z tabulky 3 (str. 48) a obr. 15 vyplývá, že vzorky RNA měly dostatečnou čistotu (na základě poměru  $A_{260}/A_{280}$ ) a až na vzorek HE 169 + PAK 1 i poměrně vysokou koncentraci ribonukleové kyseliny. Během izolace došlo u tohoto vzorku pravděpodobně k chybě při pipetování nebo úniku kapaliny během třepání na vortexu.

tab. 3: Koncentrace ribonukleové kyseliny (RNA)

vzorek	c <sub>1</sub> [ng/μl]	c <sub>2</sub> [ng/μl]	c <sub>3</sub> [ng/μl]	c <sub>prům</sub> [ng/μl]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	m [μg]
HE 169 ct 1	4250	4360	4270	4293	2,21	215
HE 169 ct 2	4110	3850	3950	3970	2,21	199
HE 169 ct 3	4090	4000	3960	4017	2,21	201
HE 169 ct 4	3340	3410	3410	3387	2,26	169
HE 169+PAK 1	1530	1600	1561	1564	2,31	78
HE 169+PAK 2	3774	3597	3607	3659	2,24	183
HE 169+PAK 3	4484	4351	4262	4366	2,21	218
HE 169+PAK 4	6077	5667	5756	5833	2,27	292

vzorky 1, 2, 3, 4 – kontrolní kultura *C. albicans* (HE 169); 5,6,7,8 – kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa* (HE 169 + PAK), koncentrace každého vzorku RNA byla měřena třikrát (c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub>) a výslednou hodnotou byl stanoven aritmetický průměr těchto hodnot (c<sub>prům</sub>). Poměr absorbance vzorku při 260 nm a 280 nm udává znečištění RNA proteiny – za čistý vzorek lze považovat RNA o A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 2.

### 3.3. Změny na úrovni genové exprese *C. albicans* v kokultuře

#### *C. albicans* + *P. aeruginosa*

S využitím DNA čipů *C. albicans* jsme zmapovali rozdíly v genové expresi kvasinky *C. albicans*, která byla kultivována v přítomnosti bakterie *P. aeruginosa* (kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa*).

V tabulce 4 (str.49-51) je uveden souhrn všech genů, jejichž exprese byla ovlivněna interakcí *C. albicans* s bakterií *P. aeruginosa* během kultivace v médiu YNB-glc. Tento souhrn je výsledkem statistického vyhodnocení dat ze 7 DNA čipů z 5 biologických replik (viz kap. 2.3.3.10. Statistické vyhodnocení dat). Uvedeny jsou pouze geny se shodou na 5 % hladině významnosti, jejichž exprese se v kokultuře změnila  $\geq 1,50$  krát. Z celkového počtu 107 genů, jejichž exprese byla ovlivněna kokultivací *C. albicans* s *P. aeruginosa*, byla exprese 59 genů snížena oproti kontrole a exprese 48 genů byla oproti kontrole naopak zvýšena.

Mezi geny, jejichž exprese byla v kokultuře s bakterií snížena, byl nejvíce ovlivněn neznámý gen s označením orf19.4942, jehož exprese byla potlačena 3,17 krát. Na druhé straně, jiný gen s neznámou funkcí s označením orf19.4129, byl aktivován 2,09 krát více

v kokultuře oproti kontrolní kultuře *C. albicans*. Geny s neznámou funkcí tvoří významnou součást těchto výsledků (viz obr. 16, str. 52).

**tab. 4: Specifické změny v genové expresi *C. albicans* v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa***

Gen	Funkce	Změna exprese
<b>Buněčná stěna (BS)</b>		
<i>C.a. KRE5</i>	biosyntéza 1,6-β-D-glukanu	-1,56
<i>C.a. CRH11</i>	protein upevněný GPI kotvou v BS	-1,92
ortolog <i>S.c. MNT2</i>	α-1,3-mannosyltransferasová aktivita, O-glykosylace proteinů BS	+1,60
<b>Cytoplasmatická membrána (CM)</b>		
<i>C. a. HSX11</i>	glucosylceramide synthasa	-1,69
<i>C. a. orf19.1691</i>	necharakterizovaný protein CM, ortolog <i>S.c. RCF2</i> je podjednotkou cytochrom c oxidasy	+1,71
<b>Cytoskelet</b>		
ortolog <i>S.c. SPC97</i>	strukturní složka cytoskeletonu, lokalizace v SPB	+1,70
<i>C. a. BNR1</i>	formin, polymerizace aktinu, hyfální forma?	+1,64
ortolog <i>S.c. DYN2</i>	lehký řetězec cytoplasmatického dyneinu	+1,60
<b>Metabolismus mastných kyselin a lipidů</b>		
<i>C.a. GPI1</i>	účast na syntéze GPI (předpokládaná)	+1,54
<i>C.a. CHO2</i>	fosfatidyl-ethanolamin N-methyltransferasa (předpokládaná)	+1,52
<b>Transport proteinů</b>		
ortolog <i>S.c. TIM17</i>	proteinový kanál, transport proteinů do mitochondriální matrix	-1,57
ortolog <i>S.c. YIP3</i>	účastní se transportu proteinů z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu	-1,89
ortolog <i>S.c. NIC96</i>	import proteinů do jádra, organizace jaderných pórů	+1,66
ortolog <i>S.c. VPS5</i>	transport z prevakuolárního kompartmentu do Golgiho aparátu	+1,51
<b>Transport malých molekul</b>		
<i>C.a. SFC1</i>	přenašeč sukcinát/fumarát (předpokládaný)	-1,51
<i>C.a. CRC1</i>	karnitinový přenašeč vnitřní mitochondriální membrány	-1,55
<i>C.a. FRP6</i>	přenašeč amoniaku (předpokládaný)	-1,62
ortolog <i>S.c. VBA5</i>	protein cytoplasmatické membrány z rodiny přenašečů MFS (major facilitator superfamily)	-1,77
<i>C.a. CDR1</i>	efluxová pumpa z rodiny ABC (ATP-binding cassette)	+1,62
<b>Metabolismus aminokyselin a peptidů</b>		
<i>C.a. ARO2</i>	chorismát synthasa (předpokládaná)	-1,58
<i>C.a. GPX1</i>	podobný glutathion synthase	-1,67
<i>C.a. ARO7</i>	chorismát mutasa (předpokládaná)	-1,75
<i>C.a. DAO2</i>	oxidace D-aminokyselin (předpokládaná)	-1,98

<b>Metabolismus sacharidů</b>		
<i>C.a. GCA1</i>	pravděpodobně glucoamylasa, adhezin?	+1,53
<b>Aerobní metabolismus</b>		
<i>C.a. IDP2</i>	isocitrát dehydrogenasa (předpokládaná)	-1,77
<i>C.a. ICL1</i>	isocitrát lyasa (glyoxylátový cyklus)	-2,17
<b>„Mating“, WOS, signalizace</b>		
<i>C.a. AXL1</i>	endoproteasa (předpokládaná)	
	ortolog <i>S.c. AXL1</i> aktivuje feromon a jeho štěpením na N-konci	+1,70
ortolog <i>S.c. YRB30</i>	protein vázající GTP, regulace GTPas	+1,56
ortolog <i>S.c. SWS2</i>	kontrola sporulace - ribosomální protein	-1,73
<i>C.a. SST2</i>	regulátor G-proteinu, „mating pathway“	-2,63
<b>Mitóza</b>		
ortolog <i>S.c. TOP3</i>	aktivita DNA topoisomerasy I	+1,62
<i>C.a. SEP7</i>	septin	+1,60
ortolog <i>S.c. HOF1</i>	kóduje protein potřebný pro cytokinezi	+1,51
<b>Chromatin a struktura chromozomu</b>		
Ortolog <i>S.c. RSC4</i>	aktivita DNA translokasy, vazba na acetyl-lysinové zbytky histonů	-1,52
<i>C.a. SIR2</i>	umlčování rDNA, homolog <i>S.c. HST1</i> má aktivitu histon deacetylasy	-2,40
<i>C. a. POB3</i>	ortolog <i>S.c. POB3</i> - asociace s chromatinem a reorganizace nukleosomu	+1,53
<b>Replikace DNA a metabolismus nukleotidů</b>		
ortolog <i>S.c. MCM10</i>	role v iniciaci DNA replikace	+1,56
<i>C.a. ADE2</i>	fosforibosyl-aminoimidazol karboxylasa, biosyntéza adeninu	+1,55
<b>Transkripce</b>		
ortolog <i>S.c. SPT6</i>	transkripční elongační faktor	-1,52
<i>C.a. MBF1</i>	transkripční koaktivátor	-1,60
<i>C.a. EFH1</i>	transkripční aktivátor	-1,63
<i>C.a. RAP1</i>	transkripční regulátor, vazba na telomery	+1,63
<i>C.a. RPC31</i>	podjednotka RNA polymerasy III (předpokládaná)	+1,53
ortolog <i>S.c. CAF40</i>	reguluje transkripci z promotoru RNA polymerasy II	+1,52
ortolog <i>S.c. DIB1</i>	role v sestřihu mRNA prostřednictvím spliceosomu	+1,52
<b>Proteosyntéza</b>		
<i>C.a. RLP24</i>	kóduje ribozomální protein, <i>S.c. RLP24</i> se účastní biogeneze velké podjednotky ribozomu	-1,50
ortolog <i>S.c. SOF1</i>	účast na syntéze 40S ribozomální podjednotky	-1,52
<i>C.a. RPP2B</i>	reguluje elongační fázi translace	-1,57
<i>C.a. TIF11</i>	kóduje translační iniciační faktor eIF1a	-1,60
ortolog <i>S.c. AIM23</i>	kóduje mitochondriální translační iniciační faktor III	+1,75
ortolog <i>S.c. MTR4</i>	kóduje ATP-dependenční 3'-5' RNA helicasu z rodiny DEAD-box	+1,64
ortolog <i>S.c. UTP30</i>	kóduje podjednotku 90S preribosomálního komplexu	+1,61
ortolog <i>S.c. RRP3</i>	ATPasová aktivita, skládání malé ribozomální podjednotky	+1,60
ortolog <i>S.c. KRI 1</i>	endonukleasa, oddělení malé ribozomální podjednotky od 5,8S rRNA	+1,54
ortolog <i>S.c. RSM10</i>	mitochondriální protein malé ribozomální podjednotky	+1,52

## Modifikace a degradace

### proteinů

ortolog <i>S.c.</i> <i>RUB1</i>	protein ubiquitinového typu podobný lidskému NEDD8	-1,54
ortolog <i>S.c.</i> <i>UBX5</i>	regulace proteolýzy proteinů prostřednictvím ubiquitinilace	-1,55
ortolog <i>S.c.</i> <i>TRE2</i>	cílený transport proteinů do vakuoly, proces spjatý s ubiquitinilací	-1,66
<i>C.a.</i> <i>VPS8</i>	fúze endosomálního váčku s vakuolou	-1,79
<i>C.a.</i> <i>PEX12</i>	ubiquitin-protein ligasová aktivita u ortologu <i>S.c.</i> <i>PEX12</i>	-1,92
<i>C.a.</i> <i>RPN6</i>	proteasomální podjednotka (26S) (předpokládaná)	+1,74
ortolog <i>S.c.</i> <i>CPR7</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa	+1,71
<i>C.a.</i> <i>CDC27</i>	ubiquitin-protein ligasa (předpokládaná)	+1,68
<i>C.a.</i> <i>PSY2</i>	podjednotka protein-fosfátového komplexu PP4 (předpokládaná)	+1,63
ortolog <i>S.c.</i> <i>KNS1</i>	protein-tyrosin a serin/threonin kinasová aktivita	+1,56
ortolog <i>S.c.</i> <i>SSH4</i>	cílený transport proteinů do vakuoly, proces spjatý s ubiquitinilací	+1,53

### Metabolismus koenzymů

#### a kofaktorů

<i>C.a.</i> <i>BIO2</i>	biotin syntasa (předpokládaná)	-1,55
ortolog <i>S.c.</i> <i>BNR3</i>	biosyntéza k. nikotinové a 4-hydroxychinolin-2-karboxylové kyseliny	-1,69
ortolog <i>S.c.</i> <i>BIO3</i>	účastní se biosyntézy biotinu	-1,72

### Geny s neznámou funkcí

25 genů	-3,17 až -1,50
orf19.4942, orf19.355, orf19.1148, orf19.2225, orf19.3627, orf19.3868, orf19.4120, orf19.1302, orf19.3310, orf19.1146, orf19.153, orf19.6896, orf19.66, orf19.5891, orf19.3219, orf19.2883, orf19.4115, orf19.6282, orf19.1899, orf19.5819, orf19.1116, orf19.4612, orf19.580, orf19.2590, orf19.3490 FGR6-4	
13 genů	1,50 až 2,09
orf19.765, orf19.5356, orf19.7014, orf19.6587, orf19.1913, orf19.6162, orf19.311, orf19.2763, orf19.4070, orf19.3064.1, orf19.5446, orf19.1590, orf19.4129	

*C.a.* – *Candida albicans*

*S.c.* – *Saccharomyces cerevisiae*

ortolog *S.c.* = funkce tohoto genu v genomu *C. albicans* není známa, ale jeho ortolog v genomu *S. cerevisiae* je definovaný

SPB = spindle pole body (pólové tělísko vřetenka)

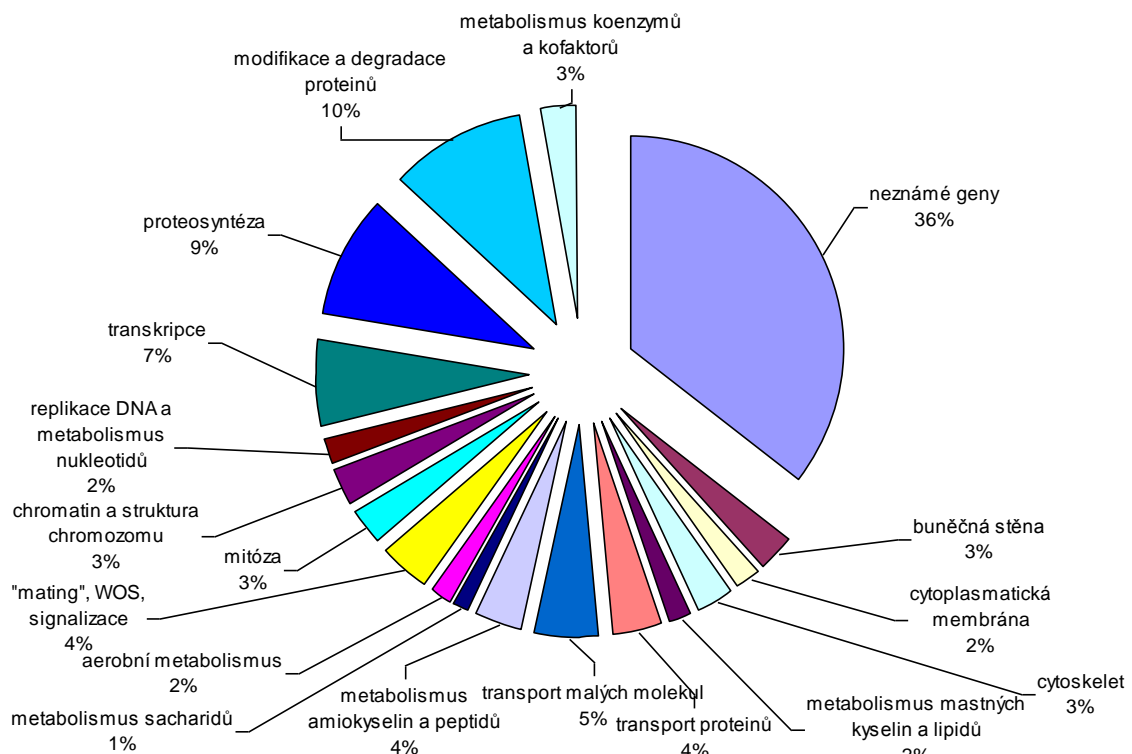
GPI = glykosylfosfatidylinositol

„mating“ = pohlavní rozmnožování

WOS = white-opaque switching

Na obr.16 (str 52) je uvedeno procentuální zastoupení různých skupin genů, jejichž exprese byla změněna v kokultuře s *Pseudomonas aeruginosa*. Ačkoli je genom *C. albicans* dobře zmapovaný a genomová databáze *Candida* Genome Database je anotovaná, funkce většiny genů stále nebyla ověřena, nebo je zcela neznámá. Více než třetina genů, jejichž exprese se při interakci *C. albicans* měnila, tak nemá známou funkci ani genové homology v genomu příbuzných kvasinek. Neznámé geny jsou v tomto textu dále označovány názvem otevřeného čtecího rámce (např. orf19.4942) podle jejich názvu v databázi *Candida* Genome Database. Funkce mnoha dalších genů nebyla dosud potvrzena, ale vzhledem k jejich homologii s geny jiných kvasinek (především *S. cerevisiae*) se předpokládá, že budou mít stejný, nebo podobný fenotypový projev. Takové geny jsou v textu označeny

formou „ortolog *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) + název genu“. Geny, jejichž funkce v genomu *C. albicans* známá je, označují formou „*Candida albicans* (*C.a.*) + název genu“. 19 % všech genů s rozdílem v expresi má svou funkci v proteosyntéze, modifikaci a degradaci proteinů. Dalších 7 % genů reguluje transkripční aparát (viz obr. 16). Je zjevné, že většina genů, u nichž dochází ke změně v genové expresi, je především zodpovědná za syntézu funkčních proteinů de novo.



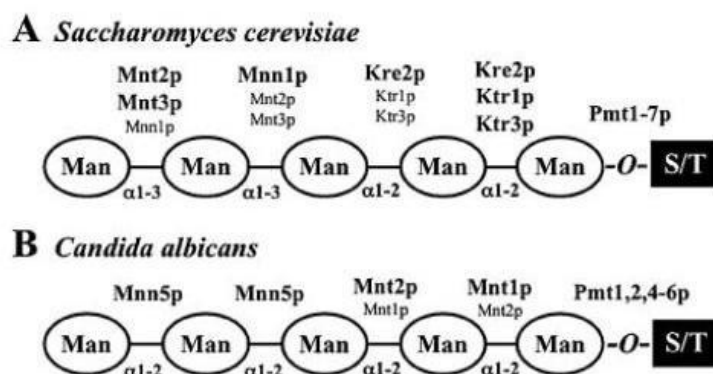
**obr. 16: Rozdělení genů uvedených v tab. 4 do funkčních skupin**

Zhruba třetina genů *C. albicans*, jejichž exprese se měnila v kokultuře s bakterií *P. aeruginosa*, dosud nebyla charakterizována. Větší skupinu dále tvoří geny zahrnuté v transkripci, translaci a posttranslačních modifikacích proteinů. Ostatní genové kategorie mají spíše menší zastoupení.

### 3.3.1. Buněčná stěna

Z genů zodpovědných za syntézu a strukturu buněčné stěny je zajímavý ortolog *Saccharomyces cerevisiae* *MNT2*, který byl v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* indukován 1,6 krát více, než v kontrole. Tento gen kóduje  $\alpha$ -1,3-mannosyltransferasu a má podíl na *O*-mannosylaci proteinů buněčné stěny *S. cerevisiae*. Mezi *O*-mannosylovými řetězci glykoproteinů buněčné stěny těchto dvou kvasinek jsou však drobné rozdíly (viz obr. 17, str.53)

Brand a spol. však zjistili, že právě *O*-mannosylace proteinů buněčné stěny *C. albicans* by mohla být jejím protektivním faktorem z hlediska interakce s *P. aeruginosa* [35]. Cílená mutace genů *MNT1* a *MNT2* *C. albicans* (kódují mannosyltransferasy Mnt1p a Mnt2p, pozor, nejedná se o ortolog *S.c.* *MNT2*, *C.a.* *MNT2* a *S.c.* *MNT2* se liší ve své funkci, viz obr.17) v jejich experimentu vyústila v úbytek kvasinek v jejich hyfální formě, pokud byla v kokultuře přítomna bakterie *P. aeruginosa*. Je zde tedy jistá možnost, že by ortolog *S.c.* *MNT2*, jehož exprese se měnila v našem experimentu, mohl být také protektivním faktorem *C. albicans* (má-li stejnou funkci i v genomu *C. albicans*).



obr. 17: *O*-mannosylace kvasinky A) *S. cerevisiae* B) *C. albicans*

Oligosacharidový řetězec je syntetizován od serinového nebo threoninového zbytku glykosylovaného proteinu. Hlavní rozdíl v *O*-mannosylaci u obou kvasinek spočívá ve vazbě, kterou jsou vázány jednotlivé mannosylové zbytky. *S. cerevisiae* spojuje dva terminální mannosylové zbytky  $\alpha$ -1,3-glykosidickou vazbou, kdežto ostatní mannosylové zbytky jsou spojeny  $\alpha$ -1,2- glykosidickou vazbou. V případě *C. albicans* jsou všechny mannosylové zbytky propojeny  $\alpha$ -1,2- glykosidickou vazbou. Obě kvasinky se liší také v rozdílném enzymovém aparátu, který je zodpovědný za prodlužování mannosylového řetězce [86].

Naopak snížení exprese v kokultuře jsme pozorovali u genu *C. albicans* *KRE5*. Ten kóduje protein nezbytný pro syntézu  $\beta$ -1,6-glukanu, který je další významnou složkou buněčné stěny kvasinek a váže její ostatní složky včetně proteinů.

### 3.3.2. Cytoplasmatická membrána

*C.a.* *HSX11* kóduje enzym UDP-glucosa:ceramid glucosyltransferasu, který je zodpovědný za syntézu glucosylceramidu. Tato složka cytoplasmatické membrány je virulentním faktorem *C. albicans* a podle našich výsledků je exprese genu *HSX11* v kokultuře snížena.

### 3.3.3. Cytoskeleton

Ke změnám v expresi docházelo také u tří genů zahrnutých v syntéze cytoskeletonu. U každého z nich byla exprese v kokultuře zvýšena oproti kontrole. Ortolog *S. cerevisiae* *SPC97* kóduje strukturální složku cytoskeletonu lokalizovanou v pólovém tělísku vřeténka pekařské kvasinky a podílí se tak na organizaci mikrotubulů. *C.a. BNRI* kóduje protein zvaný formin, který je lokalizován v krčku rostoucího pupene a pravděpodobně má také vliv na polární hyfální růst. Ortolog *S.c. DYN2* kóduje lehký řetězec dyneinu s funkcí molekulárního motoru, který za spotřeby ATP umožňuje transport organel či rozestup chromatid při mitóze.

### 3.3.4. Metabolismus mastných kyselin a lipidů

Expres dvou genů zahrnutých v syntéze a metabolismu mastných kyselin a lipidů byla zvýšena v kokultuře. Funkce obou genů je pouze domnělá – prvním z nich je *C.a. GPII*, který se pravděpodobně účastní syntézy glykofosfatidylinositolové (GPI) kotvy a jehož exprese se snižuje u jedinců rezistentních na fluconazol. *C.a. CHO2* je enzym fosfatidylethanolamin N-methyltransferasa a účastní se metabolismu glycerofosfolipidů, glycinu, serinu a threoninu.

### 3.3.5. Transport proteinů

Genová exprese se měnila také u čtyř genů, jejichž funkce je spjata s transportem proteinů. Každý z nich má svůj ortolog v genomu *S. cerevisiae* a kódují proteiny, které umožňují přenos jiných proteinů do mitochondrií, Golgiho aparátu či jádra.

### 3.3.6. Transport malých molekul

V této kategorii byla ve většině případů exprese snižena v kokultuře. Výjimku tvoří *C.a. CDRI* kódující proteinovou pumpu z rodiny přenašečů ABC, jejíž primární funkcí je transport fosfolipidů do buňky a z buňky. Jeho zvýšená exprese však také poskytuje kvasince **rezistenci** na řadu toxických látek (například azolová antimykotika) [87].

Na druhé straně stojí ortolog *S.c. VBA5*, který je členem rodiny MFS (major facilitator superfamily) a jehož exprese je v kokultuře nižší. Vba5p je rovněž efluxová pumpa a

zprostředkovává příjem aminokyselin z prostředí. Na rozdíl od *CDRI* však zvýšená exprese tohoto genu zvyšuje citlivost kvasinky *S. cerevisiae* na antimykotika.

### 3.3.7. Metabolismus aminokyselin a peptidů

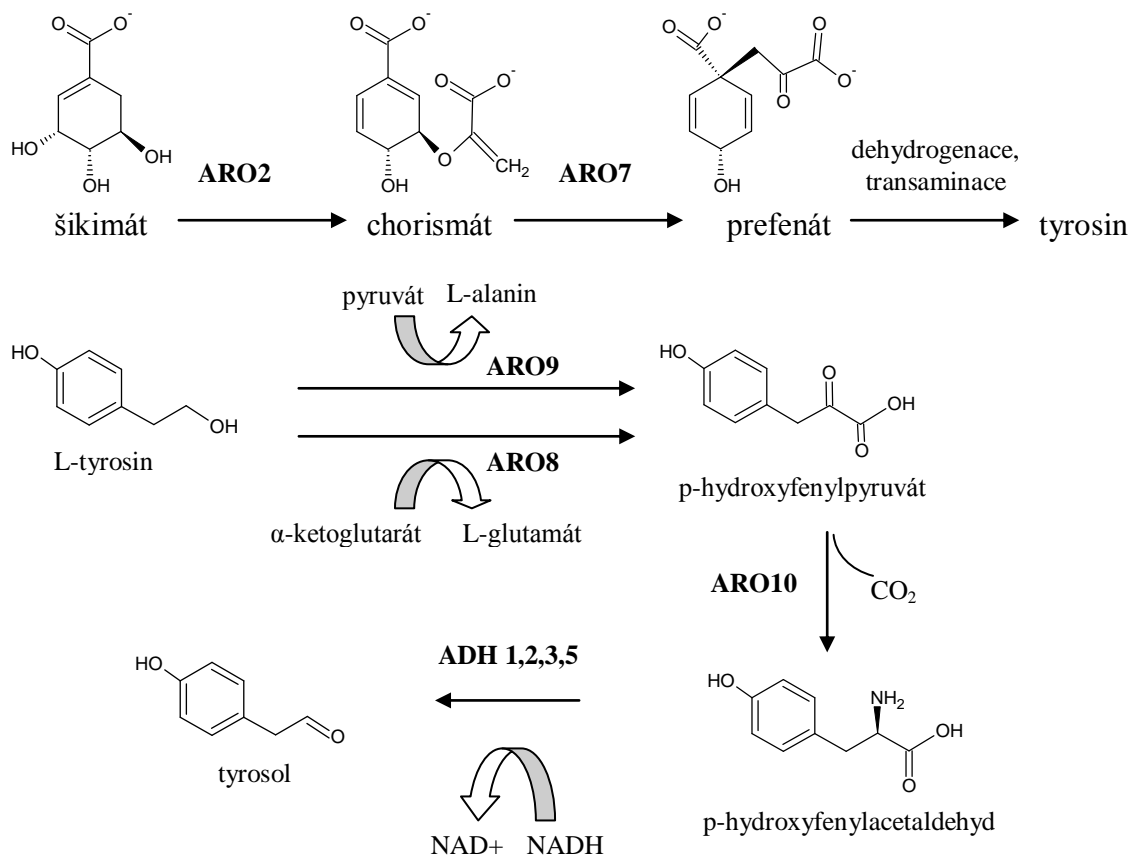
Expres čtyř genů této kategorie byla snížena v kokultuře - *C.a. ARO2*, *C.a. GPXI*, *C.a. ARO7* a *C.a. DAO2*. Tři z nich kódují proteiny zodpovědné za biosyntézu aminokyselin (Aro2p-chorismát synthasa, Aro7p-chorismát mutasa, Gpx1p-glutathion synthasa). Čtvrtý z nich kóduje peroxisomální oxidasu (Dao2p), která oxiduje D-aminokyseliny na iminokyseliny, které jsou degradovány za vzniku amoniaku a peroxidu vodíku. Chorismát synthasa je enzym zahrnutý v biosyntéze **chorismátu**, který je následně za katalýzy enzymu chorismát mutasa přeměněn na **prefenát** (šikimátová dráha). Tato látka je přímým prekurzorem syntézy **aromatických aminokyselin**. Ty jsou dále využity pro syntézu tří autoinduktorů *C. albicans*, tyrosolu, fenethylalkoholu a tryptopholu. Biochemická dráha přeměny L-tyrosinu na tyrosol je popsána ve schématu na obr. 18 (str. 56). Chorismát může být dále také prekurzorem pro syntézu indolu a jeho derivátů [61].

### 3.3.8. Metabolismus sacharidů

Expres *C. a. GCA1* byla zvýšena v kokultuře. Gca1p je pravděpodobně adhezin jehož produkce je ovlivněna přítomností různých sacharidů.

### 3.3.9. Energie

Pozorovali jsme sníženou expresi *C.a. IDP2* a *C.a. ICL1* v kokultuře. Idp2p je cytosolická isocitrát dehydrogenasa (citrátový cyklus), která katalyzuje dehydrogenaci a dekarboxylaci isocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát. Icl1p je isocitrát lyasa, enzym glyoxylátového cyklu a katalyzuje štěpení isocitrátu na sukcinát a glyoxylát.



**obr.18: Šikimátová cesta biosyntézy tyrosolu *C. albicans***

Schéma popisuje část takzvané šikimátové dráhy *C. albicans*. *ARO2* a *ARO7* jsou geny, u kterých jsme pozorovali změny v expresi a kódují enzymy zahrnuté v biosyntéze tyrosinu ze šikimátu. Biosyntézy tyrosolu z L-tyrosinu se účastní geny *ARO8*, *ARO9*, *ARO10* a *ADH* (alkoholdehydrogenasa) 1, 2, 3 a 5, jejichž exprese se v našem experimentu neměnila. (upraveno podle [61])

### 3.3.10. Pohlavní rozmnožování („mating“), white-opaque switching, signalizace

Pohlavní rozmnožování kvasinek je úzce spjaté se změnou fenotypu „white-opaque switching“ (viz kap. 1.4.3. Pohlavní rozmnožování kvasinek rodu *Candida*). Vyšší exprese v kokultuře byla pozorována u ortologu *S.c.* *SWS2*, který kóduje ribosomální protein s funkcí kontroly sporulace a *C.a.* *SST2* kódující regulátor G-proteinu. Naopak nižší expresi jsme detegovali u *C.a.* *AXL1* a ortologu *S.c.* *YRB30*. Ax11p je endoproteasa a jejím cílem je štěpení feromonu **a** na N-konci za účelem jeho aktivace. Yrb30p je GTPasový regulátor.

### **3.3.11. Mitóza**

Změny v expresi jsme v této kategorii pozorovali u tří genů a ke zvýšené aktivitě docházelo ve všech případech v kokultuře. Tyto geny kódují topoisomerasu 1 (ortolog *S.c. TOP3*), septin (*C.a. SEP7*) a dále regulační protein nezbytný pro cytokinezi (ortolog *S.c. HOF1*).

### **3.3.12. Chromatin a struktura chromozomu**

Ortolog *S.c. RSC4* i *C.a. SIR2* byly méně aktivovány v kokultuře a exprese *C.a. POB3* byla v kokultuře naopak vyšší. Rsc4p se nachází na povrchu nukleosomu a obsahuje histon vázající domény. O *C.a. SIR2* je známo pouze to, že má funkci v umlčování rDNA, ale jemu homologický *S.c. Sir2p* má aktivitu histon deacetylasy. Ortolog *S.c. POB3* kóduje protein Pob3p, který asociuje s chromosomem a podílí se na reorganizaci chromozomu.

### **3.3.13. Replikace a metabolismus nukleotidů**

Zvýšená exprese v kokultuře byla pozorována u dvou genů, ortologu *S.c. MCM10* (iniciace replikace) a *C.a. ADE2* (biosyntéza adeninu).

### **3.3.14. Transkripce a proteosyntéza**

Docházelo samozřejmě také ke změnám v expresi transkripčních a translačních faktorů, genů kódujících ribosomální proteiny a enzymy transkripčního a translačního aparátu. Konkrétní geny jsou uvedeny v tab. 4 (str. 49-51).

### **3.3.15. Modifikace a degradace proteinů**

Další velkou kategorií jsou geny, které kódují proteiny s funkcí modifikace či degradace jiných proteinů. Z modifikačních proteinů jimi kódovaných se jedná o peptidyl-prolyl cis-trans isomerasu (ortolog *S.c. CPR7*), kinasu (ortolog *S.c. KNS1*) a fosfatasu (*C.a. PSY2*). Z degradačních proteinů šlo především o ty, které se účastní ubiquitinilace a transportu proteinu do vakuoly a proteasomu.

### 3.3.16. Metabolismus koenzymů a kofaktorů

Expresе všech tří genů z této kategorie byla v kokultuře nižší. Dva z nich mají svou roli v biosyntéze biotinu (*C.a. BIO2* a ortolog *S.c. BIO3*) a třetí (ortolog *S.c. BNR3*) kóduje protein zahrnutý v biosyntéze kyseliny nikotinové.

### 3.3.17. Geny s neznámou funkcí

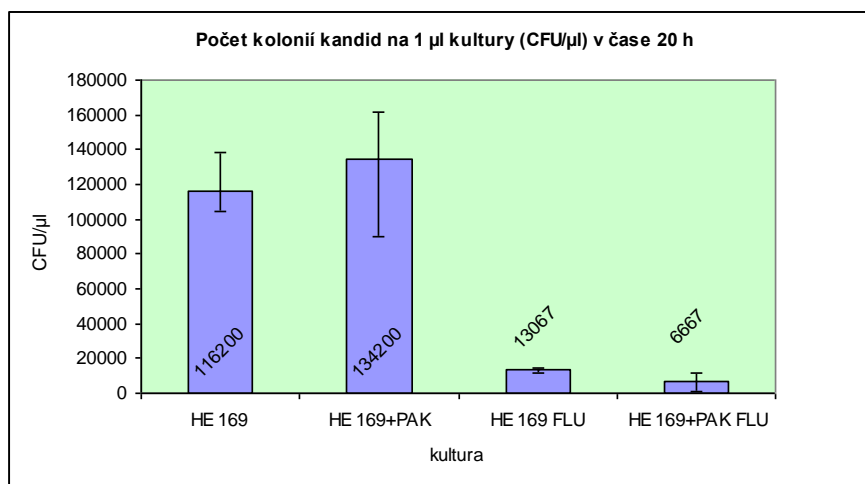
Funkce většiny genů se změnou v expresi není známa. Konkrétně 25 neznámých genů mělo v kokultuře 1,5-3,17x nižší expresi, než v kontrole a exprese 13 neznámých genů byla v kokultuře naopak aktivována, a to od 1,5 po 2,09-ti násobnou změnu v expresi.

## 3.4. Kultivace *C. albicans* v přítomnosti *P. aeruginosa* a fluconazolu

Fluconazol je azolové antimykotikum, které inhibuje enzym 14- $\alpha$  demethylasu. Ten je zodpovědný za přeměnu lanosterolu na ergosterol, který je hlavní součástí cytoplazmatické membrány kvasinky.

Experiment s DNA čipy prokázal zvýšenou expresi genu *CDR1* (*Candida* drug resistance) v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa*. Zvýšená exprese tohoto genu vyvolává u *C. albicans* rezistenci na fluconazol i jiná antimykotika. Protein Cdr1p patří do rodiny ABC přenašečů a je lokalizován na plasmatické membráně a mechanismem aktivního transportu dokáže z kvasinkové buňky eliminovat cizorodé látky [88]. Rozhodli jsme se tedy provést experiment, který kombinuje dva faktory vedoucí ke zvýšené expresi genu *CDR1* – přidavek fluconazolu a kokultivace *C. albicans* s bakterií *P. aeruginosa*.

Přídavek fluconazolu výrazně snižoval životnost *C. albicans* v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* i v kontrolní kultuře *C. albicans* (obr. 19, str. 59). V průběhu kultivace však v kontrolní kultuře přesto dochází k nárůstu CFU (colony forming unit) buněk kandid (viz obr. 20, str. 60). Naopak, v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* dochází k postupnému ubývání kvasinkových buněk a ve stacionární fázi jsou kandidy zcela nahrazeny bakterií, která roste bez omezení (viz obr. 21, str. 61)



**obr. 19: Semikvantitativní test přežití po 20 h kultivace v kulturách s/bez přídavku fluconazolu**

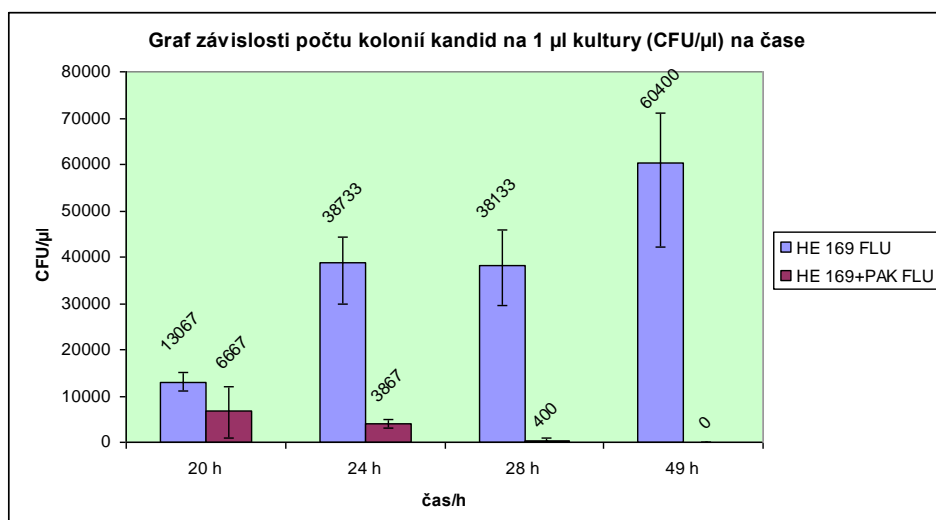
HE 169 – kontrolní kultura *C. albicans*; HE 169 + PAK – kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa*; HE 169 FLU – kontrolní kultura *C. albicans* s přídavkem fluconazolu; HE 169 + PAK FLU – kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa* s přídavkem fluconazolu

Semikvantitativní test přežití prokázal velký rozdíl v růstu kvasinek v závislosti na přídavku fluconazolu. Kontrolní kultura *C. albicans* i kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa* dosahují podobných hodnot CFU/μl. V případě kultur s přídavkem fluconazolu dochází ke zpomalení růstu kandid a v kokultuře je růst omezen více, než v kontrolní kultuře.

Chybové úsečky odpovídají hodnotám CFU/μl ze tří replik.

Podle obr. 19 jsou hodnoty CFU/μl pro obě kultury bez fluconazolu (kontrola *C. albicans* a kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa*) poměrně blízké s mírným vzrůstem v kokultuře. Tento jev však neodpovídá růstové křivce (viz obr. 21, str. 61), podle níž je optická denzita kokultury v časovém bodě 20 h naopak o něco menší, než je tomu u kontroly. Poměrně velké hodnoty standardních odchylek u některých vzorků vypovídají o tom, že tato semikvantitativní metoda nevypovídá o přesných hodnotách v konkrétních časových bodech, ale je spíše vhodná pro rámcovou představu o kultivačních změnách v důsledku interakce obou mikroorganismů (viz tab.5, str. 61).

Na základě semikvantitativního testu přežití *C. albicans*, růstové křivky i mikroskopického pozorování lze potvrdit, že přítomnost *P. aeruginosa* silně ovlivňuje životnost *C. albicans* v kokultuře s přídavkem fluconazolu.



**obr. 20: Graf závislosti CFU/μl na čase v kulturách s přidavkem fluconazolu**

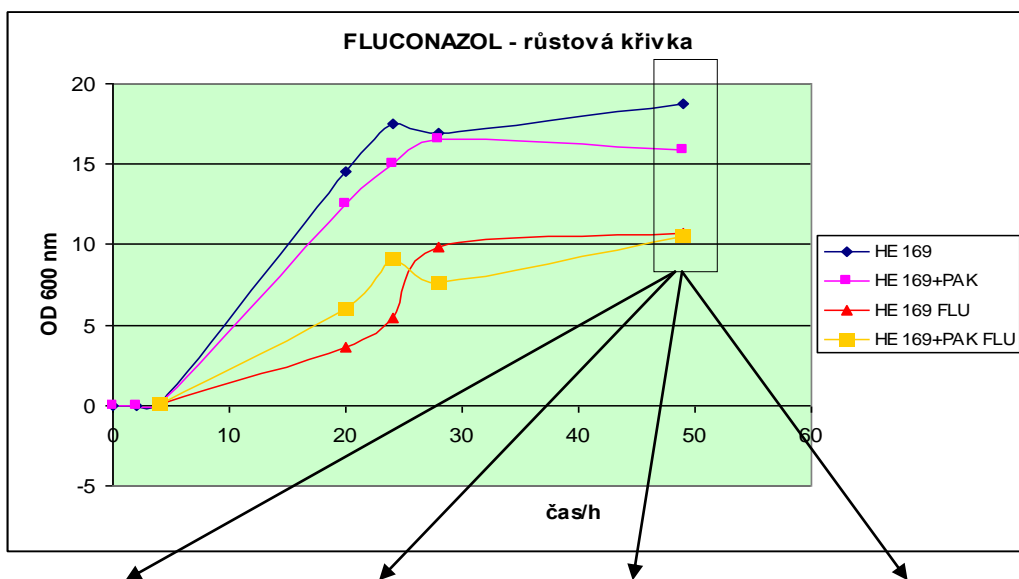
Po přidání fluconazolu je samotná kvasinka stále omezeně schopná růstu (HE 169 FLU). V kokultuře s přidavkem fluconazolu (HE 169+PAK FLU) se však životnost kvasinky postupně snižuje a ve stacionární fázi je kvasinka zcela vymýcena.

Chybové úsečky odpovídají hodnotám CFU/μl ze tří replik.

Výsledky tohoto experimentu potvrzují známou skutečnost ve vztahu *C. albicans* a *P. aeruginosa* - v okamžiku vymýcení jednoho z mikroorganismů dochází k přemnožení a zvýšení invazivity druhého mikroorganismu [34]. Experiment navíc potvrzuje, že v daném uspořádání je tato interakce nezávislá na morfologické formě kvasinky, protože naše experimentální podmínky neindukovaly hyfální růst, narozdíl od podmínek v průběhu infekce.

Ačkoli je tedy v kokultuře s bakterií *P. aeruginosa* exprese genu *CDRI* kvasinky *C. albicans* zvýšená, nedochází ke zvýšení rezistence kvasinky na fluconazol. Naopak, životnost kvasinky je v kokultuře s přidavkem fluconazolu nižší.

Buňky kandid kultivované s přidavkem fluconazolu jsou i vizuálně odlišné, poškození buněčné membrány je patrné z mikroskopických snímků. Buňky jsou větší a mají nepravidelný tvar. (viz obr. 22, str 62).



obr.21: Graf závislosti optické density na čase a mikroskopické snímky v časovém bodě 49 h

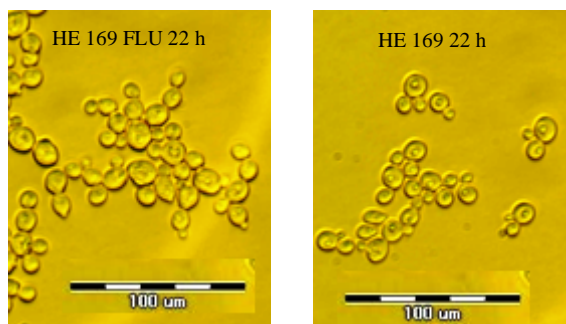
Růstová křivka potvrzuje výsledky semikvantitativního testu přežití kvasinek. Optická densita je v kulturách s přidavkem fluconazolu značně snížena. Ve vzorku kokultury HE 169+PAK FLU dochází ke zvýšení optické density ve stacionární fázi, ale toto zvýšení podle mikroskopických snímků neodpovídá buňkám kvasinek, nýbrž těm bakteriálním.

tab. 5 – Semikvantitativní test přežití - Chyby měření

čas [h]	vzorek	CFU1/µl [ ]	CFU2/µl [ ]	CFU3/µl [ ]	CFU/µl průměr [ ]	Δ [ ]	δ %
20	HE 169	105200	138400	105000	116200	14800	12.7
20	HE 169+PAK	90400	150200	162000	134200	29200	21.8
20	HE 169 FLU	13000	15000	11200	13067	1289	9.9
20	HE 169+PAK FLU	7000	1000	12000	6667	3778	56.7
24	HE 169 FLU	44400	42000	29800	38733	5956	15.4
24	HE 169+PAK FLU	4800	3600	3200	3867	622	16.1
28	HE 169 FLU	38800	29600	46000	38133	5689	14.9
28	HE 169+PAK FLU	0	400	800	400	267	66.7
49	HE 169 FLU	67800	71200	42200	60400	12133	20.1
49	HE 169+PAK FLU	0	0	0	0	/	/

Δ – průměrná odchylka měření

δ – průměrná relativní odchylka



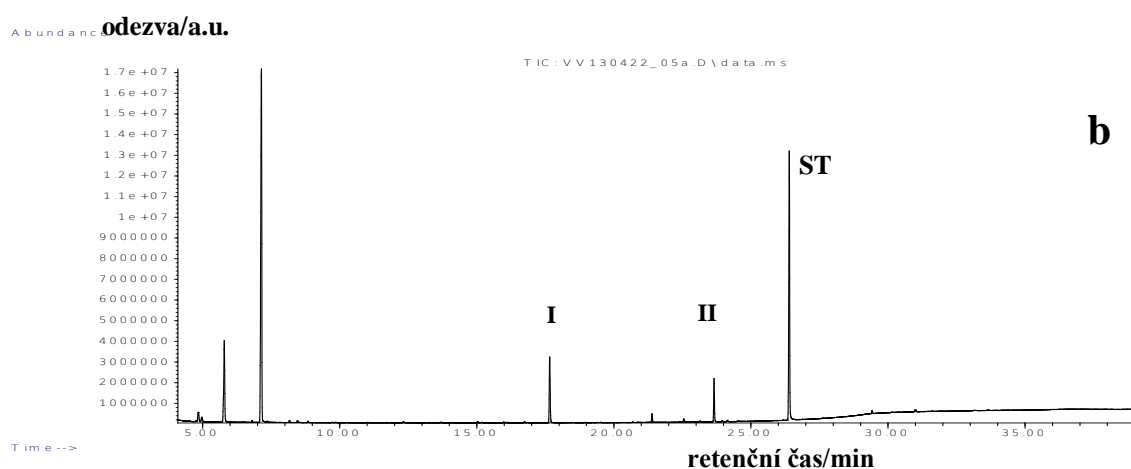
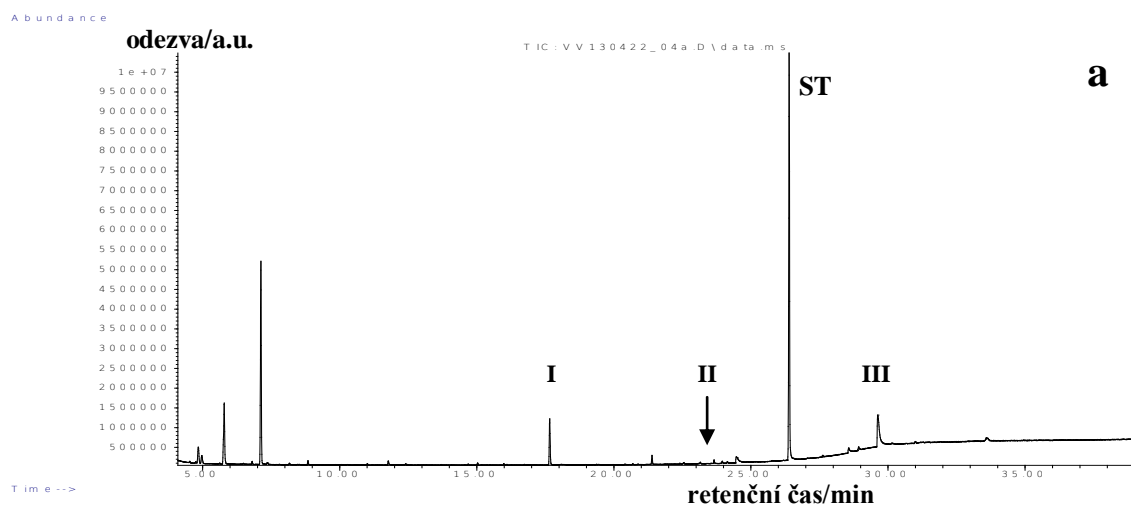
**obr. 22: Morfologický rozdíl mezi kvasinkovými buňkami *C. albicans* v kultuře s přidavkem fluconazolu (HE 169 FLU) a bez fluconazolu (HE 169)**

Fluconazol blokuje přeměnu lanosterolu na ergosterol, který je hlavní složkou cytoplazmatické membrány. Buňky, které v kultuře s fluconazolem rostou, mají nepravidelný tvar a oproti běžným kvasinkovým buňkám jsou větší, respektive „nateklé“.

### **3.5. Analýza kultivačních médií metodou plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)**

Jelikož je interakce mezi *C. albicans* a *P. aeruginosa* ovlivněna produkcí molekul autoinduktorů, které jsou prostředníky komunikace mezi mikroorganismy, rozhodli jsme se analyzovat média po kultivaci a posoudit jejich složení z kvalitativního a kvantitativního hlediska. Analytickou metodou GC/MS jsme odhalili 2 druhy autoinduktorů v extraktu z kontrolní kultury *C. albicans* a 3 druhy autoinduktorů v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* (viz obr. 23, str. 63 a obr. 24, str. 64), všechny produkované *C. albicans*. Podle knihovny a porovnání se standardy jsme záhy identifikovali *E,E*-farnesol a fenethylalkohol, které byly produkovány kvasinkou v obou systémech, ačkoli v různých poměrech ku standardu (oktadekan-1-ol o koncentraci 10 µg/ml chloroformu) a dále „farnesolovou kyselinu“ (FA) (viz tab. 6, str. 63).

FA byla přítomna pouze v extraktu z kokultury *C. albicans* + *P. aeruginosa*, kde jsme navíc pozorovali jen velmi malé zastoupení *E,E*-farnesolu. FA má v systému quorum sensing stejnou funkci jako farnesol – inhibuje hyfální růst. Zdá se, že různé kmeny se liší v produkci farnesolu a FA a jejich poměr může být odrazem metabolické funkce kvasinky, ale větší zastoupení „farnesolové kyseliny“ oproti farnesolu je pro *C. albicans* spíše neobvyklé [89].



**obr. 23: Plynová chromatografie chloroformových extraktů z filtrovaných kultivačních médií – kvalitativní analýza**

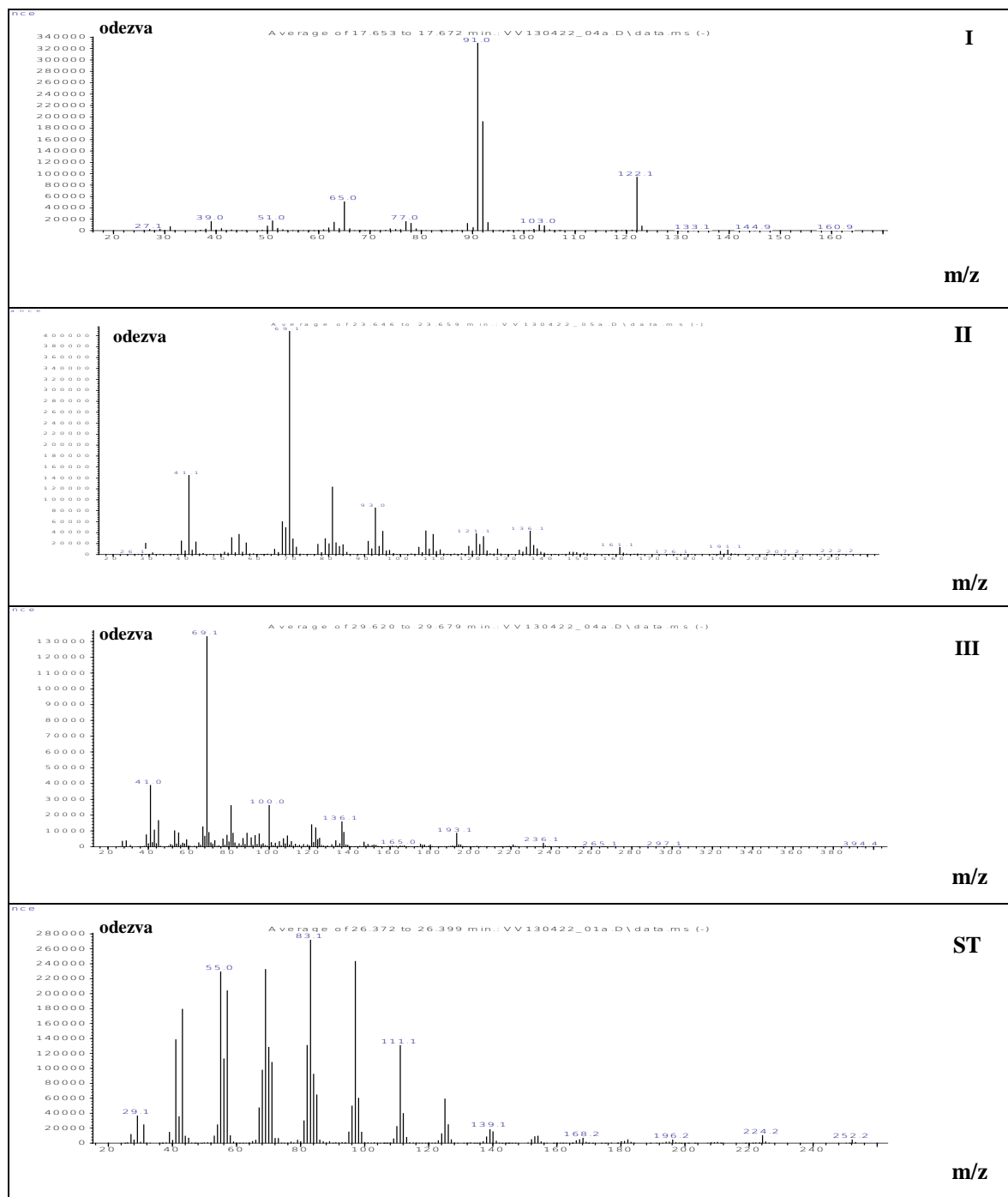
kokultura *C. albicans* + *P. aeruginosa*, b) kontrolní kultura *C. albicans*

hmotnostní spektrometrie identifikovala tři látky produkované *C. albicans*: I – fenethylalkohol, II – *E,E*-farnesol, III- „farnesolová kyselina“

ST – standard oktadekan-1-ol, a.u. – arbitrární jednotka

**tab. 6: Autoinduktory *C. albicans* analyzované metodou GC/MS**

označení v chromatogramu	Autoinduktor	Systematický název	Struktura
I	fenethylalkohol	2-fenyl ethanol	
II	<i>E,E</i> -farnesol	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-3,7,11-trimethyldodeka-2,6,10-trien-1-ol	
III	„farnesolová kyselina“	3,7,11-trimethyldodeka-2,6,10-trienová kyselina	



**obr. 24: Hmotnostní spektra analytů**

I – fenethylalkohol, II – *E,E*-farnesol, III- „farnesolová kyselina“, ST – standard oktadekan-1-ol

Regulace produkce molekul QS bakterií je pro nás zatím neznámou. V jedné z biologických replik jsme v extraktu z kultury *P. aeruginosa* zaznamenali výskyt fenazinových barviv (data neuvedena), avšak další kultivace tuto skutečnost neprokázaly. Rozdíl je patrný již vizuálně – fenazinová barviva jsou tmavě modrá a zbarvují tak bakteriální kulturu i chloroformový extrakt.

Produkcí autoinduktorů jsem také kvantifikovala metodou vnitřního standardu – porovnála jsem plochy píků jednotlivých autoinduktorů s plochou píku standardu oktadekan-1-olu a tak jsem provedla relativní kvantifikaci (viz tab. 7). V kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* bylo zhruba dvakrát méně fenethylalkoholu, než v kontrolní kultuře *C. albicans*. *E,E*-farnesol je v kontrole zastoupen o poznání více, než v kokultuře, kde je naopak významně nabohacena „farnesolová kyselina“.

**tab. 7: Kvantitativní analýza**

označení v chromatogramu	retenční čas [min]	autoinduktor	$A_a/A_s$ (průměr) [ ]	$\Delta$ [ ]	$\delta$ %
I	17.66	fenethylalkohol kokultura	<b>10.42</b>	0.26	2.53
		fenethylalkohol kontrola	<b>23.08</b>	0.02	1.75
II	23.66	<i>E,E</i> -farnesol kokultura	<b>0.78</b>	0.02	2.27
		<i>E,E</i> -farnesol kontrola	<b>15.19</b>	0.01	1.32
III	29.63	FA kokultura	<b>18.70</b>	0.95	5.09
		FA kontrola	-	-	-

kokultura = *C. albicans* + *P. aeruginosa*

kontrola = *C. albicans*

$A_a/A_s$  = plocha píku analytu/plocha píku standardu

$\Delta$  = průměrná směrodatná odchylka měření

$\delta$  = relativní odchylka měření

## 4. DISKUSE

Naše snaha o studium interakce mezi patogenní kvasinkou *C. albicans* a bakterií *P. aeruginosa* přinesla zajímavé výsledky, jejichž interpretace je ovšem poměrně složitá. Kombinací molekulárně-biologické metody sledování genové exprese a analýzy médií po kultivaci mikroorganismů jsme na tento kultivační systém nahlédli z různých úhlů. Díky tomu můžeme posoudit interakci mikroorganismů nejen z hlediska změn v genové expresi kvasinky, ale také prostřednictvím produkce komunikačních molekul mikroorganismů v průběhu kokultivace.

Námi zvolené podmínky experimentu s DNA čipy zapříčinily to, že docházelo spíše k menším změnám v genové expresi – pohybovali jsme se celkově v rozmezí do 2-3 násobku exprese oproti běžnému systému (kontrola *C. albicans*), což je v globálním měřítku poměrně malý rozdíl. Důvodem může být postupná adaptace *C. albicans* na bakterii způsobená zaočkováním obou mikroorganismů ve stejném okamžiku. V našich předchozích experimentech v kokulturách často docházelo k přerůstání bakterie kvasinkou (důkaz, že *P. aeruginosa* pokaždé neinhibuje růst *C. albicans*) – fenotyp kokultury totiž velmi závisí na poměru, v jakém jsou zaočkována inokula různých mikroorganismů. V našem experimentu byly podmínky voleny tak, aby bylo docíleno vzájemné rovnováhy růstu buněk *C. albicans* a *P. aeruginosa* v průběhu kokultivace a aby jedna druhou nepřerůstala. Je ale možné, že optická denzita bakterie v kokultuře byla příliš malá, než aby měla zásadní vliv na genovou expresi kvasinky. Rozhodně bude nutné tento experiment v budoucnu opakovat za mírně odlišných biologických podmínek. Je totiž diskutabilní, nakolik lze naše výsledky považovat za skutečně relevantní vzhledem k takto malým rozdílům v genové expresi.

Přesto si ale můžeme udělat rámcovou představu o tom, které biochemické dráhy kandidy jsou především ovlivněny interakcí s bakterií *P. aeruginosa*. Například zmíněný ortolog *S.c. MNT2* (viz kap. 3.3.1. Buněčná stěna) by mohl hrát důležitou roli ve vztahu kvasinky k bakterii díky své roli v *O*-mannosylaci proteinů buněčné stěny. Brand a spol. totiž zjistili, že *O*-mannosylace proteinů buněčné stěny *C. albicans* je zřejmě protektivním faktorem kvasinky z hlediska interakce s *P. aeruginosa* [35]. Cílená mutace genů *MNT1* a *MNT2* *C. albicans* (kódují mannosyltransferasy Mnt1p a Mnt2p, pozor, nejedná se o *S.c. MNT2*)

v jejich experimentu totiž vyústila v úbytek kvasinek v prostředí indukujícím hyfální růst, pokud byla v kokultuře přítomna bakterie *P. aeruginosa*. Není tedy vyloučeno, že by ortolog *S.c. MNT2*, jehož exprese byla v našem experimentu vyšší v kokultuře, mohl být také protektivním faktorem *C. albicans* v její kvasinkové morfologické formě.

Zvýšená exprese *C.a. CDR1* (kóduje efluxní přenašeč fosfolipidů a cizorodých látek) v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* zase vybízí k myšlence, že by kvasinka mohla být ohrožena cizorodými látkami z okolního prostředí. *P. aeruginosa* produkuje velké množství nízkomolekulárních látek, které často bývají prostředníky (autoinduktory) mikrobiální komunikace (quorum sensing). Mezi těmito látkami jsou mnohé bakteriální toxiny, které mohou být toxické i pro *C. albicans* a mohly by být eliminovány právě pomocí podobných přenašečů. Je však poněkud zvláštní, že se zvyšuje pouze exprese genu *CDR1* a v případě ostatních členů genové rodiny ABC, mezi nimiž je celá řada genů kódujících proteiny s podobnou funkcí, ke změně nedochází. Společným rysem takových genů je to, že jejich zvýšená exprese je úměrná rezistenci kvasinek na různá antimykotika. My jsme se rozhodli zjistit, co se stane, pokud kvasinku vystavíme působení fluconazolu a přítomnosti bakterie současně (viz kap. 3.4.) a zjistili jsme, že kombinace fluconazolu a přítomnosti bakterie v kokultuře snižuje životnost kvasinky ještě více, než jen prostý přídavek fluconazolu do kontrolní kultury s *C. albicans*. Zvýšená exprese *CDR1* v kokultuře tedy rozhodně neznamená efektivnější eliminaci fluconazolu a tedy zvýšení životnosti kvasinky, je tomu právě naopak. Je možné, že zvýšení exprese *CDR1* je pro kvasinku příliš velkou zátěží, nebo že protein Cdr1 má omezenou kapacitu a nedochází tak k účinné eliminaci bakteriálních toxinů a fluconazolu současně. Na druhou stranu je třeba si také uvědomit velmi zásadní úskalí tohoto experimentu, a to, že změna v expresi genu ještě nemusí nutně odrážet jí odpovídající translační projev.

Nicméně, celkově by ochraně před cizorodými látkami odpovídala i snížená exprese genového ortologu *S.c. VBA5* v kokultuře. Ten je členem rodiny MFS a citlivost na antimykotika naopak zvyšuje.

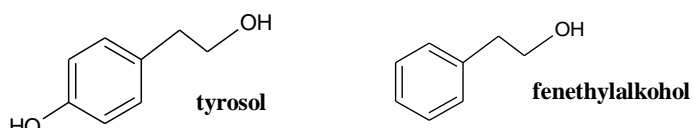
Zvýšená exprese *C.a. BNRI* v kokultuře pravděpodobně není spojena s hyfálním růstem kvasinky, protože jsme nepozorovali žádné hyfy v kokultuře ani v kontrolní kultuře. Podle dostupných informací je sice Bnr1p pravděpodobně součástí hyfálního cytoskeletu a ovlivňuje hyfální polární růst, ale má svůj ortolog také u *S. cerevisiae*, která hyfy nevytváří.

*S.c. BNI1* ale hraje roli během mitózy a pučení, pravděpodobně se tedy jedná o běžný cytoskeletární protein.

Zásadní je ovšem snížená exprese dvou genů kódující enzymy šikimátové dráhy (*ARO2*, *ARO7*) v kokultuře. Jedná se o dráhu, která se uplatňuje u rostlin, hub a bakterií a využívá látku zvanou šikimát jako prekurzor biosyntézy aromatických aminokyselin – například tyrosinu. Z L-tyrosinu je v další fázi syntetizován tyrosol - molekula komunikačního systému quorum sensing. Snížená exprese těchto genů v kokultuře odpovídá výsledkům analýzy médií (viz kap. 3.5.), která odhalila sníženou produkci autoinduktoru fenethylalkoholu (inhibitor hyfálního růstu) v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa*. Jedná se o látku strukturně velmi podobnou tyrosolu (viz obr. 3, str. 69). Jelikož je tyrosin prekurzorem pro biosyntézu tyrosolu a fenethylalkohol má velmi podobnou strukturu, jako tyrosol, je možné, že cesty biosyntézy fenethylalkoholu by také mohly být spjaty s šikimátovou drahou. Otázkou je, z jakého důvodu je produkce fenethylalkoholu v kokultuře nižší. Je možné, že *P. aeruginosa* nějakým mechanismem blokuje produkci tohoto inhibitoru hyfálního růstu, aby kvasinka zahájila růst zárodečných klíčků a hyf a byla tak pro bakterii snadnějším terčem? Podobná interakce je mezi těmito organismy jistě možná – je známo, že farnesol (jiný inhibitor hyfálního růstu *C. albicans*) inhibuje produkci jednoho z autoinduktorů *P. aeruginosa* [37].

Vynecháme-li neznámé geny, nejčastěji se změny v expresi týkají genů kódujících proteiny zahrnuté v transkripci, translaci a úpravě proteinů. Není to nic neobvyklého, protože velká část genů má především regulační funkci. Pro změny v expresi velké části genů nemáme zatím žádné vysvětlení, ale na tom není nic zvláštního vzhledem k tomu, jak komplexní děje se mohou v buňce odehrávat.

Výsledky analýzy médií přinesly kromě již výše zmíněných rozdílů v produkci fenethylalkoholu i jiné zajímavé informace a potvrdili, že v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* dochází ke komplexním změnám v produkci autoinduktorů *C. albicans*. Jak již bylo řečeno, fenethylalkohol je strukturně velmi podobný tyrosolu. Tyrosol je antagonistou farnesolu – indukuje hyfální růst kvasinky. Fenethylalkohol však pravděpodobně hyfální růst inhibuje podobně jako farnesol [90].



**obr. 3: Tyrosol a fenethylalkohol**

Tímto docházíme ke zjištění, že veškeré námi analyzované autoinduktory tvorbu hyf *C. albicans* inhibují. To je výsledek, který je v souladu s podmínkami našeho kultivačního systému – kandida zde roste výhradně v podobě blastospory. Otázkou je, proč dochází ke oxidaci farnesolu na farnesolovou kyselinu v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa*. „Farnesolová kyselina“ není právě běžným autoinduktorem *C. albicans* [89]. Nabízí se otázka, zda bakterie nějakým způsobem neovlivňuje redoxní prostředí kultury a tím oxidaci farnesolu na jeho kyselinu. Sporadická produkce fenazinových barviv bakterie by tomuto scénáři odpovídala – bakterie může barvivo produkovat, ale zároveň jej záhy oxidovat na produkty, které nejsou rozpustné v chloroformu. Zdá se, že musí existovat ještě nějaký jiný faktor, který ovlivňuje složení autoinduktorů v kultivačních médiích, protože mezi biologickými replikami byly určité rozdíly (přítomnost/nepřítomnost fenazinových barviv, různé poměry fenethylalkoholu a farnesolu). Produkci farnesolu a fenethylalkoholu jsme ovšem pozorovali vždy.

Samostatnou otázkou je však rozpustnost autoinduktorů v kultivačním médiu – řada z nich totiž není dobře rozpustná ve vodě a je pravděpodobné, že velká část těchto látek se během kultivace uvolňuje z vodného prostředí kultivačního média (kultury se navíc vyznačují výrazným zápachem).

Tato práce dává základ k dalším experimentům v otázce studia interakce mezi *C. albicans* a *P. aeruginosa*, protože interpretace některých výsledků je pro nás stále neznámou. Vztah mezi těmito mikroorganismy je ovlivněn na obou stranách a zdá se, že ne všechny jeho podrobnosti byly zatím brány v potaz. Je samozřejmě mnoho jiných kultivačních systémů, které by bylo možno využít pro tento experiment (biofilm, indukce hyfálního růstu *C. albicans* v kapalném médiu a jiné) – námi zvolený systém je charakteristický sám o sobě a není možné souhrnně aplikovat výsledky jeho pozorování na jiná biologická uspořádání. Výsledky z DNA čipů by mohly dále posloužit jako základ pro různé genetické manipulace kvasinky (například delece *CDR1*, *S.c. MNT2* aj.) a testování jejich citlivosti na přítomnost

*P. aeruginosa*. V neposlední řadě by mohlo být zajímavé aplikovat výsledky výzkumu systému *C. albicans* + *P. aeruginosa* na interakci non-*C. albicans* druhů kvasinek rodu *Candida* s *P. aeruginosa*.

## 5. SOUHRN

Zjistili jsme, že v průběhu kokultivace kvasinky *C. albicans* a bakterie *P. aeruginosa* dochází ke změnám v genové expresi 107 genů kvasinky. Některé z těchto genů by mohly mít vliv na biosyntézu buněčné stěny (ortolog *S.c. MNT2*), metabolismus komunikačních molekul systému quorum sensing (*ARO2*, *ARO7*) nebo na eliminaci toxických látek (*CDR1*) *C. albicans* v přítomnosti *P. aeruginosa*.

Na základě analýzy médií metodou GC/MS jsme našli souvislost mezi sníženou expresí genů *ARO2* a *ARO7* a nižší hladinou fenethylalkoholu (inhibitor hyfálního růstu) v kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa*. V kokultuře *C. albicans* + *P. aeruginosa* jsme také zaznamenali výskyt neobvyklé oxidované formy autoinduktoru farnesolu (inhibitor hyfálního růstu), 3,7,11-trimethyldodeka- 2,6,10-trienové kyseliny (FA).

Po přidání antimykotika fluconazol do kokultury *C. albicans* s *P. aeruginosa* a kontrolní kultury *C. albicans* jsme pozorovali výrazně sníženou životnost kvasinky v kokultuře s bakterií. Tato skutečnost odporuje současně zvýšené expresi genu *CDR1* v kokultuře, protože *CDR1* obvykle zvyšuje rezistenci *C. albicans* na azolová antimykotika.

## SEZNAM LITERATURY

- 1) Verduyn Lunel, F.M., Meis, J.F., Voss, A.: *Diagn Micr Infec Dis* 34, 213-220 (1999)
- 2) Kerr, J.P., *J Clin Microbiol* 32, 525-527 (1994)
- 3) Bernardis, F.D., Mühlischlegel, F.A., Cassone A., Fonzi, W.A.: *Infect Immun* 66, 3317-3325 (1998)
- 4) Reed, B.D.: *Obstet Gynecol Surv* 47, 551-560 (1992)
- 5) Hostetter, M.K.: *Diabetes* 39, 271-275 (1990)
- 6) Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A., Woolson, R.F., Wenzel, R.P.: *Arch Inter Med* 148, 2642-2645 (1988)
- 7) Dias, E.P., Sayed Picciani, B.L., de Carla Batista Santos, V., Oliveira Silva-Junior, G., Heffer Cantisano, M., Silva-Junior A.: *Acta Cytol* 56, 453-456 (2012)
- 8) Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D.: *Clin Microbiol Rev* 21, 606-625 (2008)
- 9) Ruhnke, M.: *Curr Drug Targets* 7, 495-504 (2006)
- 10) Rad, M.M., Zafarghandi, A.S., Zabihi, M.A., Tavallaee, M., Mirdamadi, Y.: *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012, 1-5 (2012)
- 11) Pfaller, M.A., Diekema, D.J.: *Cell Mol Immunol* 10, 11-23 (2004)
- 12) Calderone, R.A., Fonzi, W.A.: *Trends Microbiol* 9, 327-335 (2001)
- 13) Saville, S.P., Lazell, A.L., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J.L.: *Eukaryot Cell* 2, 1053-1060 (2003)
- 14) Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., Soll, D.R.: *J Bacteriol* 169, 189-197 (1987)
- 15) Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., Soll, D.R.: *Infect Immun* 67, 6652-6662 (1999)
- 16) Cuéllar-Cruz, M., Vega-González, A., Mendoza-Novelo, B., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., Quintanar-Escorza, M.A., Villagómez-Castro, J.C.: *Eur J Clin Microbiol* 31, 2513-2527 (2012)
- 17) Mynářová, L.: *Interakce mezi patogenními kvasinkami rodu *Candida* a bakterií *Pseudomonas aeruginosa**: bakalářská práce PŘF UK Praha (2011)
- 18) Han, Y., Cutler, J.E.: *Infect Immun* 63, 2714-2719 (1995)
- 19) Laforce, F.M., Mills, D.M., Iverson, K., Cousins, R., Everett, E.D.: *J Lab Clin Med* 4, 657-666 (1975)
- 20) Newman, S.L., Holly, A.: *Infect Immun* 69, 6813-6822 (2001)

- 21) Netea M.G., Gow, N.A.R., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertran, G., Hughes, H.B., Jansen, T., Jacobs, L., Buurman, E.T., Gijzen, K., Williams, D.L., Torensma, R., McKinnon, A., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Van der Meer, J.W.M., Brown, A.J.P., Kullberg, B.J.: *J Clin Invest* 116, 1642-1650 (2006)
- 22) Dementhon, K., El-Kirat-Chatel, S., Noël, T.: *PLoS ONE* 7, 1-16 (2012)
- 23) Seider, K., Heyken, A., Luttich, A., Miramon, P., Hube, B.: *Curr Opin Microbiol* 13, 392-400 (2010)
- 24) Kaur, R., Ma, B., Cormack, B.P.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7628-7633 (2006)
- 25) Romani, L.: *J Leukocyte Biol* 68, 175-179 (2000)
- 26) Romani, L.: *Curr Opin Microbiol* 2, 363-367 (1999)
- 27) Fidel, P.L.: *Curr Infect Dis Rep* 5, 488-493 (2003)
- 28) Fidel, P.L.: *Curr Opin Infect Dis* 18, 107-111 (2005)
- 29) Leigh, J.E., Barousse, M., Swoboda, R.K., Myers, T., Hager, S., Wolf, N.A., Cutright, J.L., Thompson, J., Sobel, J.D., Fidel, P.L. Jr.: *J Infect Dis* 183, 277-285 (2001)
- 30) Steele, C., Leigh, J., Swoboda, R., Fidel, P.L. Jr.: *J Infect Dis* 182, 1479-1485 (2000)
- 31) Moyes, D.L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., Kohli, A., Islam, A., Mora-Montes, H., Challacombe, S.J., Naglik, J.R.: *Cell Host Microbe* 8, 225-235 (2010)
- 32) Davies, J.C.: *Paediatr Respir Rev* 3, 128-134 (2002)
- 33) Govan, J.R., Deretic, V.: *Microbiol Mol Biol Rev* 60, 539-574 (1996)
- 34) Kerr, J.R.: *J Clin Microbiol* 32, 525-527 (1994)
- 35) Brand, A., Barnes, J.D., Mackenzie, K.S., Odds, F.C., Gow, N.A.: *FEMS Microbiol Lett* 287, 48-55 (2008)
- 36) Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, H.B., MacCallum, D.M., Bertram G., Atrih, A., Ferguson, M.A.J., Bain, J.M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L.M., Brown, A.J.P., Odds, F.C., Gow, N.A.R.: *J Biol Chem* 280, 1051-1060 (2005)
- 37) De Sordi, L., Mühlshlegel, F.A.: *FEMS Yeast Res* 9, 990-999 (2009)
- 38) Hoyer, L.L.: *Trends Microbiol* 9, 176-180 (2001)
- 39) Scherer, S., Magee, P.T.: *Microbiol Mol Biol Rev* 54, 226-241 (1990)
- 40) Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R.W., Agabian, N.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3249-3253 (2001)
- 41) Barker, K.S., Crisp, S., Wiederhold, N., Lewis, R.E., Bareither, B., Eckstein, J., Barbuch, R., Bard, M., Rogers, P.D.: *J Antimicrob Chemother* 54, 376-385 (2004)
- 42) Whelan, W.L., Partridge, R.M., Magee, P.T.: *Mol Gen Genet* 180, 107-113 (1980)

- 43) Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., Davis, R.W., Scherer, S.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7329–7334 (2004)
- 44) Poulter, R., Jeffery, K., Hubbard M.J., Shepherd M.G., Sullivan, P.A.: *J Bacteriol* 146, 833-840 (1981)
- 45) Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., Agrafioti, I., Arnaud, M.B., Bates, S., Brown, A.J., Brunke, S., Costanzo, M.C., Fitzpatrick, D.A., de Groot, P.W., Harris, D., Hoyer, L.L., Hube, B., Klis, F.M., Kodira, C., Lennard, N., Logue, M.E., Martin, R., Neiman, A.M., Nikolaou, E., Quail, M.A., Quinn, J., Santos, M.C., Schmitzberger, F.F., Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K.A., Skrzypek, M.S., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M.P., Sudbery, P.E., Srikantha, T., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N.A., Lorenz, M.C., Birren, B.W., Kellis, M., Cuomo, C.A.: *Nature* 459, 657-662 (2009)
- 46) Noble, S.M., Johnson, A.D.: *Annu Rev Genet* 41, 193-211 (2007)
- 47) Hull, C.M., Raisner, R.M., Johnson, A.D.: *Science* 289, 307-310 (2000)
- 48) Magee, B.B., Magee, P.T.: *Science* 289, 310-313 (2000)
- 49) Merz, W.G., Connelly, C., Hieter, P.: *J Clin Microbiol* 26, 842-845 (1988)
- 50) Magee, B.B., Magee, P.T.: *Microbiology* 133, 425-430 (1987)
- 51) Fonzi, W.A., Irwin, M.Y.: *Genetics* 134, 717-728 (1993)
- 52) Whelan W.L., Partridge R.M., Magee P.T.: *Mol Gen Genet* 180, 107-113 (1980)
- 53) Sherman, F.: *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* 6, 302-325 (1998)
- 54) Cannon, R.D., Jenkinson, H.F., Shepherd, M.G.: *Mol Gen Genet* 235, 453-457 (1992)
- 55) Brand, A., MacCallum, D.M., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R., Odds, F.C.: *Eukaryot Cell* 3, 900-909 (2004)
- 56) Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., Morschhäuser, J.: *Gene* 341, 119-127 (2004)
- 57) Noble, S.M., Johnson, A.D.: *Eukaryot Cell* 4, 298-309 (2005)
- 58) Tait, E., Simon, M.C., King, S., Brown, A.J., Gow, N.A.R., Shaw, D.J.: *Fungal Genet Biol* 21, 308-314 (1997)
- 59) Chibana, H., Magee, B.B., Grindle, S., Ran, Y., Scherer, S., Magee, P.T.: *Genetics* 149, 1739-1752 (1998)
- 60) Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., Davis, R.W., Scherer, S.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7329–7334 (2004)
- 61) <http://www.candidagenome.org/> ke dni 22.1.13

- 62) Braun, B.R., van het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., O Inglis, D., Uhl, M.A., Hogues, H., Berriman, M., Lorenz, M., Levitin, A., Oberholzer, U., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, A., Iouk, T., Zito, R., Frangeul, L., Tekaiia, F., Rutherford, K., Wang, E., Munro, C.A., Bates, S., Gow, N.A., Hoyer, L.L., Köhler, G., Morschhäuser, J., Newport, G., Znaidi, S., Raymond, M., Turcotte, B., Sherlock, G., Costanzo, M., Ihmels, J., Berman, J., Sanglard, D., Agabian, N., Mitchell, A.P., Johnson, A.D., Whiteway, M., Nantel, A.: *PLoS Genet* 1, 36-57 (2005)
- 63) Santos, M.A., Keith, G., and Tuite, M.F.: *EMBO J* 12, 607–616 (1993)
- 64) Bruno, V.M., Wang, Z., Marjani, S.L., Euskirchen, G.M., Martin, J., Sherlock, G., Snyder, M.: *Genome Res* 20, 1451-1458 (2010)
- 65) Ernst, J.F.: *Contrib Microbiol* 5, 98-111 (2000)
- 66) Kadosh, D., Johnson, A.D.: *Mol Biol Cell* 16, 2903–2912 (2005)
- 67) Kumamoto, C.A., Vinces, M.D.: *Cell Microbiol* 7, 1546-1554 (2005)
- 68) Braun, B.R., Johnson, A.D.: *Science* 277, 105-109 (1997)
- 69) Braun, B.R., Kadosh, D., Johnson, A.D.: *EMBO J* 22, 4753-4761 (2001)
- 70) Kadosh, D., Johnson, A.D.: *Mol Cell Biol* 21, 2496-2505 (2001)
- 71) Mateus, C., Crow, S.A. Jr., Ahearn, D.G.: *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3358–3366 (2004)
- 72) Murillo, L.A., Newport, G., Lan, C., Habelitz, S., Dungan, J., Agabian, N.M.: *Eukar Cell* 4, 1562-1573 (2005)
- 73) Nett, J.E., Lepak, A.J., Marchillo, K., Andes, D.R.: *J Infect Dis* 200, 307-313 (2009)
- 74) Morschhäuser, J.: *Med Microbiol Immunol* 199, 165-172 (2010)
- 75) Ramanan, N., Wang, Y.: *Science* 288, 1062-1064 (2000)
- 76) Lan, C., Rodarte, G., Murillo, L.A., Jones, T., Davis, R.W., Dungan, J., Newport, G., Agabian, N.: *Mol Microbiol* 53, 1451–1469 (2004)
- 77) Hoyer, L.L., Scherer, S., Shatzman, A.R., Livi, G.P.: *Mol Microbiol* 15, 39-54 (1995)
- 78) Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M., Scherer, S.: *Curr Genet* 33, 451-459 (1998)
- 79) Zhao, X., Oh, S.H., Yeater, K.M., Hoyer, L.L.: *Microbiology* 151, 1619-30 (2005)
- 80) Hube, B., Naglik, J.: *Microbiology* 147, 1997-2005 (2001)
- 81) Naglik, J.R., Challacombel, S.J., Hube, B.: *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 400-428 (2003)
- 82) Biswas, K., Morschhäuser, J.: *Mol Microbiol* 56, 649–669 (2005)
- 83) Lashkari, D.A., De Risi, J.L., McCuskers, J.H., Namath, A.F., Gentiles, C., Hwang, S.Y., Brown, P.O., Davis, R.W.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13057-13062 (1997)
- 84) Lee, N.H., Saeed, A.I.: *Methods Mol Biol* 353, 265-300 (2007)

- 85) Rex, J.H., Pfaller, M.A., Galgiani J.H., Bartlett, M.S., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Lancaster, M., Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Walsh, T.J., Barry, A.L.: *Clin Infect Dis* 24, 235-247 (1997)
- 86) Goto, M.: *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1415-1427 (2007)
- 87) Niimi, M.: *J Antimicrob Chemother* 54, 999-1006 (2004)
- 88) Chen, L.M.: *J Int Med Res* 38, 536-545 (2010)
- 89) Hornby J.M., Nickerson, K.W.: *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2305-2307 (2004)
- 90) Shepherd, M.G., Yin, C.Y., Ram, S.P., Sullivan, P.A.: *Can. J Microbiol* 26, 21-26 (1980)

