

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Daniela Světlíková

**Kvasinkové biofilmy
Yeast biofilms**

Bakalářská práce

Školitel:
prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení

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

V Praze, 9.1.2020

Podpis

Poděkování

Děkuji prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za cenné rady a vedení této práce. Mé poděkování patří též Mgr. Martině Pavlíčkové za věcné připomínky a rady. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině za podporu během studia.

Abstrakt

Mikroorganismy, ač jednobuněčné, se v přírodě zřídka nacházejí samostatně jako jednotlivé buňky, naopak, velmi ochotně se shlukují a tvoří mnohobuněčné struktury osidlující různá (i extrémní) prostředí. Stejně tak kvasinky, které jsou všeobecně považovány za jednobuněčné organismy, nacházíme často ve formě různých mnohobuněčných strukturovaných útvarů. Jedním z těchto útvarů je biofilm. Buňky biofilmu prochází diferenciací a dávají vzniknout různým specializovaným buněčným typům. Tyto subpopulace mezi sebou kooperují podobně jako buňky mnohobuněčných organismů, což je výhodné v mnoha směrech, avšak největším přínosem je vysoká odolnost biofilmu vůči nepříznivým podmínkám okolního prostředí.

Z pohledu člověka se tato vlastnost nemusí zdát až tak moc výhodnou. Tvorba biofilmu je totiž významným faktorem virulence některých patogenních kvasinek (i bakterií) a jeho eradikace je mnohem náročnější ve srovnání s planktonními buňkami. Mezi nejlépe prozkoumané kvasinkové biofilmy patří ty tvořené druhem *Candida albicans*, který je komenzálem a zároveň důležitým oportunním patogenem člověka. Výzkumy probíhají i na modelovém organismu, *Saccharomyces cerevisiae*, a to pro podobnost některých procesů s *C. albicans* a pro snadnou manipulaci s tímto údajně nepatogenním organismem.

Cílem této bakalářské práce je shrnutí dosavadních základních poznatků o vzniku a vlastnostech kvasinkového biofilmu a o jeho významu ve vztahu k člověku.

Klíčová slova: kvasinky, biofilm, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, rezistence

Abstract

In nature microorganisms are rarely found as individual cells. On the contrary, they are very willing to aggregate into multicellular structures inhabiting different (even extreme) environments. Similarly, yeasts, which are generally considered unicellular organisms are frequently found in the form of various multicellular structures. One of these is biofilm. Biofilm cells undergo differentiation and so various specialized cell types appear. These subpopulations cooperate with each other similarly to cells of multicellular organisms, which is advantageous in many ways. The greatest benefit is higher resistance of the biofilm to harsh environmental conditions.

From a human point of view, this property doesn't seem to be so advantageous. Biofilm formation is cause of virulence of pathogenic yeasts (and bacteria) and its eradication is more difficult compared to planktonic or free cells. Among the best researched yeast biofilms are those consisting of *Candida albicans*, which is both a commensal and an important opportunistic human pathogen. Research conducted within the organism, *Saccharomyces cerevisiae*, for the similarity of individual processes with *C. albicans* and for easy manipulation of this supposedly non-pathogenic organism.

The aim of this bachelor thesis is to summarize the current basic knowledge about the development and properties of biofilm and its importance in relation to human.

Key words: yeasts, biofilm, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, resistance

Obsah

1	Úvod	1
2	Mnohobuněčné struktury	1
2.1	Kolonie.....	2
2.1.1	Vrásčité kolonie – koloniové biofilmy	2
2.1.2	Hladké kolonie	2
2.2	Maty	4
2.3	Floky	4
2.4	„Flors“ („blanky“)	5
2.5	„Stalks“ („stopky“)	5
2.6	„Fingers“ („prsty“)	6
3	Biofilm	6
3.1	Vývoj a stavba koloniového biofilmu <i>S.cerevisie</i>	7
3.2	Vývoj a stavba biofilmu <i>C. albicans</i>	9
4	Přehled adhezínů kvasinek	11
4.1	Adhezivní proteiny Flo	11
4.2	Adhezivní proteiny <i>C. albicans</i>	13
4.2.1	Als proteiny	13
4.2.2	Hwp proteiny	14
5	Mechanismy podílející se na rezistenci biofilmů	14
5.1	Extracelulární matrix (ECM)	14
5.2	Effluxní pumpy (MDR pumpy)	15
5.2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
5.2.2	<i>Candida albicans</i>	17
5.3	Persistentní buňky	17
6	Patogenita kvasinek	18
6.1	Patogenita kvasinky <i>Candida albicans</i>	18
6.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> jako patogen	20
6.2.1	Probiotika – <i>Saccharomyces boulardii</i>	21
7	Polymikrobiální biofilmy	22
7.1	Vzájemné interakce <i>C. albicans</i> a <i>Staphylococcus aureus</i>	23
7.2	Vzájemné interakce <i>C. albicans</i> a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
8	Antimykotika	24
9	Závěr	25
10	Použitá literatura	26

1 Úvod

Kvasinky jsou ubikvitní jednobuněčné eukaryotické organismy patřící do říše hub – *Fungi*. Většinou jsou kulaté až oválné o velikosti do 10 μm , ale jsou schopné tvořit i protáhlé tvary buněk – pseudohyfy nebo hyfy. Charakteristické je pro ně nepohlavní rozmnožování pomocí pučení (Pringle & Hartwell, 1981). Buněčná stěna kvasinek se výrazně liší od celulózové buněčné stěny rostlin; skládá se z glykoproteinů a polysacharidů, především z glukanu a chitinu. Zastoupen je i manan. Vzhledem k tomu, že je buněčná stěna zásadní pro životaschopnost kvasinky a její struktura a biosyntéza jsou unikátní, byla dříve považována za vhodný cíl antifungálních přípravků (Bowman & Free, 2006).

Kvasinky doprovází člověka od nepaměti a ovlivňují jeho život jak pozitivním, tak i negativním způsobem. Například druh *Saccharomyces cerevisiae* nám „slouží“ v mnoha odvětvích; velmi významné a všem známé je využití produktů fermentace této kvasinky například v pivovarnictví, lihovarnictví, vinařství a v pekařství. Pro velký podíl bílkovin a vitaminů (především skupiny B) našly kvasinky využití i jako součást potravinových doplňků pro člověka a krmných směsí pro zvířata hospodářská i zájmově chovaná. Kvasinka *S. cerevisiae* je nejvíce studovaný a nejlépe charakterizovaný organismus na planetě. Díky tomu a díky snadné a levné manipulaci a sekvenční a funkční podobnosti jejích proteinů s proteiny vyšších eukaryot má nezastupitelné místo v laboratořích jakožto modelový organismus (Balzi & Goffeau, 1991). *S. cerevisiae* var. *boulardii* se používá jako součást probiotik.

Dalším známým zástupcem kvasinek je *Candida albicans*. Ačkoliv je běžnou součástí naší mikroflóry a osidluje například trávicí trakt a kůži, je zároveň častým původcem onemocnění ústní dutiny, urogenitálního traktu a krevního řečiště, a to především u osob se sníženou nebo narušenou imunitou. *C. albicans* je tedy oportunní patogen (Fonzi, 2001; Scaduto & Bennett, 2015).

2 Mnohobuněčné struktury

Individuální kvasinková buňka má limitované možnosti, co se týče specializace, ale v mnohobuněčné komunitě se buňky mohou diferencovat a získávat odlišné vlastnosti. Výsledkem pak je například lepší adaptace, ochrana buněk v komunitě proti nepříznivým podmínkám prostředí a snadnější kolonizace nového teritoria (Scherz, Shinder & Engelberg, 2001; Palková & Váchová, 2006, 2016). To, jak se určitá buňka v kolonii diferencuje, je mimo jiné závislé na pozici dané buňky v mnohobuněčné struktuře (Palková, Wilkinson & Váchová, 2014). V závislosti na podmínkách prostředí tvoří kvasinky různé mnohobuněčné struktury, které jsou tvořeny několika typy různě diferencovaných buněk s odlišnými vlastnostmi; díky tomu se buňky v komunitě mohou efektivně adaptovat na měnící se prostředí a vypořádat se se stresovými

podmínkami a hladověním. Mnohobuněčný způsob života vyžaduje kooperaci mezi buňkami ve struktuře (Váchová & Palková, 2018). Kromě prostředí je vznik struktur podmíněn také genetickou výbavou daného kmene. Přepínání fenotypů je regulováno složitými regulačními dráhami, z nichž většina má pleiotropické funkce.

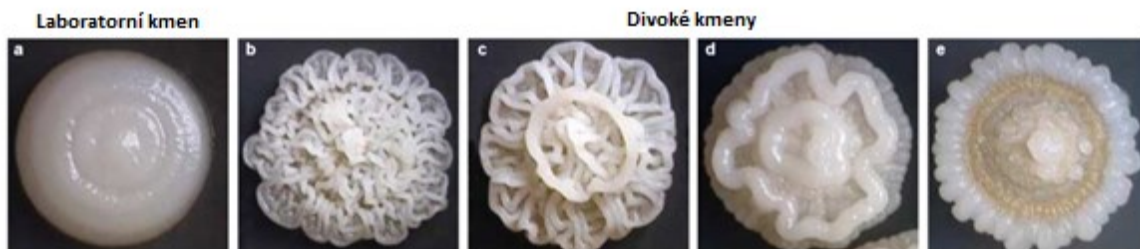
Mezi mnohobuněčné struktury tvořené kvasinkami patří kolonie, biofilmy, floky, maty a další struktury jako jsou „flors“, „fingers“ a „stalks“ (Palková & Váchová, 2016).

2.1 Kolonie

Kolonie může být tvořena několika typy kvasinek a to kulatými až oválnými (kvasinkovitěho vzhledu), pseudohyfy (buňkami protáhlého tvaru, které zůstávají připojené jedna k druhé) nebo hyfami (dlouhými vlákny bez přepážek, *C. albicans*) (Berman & Sudbery, 2002).

2.1.1 Vrásčité kolonie – koloniové biofilmy

Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* nacházející se v přírodě, jakož i mnoho tzv. nekonvenčních (patogenních kvasinek) tvoří za určitých podmínek strukturované kolonie (Obr. 1), jejichž vzhled bývá specifický pro daný druh (Palková 2006). Kolonie tvořené divokými kmeny *S. cerevisiae* vykazují mnoho vlastností typických pro přirozené biofilmy vyskytující se v přírodě, proto je nazýváme koloniovými biofilmy a díky této podobnosti je využíváme jako model ke zkoumání vzniku, architektury a interakcí v biofilmu (Šťovíček, Váchová & Palková, 2012). Vrásčité kolonie *S. cerevisiae* jsou tvořeny například kmenem BR-F. Jejich specifický vzhled a vývoj bude popsán níže v kapitole 3.1.

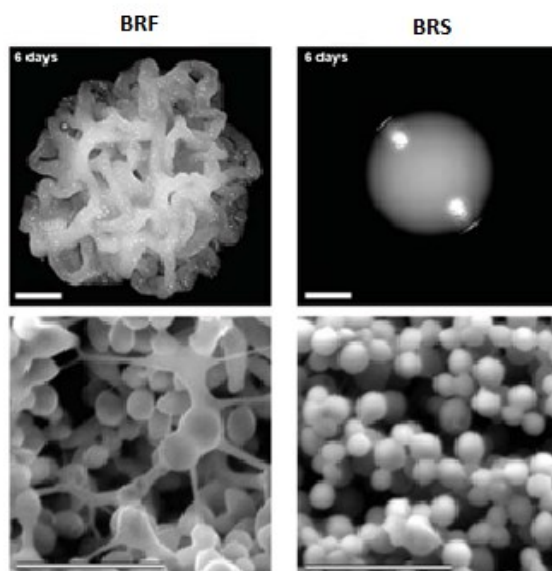


Obr. 1: Vzhled kolonií laboratorního kmene (a) a divokých kmenů (b – e) *S. cerevisiae*. Převzato z Palková, 2004.

2.1.2 Hladké kolonie

Kolonie laboratorních kmenů (např. BY) a jim podobných „čerstvě“ domestikovaných kmenů (např. BR-S) jsou hladké, málo strukturované útvary (Obr. 1). Laboratorní kmeny pocházejí z kmenů nacházených v přírodě (z divokých kmenů), které během dlouhodobého pobytu v laboratorních podmínkách zjednodušily svůj způsob života a ztratily některé vlastnosti. Kolonie mají hemisférický tvar a na rozdíl od vrásčitých kolonií se zde nacházejí dělicí se buňky na okraji a v horních vrstvách, zatímco stacionární buňky jsou uprostřed (Čáp *et al.*, 2012). Tyto kmeny netvoří extracelulární matrix, buňky jsou těsně u sebe a nejsou mezi nimi pozorovatelné bezbuněčné kavity jako ve strukturovaných koloniích. Přechod od vrásčité kolonie k hladké

domestikované kolonii je doprovázen změnami v expresi některých genů a s tím spojeným reprogramováním buněčného životního stylu (Kuthan *et al.*, 2003). Architektura hladkých i vrásčitých kolonií se výrazně liší, ale oba typy kolonií během vývoje diferencují a tvoří specializované buněčné subpopulace, které přispívají obraně proti stresu a delšímu přežívání kolonie oproti planktonním buňkám (Váchová & Palková, 2018).



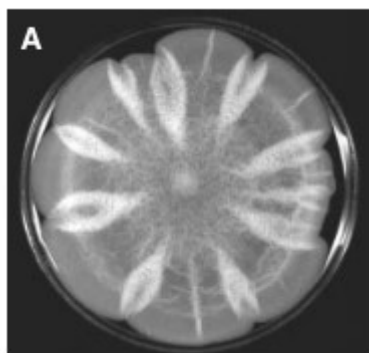
Obr. 2: Srovnání vrásčité (BRF) a hladké (BRS) kolonie. Převzato z Kuthan *et al.*, 2003.

2.1.2.1 Domestikace

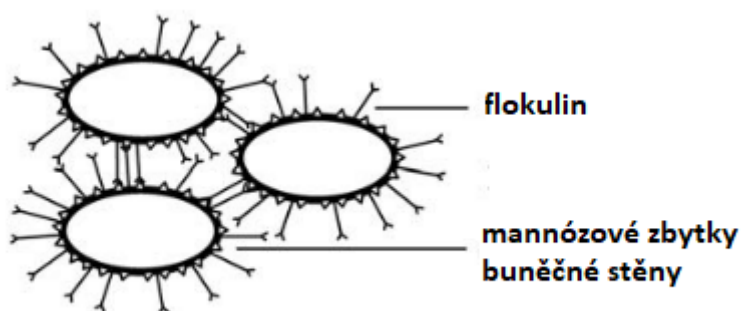
Za určitých podmínek může dojít k tzv. domestikaci, tj. k přechodu vrásčitých kolonií na hladké, které jsou nerozlišitelné od laboratorních kmenů (Obr. 2). Dochází k tomu při růstu ve vhodných laboratorních podmínkách, kdy kvasinky nemají důvod plýtvat energií na tvorbu obranných mechanismů, jako je například tvorba extracelulární matrix (ECM). Vysoká účinnost domestikace ukazuje, že se jedná o regulační změnu, ne o mutaci. Během domestikace může dojít ke změně pseudohyfy na kvasinkovité buňky. Domestikace je doprovázena specifickými změnami v genové expresi, které byly zkoumány například hybridizací s DNA čipy (DNA mikroarray metodou). Ukázalo se, že změna exprese se týkala cca 320 genů (což je asi 6 % kvasinkových genů). Pouze u dvou ze studovaných genů korelovala exprese s morfologií kolonie nezávisle na genetickém pozadí kmenu; jednalo se o gen *FLO11*, který je mimo jiné důležitý pro pseudohyfální a invazivní růst a *AQY1*, který kóduje akvaporin, protein podmiňující prostupnost pro vodu a povrchové vlastnosti (Kuthan *et al.*, 2003). Vyšší exprese akvaporinů u vrásčitých kolonií je důležitá k uspořádání buněk – mutace v akvaporinech způsobuje vyšší hydrofobicitu a tím pádem větší agregaci buněk (Carbrey *et al.*, 2001). Domestikované kmeny mohou revertovat a znovu začít vytvářet vrásčité kolonie a v nepříznivém prostředí opět formovat biofilm, domestikace je tedy reverzibilní proces (Šťovíček *et al.*, 2014).

2.2 Maty

Jedná se o komplexní mnohobuněčnou strukturu tvořenou na méně hustém 0,3% agaru (pro růst kolonií se obvykle používá 2% agar). Buňky matů diferencují do dvou populací. Střed této struktury je tvořen adherentními buňkami, zatímco periferie je složena z neadherujících buněk. Z centra vychází směrem na periferii radiální paprsky (Obr. 3) (Reynolds & Fink, 2001). Obě subpopulace buněk produkují Flo11p, který je důležitý pro adhezi. Směrem od středu k periferii ale vzrůstá gradient pH, což ovlivňuje adhezi buněk, která je na periferii redukována. Mutanti, kteří netvoří Flo11p, neumí tvořit maty a tvoří hladké kolonie na 0,3% agaru (Reynolds & Fink, 2001; Martineau, Beckerich & Kabani, 2007; Reynolds *et al.*, 2008).



Obr. 3: Mat tvořený *S. cerevisiae*.
Převzato z Reynolds a Fink, 2001.



Obr. 4: Model flokulace. Flokuliny se selektivně vážají na manózoové zbytky buněčné stěny. Upraveno dle Verstrepen *et al.*, 2003.

2.3 Floky

Floky jsou mnohobuněčné struktury vznikající flokulací (Obr. 4). Flokulace, tedy shlukování kvasinek, je možná díky přítomnosti tzv. flokulinů – proteinů na buněčném povrchu zahrnutých v buněčné adhezi, z nichž nejdůležitější pro flokulaci je Flo1p. K agregaci dochází v době limitace zdrojů, kdy jsou spotřebovány cukry a zdroje dusíku a je přítomen ethanol. Flokulace může agregované buňky chránit před účinky ethanolu i proti účinku antimikrobiálních látek a UV záření. Nevýhodou je, že buňky uprostřed struktury trpí nedostatkem živin a přebytkem odpadních produktů, v dobách hojnosti zdrojů se proto kvasinkám flokulace nevyplatí (Soares, 2011). Smukalla *et al.* (2008) vystavili flokulující buňky extrémním dávkám amfotericinu B (100krát větší koncentrace než MIC¹ pro planktonické buňky); stejně jako po vystavení vysokým dávkám ethanolu, byly poškozeny pouze buňky na vnějších okrajích, zatímco vnitřní buňky, které byly fyzicky chráněné proti prostředí, byly netknuté.

Z hlediska evoluce mají flokulující kvasinky další výhodu. Autolýza některých buněk v centru může poskytnout látky (proteiny, vitamíny, uhlovodíky) důležité pro přežití ostatních buněk komunity (Soares, 2011). Herker *et al.* (2004) toto chování označili za altruistické – buňky projdou

¹ Minimum Inhibitory Concentration, tj. nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu (Andrews, 2001).

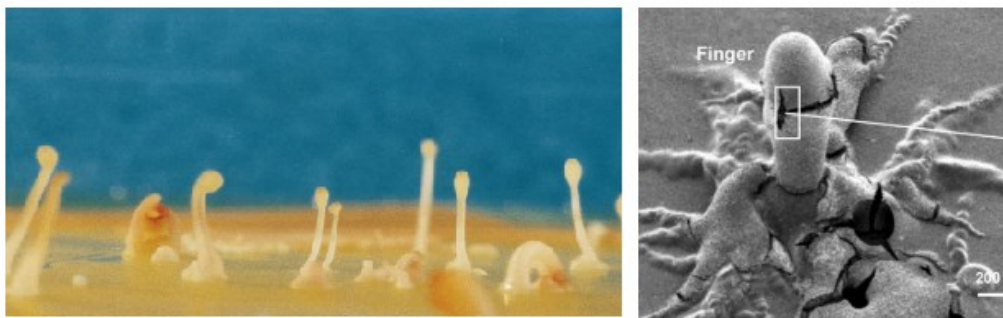
procesem podobným apoptóze za účelem poskytnutí živin dalším, pravděpodobně mladším a zdravějším buňkám, které mají větší šanci na přežití. Flokulace tak pomáhá k delšímu přežití celé komunity během nepříznivých podmínek.

2.4 „Flors“ („blanky“)

Ačkoliv nejsou jeho buňky adherované k pevnému povrchu, řadíme „flor“ mezi biofilmy. „Flor“ se tvoří na hranici mezi tekutinou a vzduchem a je tvořen vznášejícími se buňkami, mezi nimiž nebyl dlouho detekován žádný extracelulární materiál. Až Zara *et al.* (2009) u „floru“ některých kmenů poprvé identifikovali přítomnost ECM neznámého složení. „Flor“ se tvoří v případě, kdy mají kvasinky nedostatek glukózy, zároveň je přítomno větší množství ethanolu a glycerolu a je nízké pH (Zara *et al.*, 2005; Moreno-García *et al.*, 2016). Aby mohly kvasinky využívat jako zdroj energie ethanol, který nelze fermentovat, je jejich další růst závislý na přístupu ke kyslíku, kterého je také nedostatek. Dochází k reprogramování metabolických drah, jejichž výsledkem je exprese specifických genů pro flokuliny včetně *FLO11*, který je pro tvorbu „floru“ esenciální. Tím pádem dojde ke změně povrchových vlastností a ke zvýšení hydrofobicity a k agregaci buněk do floků, které zachytávají CO₂ a díky tomu jsou nesené na hladinu a formují biofilm. Mutanti v tomto genu mají méně hydrofobní povrch a nejsou schopni formovat biofilm na vodní hladině (Reynolds & Fink, 2001; Zara *et al.*, 2005).

2.5 „Stalks“ („stopky“)

Za určitých podmínek jsou různé kvasinky a bakterie schopné vytvářet mnohobuněčné stonkovité útvary vyrůstající vertikálně z agarů (Obr. 5 vlevo). „Stalks“, které vytváří *S. cerevisiae*, jsou 5 – 30 mm vysoké a mají 1 – 3 mm v průměru. Analýzou tenkých řezů bylo zjištěno, že hlavní část této struktury se skládá z jádra složeného z kvasinkovitých buněk a spor. Toto jádro obklopuje vnější vrstva složená z buněk, které jsou větší než buňky v jádru a mají menší denzitu, což zřejmě způsobuje úbytek cytoplazmy a organel. Mnoho buněk povrchové vrstvy je odumřelých a chrání strukturu před vysycháním a jinými vlivy prostředí, tvoří jakousi kůži. „Stalks“ se mohou tvořit na 4% agaru po ozáření UV. Na 4% agar se vyseje hustá vrstva buněk, z nichž některé spadnou do mikrojamek v agaru. Během aplikace UV záření, jehož optimální dávka pro vznik „stalks“ je ta, která zabije přibližně 99,95 % buněk, některé buňky v jamkách přežijí. Z buněk v jamkách vyrůstají vertikálně „stalks“ (Engelberg *et al.*, 1998; Scherz, Shinder & Engelberg, 2001).



Obr. 5: Vlevo *S. cerevisiae* „stalks“. Převzato z Engelberg *et al.*, 1998. Vpravo *C. albicans* „finger“ a krátery. Převzato z Daniels *et al.*, 2012.

2.6 „Fingers“ („prsty“)

Daniels *et al.* 2012 testovali růst *C. albicans* za nestandardních podmínek, konkrétně růst na 2% agaru při 37 °C a 20% CO₂, což jsou podmínky podobné jako v lidském gastrointestinálním traktu (GIT), kde se tato kandida běžně vyskytuje. Za těchto podmínek se na agaru tvořily tzv. „fingers“. Tyto přibližně třímilimetrové prstovité struktury (Obr. 5 vpravo) jsou zanořeny v substrátu svou rozšířenou bazí – bulbem. Bulbus je obklopen bazální monovrstvou buněk, mezi nimi se nachází tzv. fragilní rozhraní.

Bulbus a prst jsou tvořeny především kvasinkovitými buňkami, většinou nepučícími. Méně než 0,1 % buněk tvoří hyfální buňky. Ve fragilní oblasti dochází snadno k odtržení bulbu a po struktuře zůstane v agaru kráter. Agar, na který byly vyseté buňky, byl bez kráterů, což znamená, že krátery jsou tvořené až činností bulbů. Většina buněk bulbu jsou živé buňky (Daniels *et al.*, 2012).

Podmínky, za kterých byl objeven růst „fingers“, nejsou běžně používané ke kultivaci *in vitro*. Je tedy pravděpodobné, že další fenotypy vyžadující jiné kultivační podmínky zůstaly zatím neobjeveny, ať už jde o *C. albicans* nebo jiné mikroorganismy.

3 Biofilm

První vědecká zmínka o biofilmu pochází z roku 1683, kdy Antoni van Leeuwenhoek pozoroval jednu z jeho forem – zubní plak a popsal ji jako strukturu obsahující tolik zvířátek, že jejich počet snad přesahuje počet obyvatel v království (Jass, Surman & Walker, 2003). Kromě kvasinek má schopnost tvořit biofilm i mnoho bakterií, jako právě v případě zubního plaku, který je mimo jiné tvořen ústními streptokoky. Čistě bakteriální biofilmy nebudou předmětem našeho zájmu, ale budou zmíněny biofilmy polymikrobiální tvořené jak bakteriemi, tak kvasinkami.

Biofilm je definován jako trojrozměrná struktura vzniklá agregací mikroorganismů, která má schopnost adherovat k povrchům (Reynolds & Fink, 2001). Buňky biofilmu jsou obklopené extracelulární matrix (ECM), na jejíž tvorbě se podílejí. ECM zase ovlivňuje architekturu struktury

(Šťovíček, Váchová & Palková, 2012) a přispívá k její zvýšené rezistenci. Buňky biofilmu jsou tak chráněné před nepříznivými podmínkami prostředí a proti účinkům biologických a chemických antimikrobiálních agens. Tuto ochranu ztrácejí planktonické buňky, které jsou z vyvinutého biofilmu pravidelně uvolňovány za účelem osídlení nových prostředí (Costerton *et al.*, 1995). Hlavním rysem biofilmu je právě zvýšená odolnost vůči nepříznivým vlivům prostředí ve srovnání s mikroorganismy žijícími samostatně. Donlan & Costerton (2002) porovnávali MIC planktonních forem bakterií a biofilmu; u kterého byla MIC až 1000krát větší. S touto odolností souvisí i vyšší rezistence vůči antimikrobiálním přípravkům a imunitnímu systému hostitele. Z medicínského hlediska je rezistence biofilmu velký problém, jelikož výrazně komplikuje eradikaci mikroorganismu a často vede k vyšší mortalitě hostitele oproti infekci planktonními kvasinkovými buňkami (Daniels *et al.*, 2015). Identifikace mechanismů zahrnutých ve vývoji mnohobuněčných struktur je proto důležitá pro vývin antifungálních strategií (Palková & Váchová, 2016).

Hostitel a jeho tělní tekutiny poskytují dostatečné organické komponenty pro optimální růst biofilmu. Biofilmy patogenních organismů se v lidském těle mohou tvořit na biotických površích, například na sliznicích, avšak významnější a častější je jejich výskyt na abiotických površích (Costerton *et al.*, 1987). Tyto umělé povrchy bývají do těla zavedeny v souvislosti s lékařským zákrokem (močové a cévní katétry, umělé chlopně, intrauterinní tělíška), biofilmy se ale mohou tvořit i na kontaktních čočkách. Povrchy těla vlastní jsou více odolné k mikrobiální adhezi a tvorbě biofilmu díky přítomnosti buněčné a humorální imunity (fagocytóza, protilátky), biofilmy se tu proto tvoří méně. Navíc biotické povrchy mohou být také chráněny komensálními mikroorganismy, které obsadí dané prostředí a chrání jej tak před adhezí mikroorganismů tělu cizích (Costerton *et al.*, 1995; Graf *et al.*, 2019). Příkladem může být kůže, střevo či pochva. Naopak jiná místa jsou primárně sterilní a za fyziologických podmínek se zde nevyskytují žádné mikroorganismy (kloubní tekutina, krev).

Jako biofilm můžeme chápat i struktury, které se formují například na rozhraní tekutiny a vzduchu – ačkoliv nejsou adherovány k pevnému podkladu, splňují podmínku zvýšené rezistence oproti planktonickým buňkám. Takovou strukturou je například „flor“, který je v této práci popsán výše, v kapitole 2.4.

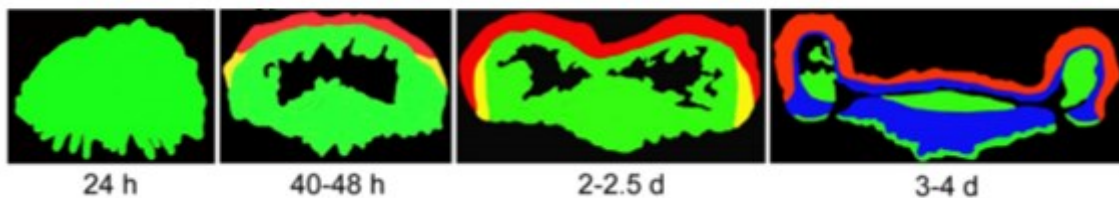
3.1 Vývoj a stavba koloniového biofilmu *S.cerevisie*

Kvasinka divokého kmene *S.cerevisiae* inokulovaná na vhodné pevné médium se dělí, dokud nezformuje viditelnou, přibližně hemisférickou strukturu. Koloniový biofilm se nejprve skládá převážně z oválných buněk a má jen krátké pseudohyfy. Později vznikají delší filamentární struktury, které invadují do agaru. Tím se v kolonii tvořené divokými kmeny *S. cerevisiae* objevují dvě hlavní části (Váchová *et al.*, 2011):

1. Vrstva povrchových buněk. Buňky této vrstvy se nacházejí nad agarem a poměrně rychle přecházejí do stacionární fáze růstu a exprimují geny, které jsou zahrnuté ve stresové odpovědi, v autofágii a v akumulaci glykogenu a trehalózy (Maršíková *et al.*, 2017) a ve sporulaci (Váchová & Palková, 2018).
2. Podpovrchová část může být tvořena pseudohyfy, které invadují do agaru, kotví strukturu k substrátu a mají přímý kontakt s živinami v agaru.

V biofilmu se postupně objevuje vnitřní kavita, ve které se nenacházejí žádné buňky a která pravděpodobně obsahuje ECM. Kolonie dále expanduje především horizontálně, přičemž centrální část tlačí na její okraj, který se tím pádem zvedá. Buňky povrchové vrstvy, které jsou ve stacionární fázi, později pokryjí celý povrch kolonie, který je ve styku se vzduchem. Vznik této vrstvy není výsledkem hladovění buněk; stacionární buňky se tvoří i přesto, že má kolonie dostatek živin, které se do těchto vrstev dostávají difuzí. Během dalšího růstu kolonie a zvětšování jejího povrchu se z vnitřních dělicích se buněk neustále formují další buňky ve stacionární fázi. Topologie buněk je znázorněna níže (Obr. 6). Nejvrchnější vrstva buněk se podílí na ochraně celé kolonie proti různým látkám z prostředí, její buňky totiž ve své membráně obsahují proteinové komplexy schopné odstraňovat toxické látky. Tyto transportéry se nazývají MDR pumpy (MultiDrug-Resistant). MDR pumpy jsou i na koncích pseudohyf, které nejsou chráněny ECM (Váchová *et al.*, 2011).

Model vývoje koloniového biofilmu



Obr. 6: Model vývoje koloniového biofilmu *S. cerevisiae*. Zelené buňky se dělí. U modrých buněk vyvýšeného okraje a pseudohyf nebylo pozorované dělení, ale ani nejsou ve stacionární fázi. Modré buňky spolu se zelenými produkují ECM. Červené buňky se nacházejí ve stacionární fázi, žluté buňky jsou v rané stacionární fázi. Převzato z Váchová *et al.*, 2011.

V hladkých koloniích laboratorních kmenů jsou buňky blízko u sebe. V koloniovém biofilmu je situace odlišná – buňky se zde nacházejí v separovaných skupinách, které jsou oddělené bezbuněčnými prostory s extracelulárním materiálem. Biofilm zároveň obsahuje více vody, která je umístěna v ECM a v mezibuněčných prostorech (Šťovíček *et al.*, 2010). Biofilm je tedy tvořen jakousi sítí, kde jsou buněčné shluky mezi sebou propojeny kanály k distribuci vody a živin v kolonii (Kuthan *et al.*, 2003; Palková & Váchová, 2006). Kromě toho tyto kanály slouží zřejmě i k odstraňování odpadních látek (Varon & Choder, 2000). Kvasinky v biofilmu nacházející se v centru jsou tedy méně znevýhodněné než ty, které se nacházejí v centru hladké kolonie (Kuthan

et al., 2003). Koloniový biofilm velikostně srovnatelný s hladkou kolonií je díky přítomnosti ECM tvořený menším počtem buněk, což umožňuje obsazení relativně velkého teritoria s poměrně menším počtem buněk (Palková & Váchová, 2006; Šťovíček *et al.*, 2010).

Podle Gimena *et al.* (1992) je charakteristickým znakem biofilmu pseudohyfální růst. Ten je umožněn pučením buněk v jednom směru (tzv. monopolárním pučením) a změnou v buněčné morfologii. Výsledkem je prodlužující se řetězec protáhlých buněk směřovaný ven z kolonie za účelem zisku živin a obsazení dosud neokupovaného prostředí. K přepnutí buněčného fenotypu z kvasinkovité formy na filamentární dochází při nedostatku dusíku. Dimorfická tranzice² je obvykle spojena s adaptací na nové podmínky prostředí. Nové dceřiné buňky jsou protáhlejší, mají tedy větší povrch, což je za podmínek nedostatečného množství zdrojů výhodné. Kromě toho je filamentární forma kvasinek schopná invadovat a penetrovat pevné substráty (agar, tkáň) (Gimeno *et al.*, 1992).

Novější výzkumy jsou ale v rozporu s některými dřívějšími tvrzeními. Analýza buněk vrásčitých kolonií nepotvrdila, že by polarita pučení a tvar buněk byly esenciální pro formaci odlišných kolonií, např. v koloniovém biofilmu nemusí být přítomny pseudohyfy (Šťovíček *et al.*, 2010). Dále bylo prokázáno, že spouštěčem pseudohyfálního růstu nemusí nutně být nedostatek dusíku, ale že k dimorfické tranzici může dojít i při nedostatku uhlíku (Granek & Magwene, 2010). A v neposlední řadě – invazivní růst byl pozorován i u buněk kvasinkovitého tvaru uspořádaných do řetězků (Šťovíček *et al.*, 2014).

Vztah mezi typem kolonií a morfologií kvasinek byl zkoumán i na koloniích *C. albicans*. (Radford, Challacombe & Walter, 1994) kultivovali šest různých kmenů *C. albicans*, jejichž mikrostrukturu pak pozorovali pomocí SEM³. Jednoznačně pozorovali vztah mezi typem kolonie a morfologií buněk. Zatímco hladké kolonie sestávaly pouze z blastospor a tzv. zubaté kolonie pouze z pseudohyf, další typy kolonií obsahovaly různé zastoupení pravých hyf, pseudohyf a blastospor. Tyto výsledky potvrdily vztah mezi morfologií kolonie a typem buněk u *C. albicans* (Joshi, Wheeler & Gavin, 1973; Radford, Challacombe & Walter, 1994)

3.2 Vývoj a stavba biofilmu *C. albicans*

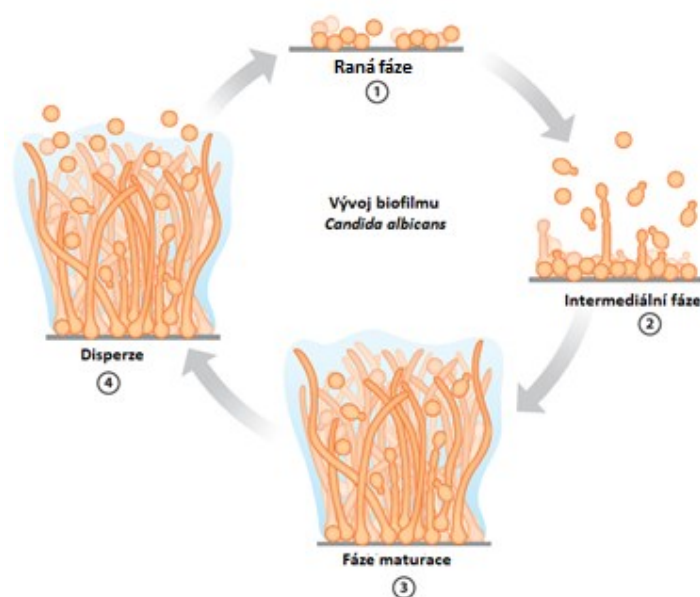
Candida albicans se liší od *S. cerevisiae* a mnoha dalších druhů kvasinek svou schopností tvořit jak kvasinkovité buňky a pseudohyfy, tak i pravé hyfy v závislosti na podmínkách prostředí. Její schopnost reverzibilního přechodu mezi kvasinkovou a hyfální formou je důvodem, proč byla dříve označována jako dimorfní kvasinka (Berman & Sudbery, 2002).

² Dimorfní tranzice je přechod z kvasinkovité formy na pseudohyfální a naopak.

³ Skenovací elektronový mikroskop.

Hyfy přispívají k celkové stabilitě biofilmu, tvoří jakési lešení pro kvasinky a další hyfy; z toho důvodu jsou biofilmy *C. albicans* ve srovnání se *S. cerevisiae* strukturovanější. Další důležitou vlastností hyf je zvýšená adheze ve srovnání s kvasinkovitými buňkami (Hube, 2004). Hyfální růst se objevuje například při expozici *Candida albicans* krevní plasmě. Přepnutí na hyfální růst je regulováno komplexním transkripčním programem, který zahrnuje zvýšení exprese genů pro povrchové adheziny asociované s hyfálním růstem (*HWP1*, *ALS3*), genů pro sekretované proteinázy (*SAP4*, *SAP5* a *SAP6*) nebo genů chránících před oxidačním poškozením (*SOD5*) (MacDonald & Odds, 1983; Brown & Gow, 1999; Nantel *et al.*, 2002). Adheze je předpokladem pro invazi buněk do epitelu a endotelu a následné poškození tkání uvolněním hydrolytických enzymů. Hyfy také umí inhibovat zabíjení neutrofilem. Po pohlcení fagocytující buňkou dochází k produkci proteináz asociovaných s hyfálním růstem, které umožní penetraci přes membrány a zničení fagocytu. Na druhou stranu jsou hyfální buňky schopné indukovat pohlcení endoteliálními buňkami a tím uniknout z krevního oběhu (Radford, Challacombe & Walter, 1994; Douglas, 2003; Sudbery, 2011; Fan *et al.*, 2013).

Chandra *et al.* (2001) popisují vývoj biofilmu *C. albicans* třemi fázemi (Obr. 7): **Raná fáze** zahrnuje adhezi kvasinkových buněk na pevný povrch. V **intermediální** fázi dochází k agregaci mikrokolonií kvasinek a tvorbě bazální vrstvy s kotvícími buňkami. Fáze **maturace** je charakterizována tvorbou pseudohyf a hyf a tvorbou ECM. Někdy je rozlišována i čtvrtá fáze – **disperze** sférických buněk z biofilmu a osidlování nových nik (Nobile & Johnson, 2015). Bazální vrstva kotvící biofilm k povrchu je uniformní a je tvořena několika řadami kvasinek, dosahuje výšky okolo 10 μm . Z ní vyrůstají vertikálně (do výšky 450 μm) hyfy a pseudohyfy, které prostupují ECM (Douglas, 2003). *C. albicans* má ve srovnání se *S. cerevisiae* vyvinutější schopnost tvořit biofilmy, které jsou navíc objemnější a obsahují více ECM (Chandra *et al.*, 2001).



Obr. 7: Vývoj biofilmu *C. albicans*. Upraveno dle Nobile & Johnson, 2015.

Maturované biofilmy *C. albicans* se skládají ze sítě kvasinkovitých buněk, pseudohyf a hyf vzájemně propojených polymerní ECM. Podobně jako u *S. cerevisiae* i zde jsou přítomné vodní kanály mezi buňkami, které usnadňují difúzi živin z prostředí do nitra struktury a zároveň umožňují odstraňování odpadních produktů (Sandai *et al.*, 2016). U biofilmů *C. albicans* dramaticky roste rezistence během vývoje⁴, která jde ruku v ruce se vzrůstající metabolickou aktivitou v biofilmu. Zatím není jisté, zda je za zvýšení rezistence zodpovědná produkce ECM nebo genetické a biochemické změny v buňkách.

Alternativním vysvětlením zvýšené rezistence by mohl být metabolický klid buněk. Proti tomu ovšem hovoří fakt, že buňky biofilmu aktivně metabolizují substráty, např. XTT⁵, který se používá k měření životaschopnosti buněk (Roehm *et al.*, 1991; Chandra *et al.*, 2001). Jisté je, že MDR pumpy naopak přispívají k rezistenci biofilmu zejména v brzkých fázích vývoje a poté jejich aktivita postupně klesá (Mukherjee *et al.*, 2003).

4 Přehled adhezínů kvasinek

4.1 Adhezivní proteiny Flo

Aby buňky mohly invadovat substrát a adherovat k sobě navzájem či k podkladu, je zapotřebí změn na buněčném povrchu. Za tyto vlastnosti zodpovídají povrchové proteiny patřící do rodiny flokulínů, což jsou proteiny buněčné stěny, které jsou s povrchem buňky spojené pomocí GPI-kotvy⁶ (Lo & Dranginis, 1996). Hlavními flokulíny jsou Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p a Flo11p.

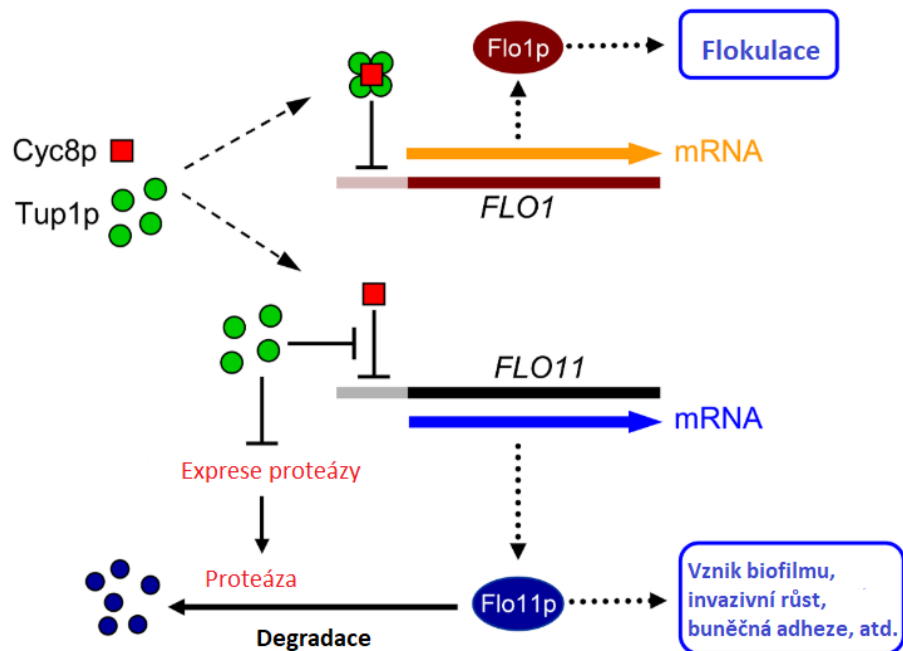
První čtyři jsou klasické lektinové flokuliny zodpovědné zejména za flokulaci (Obr. 4), což je Ca²⁺- dependentní nesexuální agregace kvasinek v tekuté kultuře (Kuthan *et al.*, 2003), která je inhibovatelná chelátory Ca²⁺ (např. citrátovým pufrem) a kompetičně inhibována například manózou (Stratford, 1992). Flo11p má odlišné vlastnosti než ostatní flokuliny a je kromě flokulace nezbytný pro invazivní růst a adhezi k povrchu a pro tvorbu pseudohyf. Flo11p je první objevený protein buněčné stěny zahrnutý v těchto procesech (Lo & Dranginis, 1998). Exprese *FLO11* je esenciální pro tvorbu strukturovaných kolonií jakýmkoliv kmenem; kmeny, které neexprimují *FLO11*, mají sníženou schopnost tvorby pseudohyf, netvoří biofilm a neadherují k plastu, tvoří hladké kolonie (Douglas *et al.*, 2007; Šťovíček *et al.*, 2010; Vopálenská *et al.*, 2010). Je tedy zřejmé, že *FLO11* je mnohem více exprimován u koloniových biofilmů než u hladkých kolonií (Kuthan *et al.*, 2003). Flo11p také participuje v soudržnosti a mechanické stabilitě koloniového biofilmu, a to indukcí tvorby mezibuněčných vláknitých spojů (fibers). Spoje vybíhají z buněčné stěny, kde jsou zřejmě kovalentně vázané a na hranici dvou buněk tvoří zipovitou strukturu (Váchová *et al.*, 2011).

⁴ U biofilmu *S. cerevisiae* tak výrazný nárůst rezistence nebyl pozorován.

⁵ 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]- 2H-tetrazolium hydroxid.

⁶ Glykofosfatidylinositolová kotva kovalentně spojuje protein s fosfolipidem buněčné membrány.

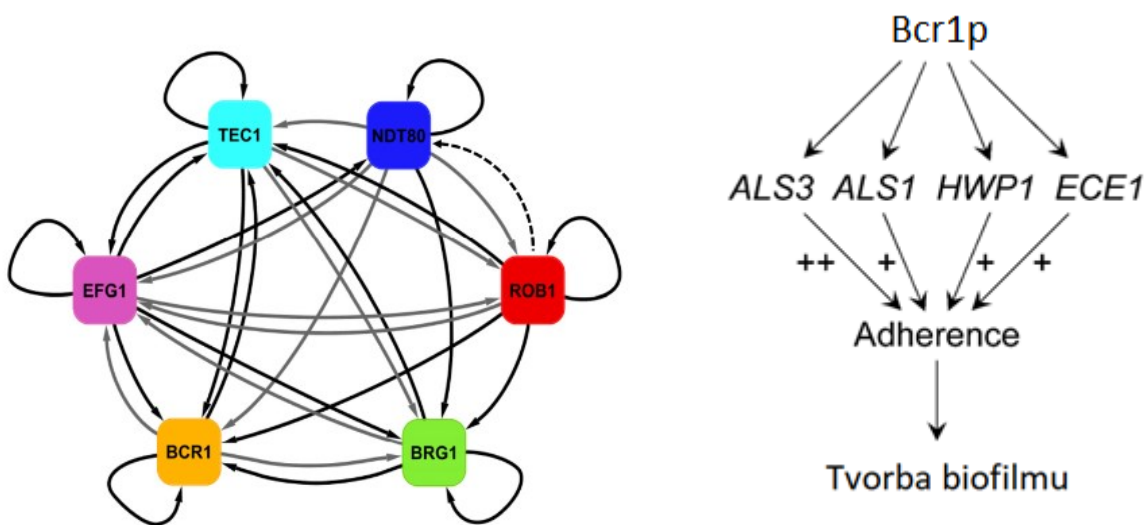
Regulace *FLO11* je složitá a pleiotropní. Mimo jiné se na regulaci *FLO11* v reakci na měnící se prostředí podílí tyto signální kaskády: Ras-cAMP cesta, MAPK signální dráha regulující filamentární růst a dráha glukóзовé represe (Verstrepen and Klis, 2006). Součástí poslední zmíněné dráhy jsou zajímavé geny *TUP1* a *SSN6 (CYC8)*. Ty kromě *FLO11* ovlivňují i *FLO1*, který společně reprimují a zabraňují tak flokulaci (Teunissen & Steensma, 1995). Korepresorový komplex složený ze čtyř podjednotek Tup1p a jedné podjednotky Cyc8p reprimuje *FLO1*. Naopak u regulace Flo11p a vzniku strukturovaných kolonií jsou účinky Tup1p a Cyc8p protichůdné. Jak je zřejmé na schématu (Obr. 8), nadměrná exprese Cyc8p inhibuje expresi genu *FLO11* a s tím souvisejících jevů a dává vzniknout hladké kolonii, zatímco Tup1p inhibuje účinky Cyc8p a zároveň inhibuje proteázu degradující Flo11p a tím nepřímo zvyšuje množství Flo11p v buňce (Nguyen *et al.*, 2018).



Obr. 8: Účinek Cyc8p a Tup1p na *FLO1* a *FLO11*. Upraveno podle Nguyen *et al.*, 2018.

4.2 Adhezivní proteiny *C. albicans*

Schopnost buněk adherovat jedna k druhé a stejně tak adheze k povrchům (biotickým i abiotickým) je důležitou vlastností biofilmu. Adheze ke tkáni hostitele je jedním z hlavních rysů patogenních hub, je předpokladem invaze a zároveň jde o první krok k rozvoji infekce (de Groot *et al.*, 2013). Podobně jako u *S. cerevisiae*, je i u *C. albicans* regulace adheze a vývoj biofilmu pod kontrolou složité sítě vzájemně propojených regulátorů. Nobile *et al.* (2012) uvedli šest hlavních regulátorů tvorby biofilmu *C. albicans*, přičemž každý z nich je důležitý pro jeho správný vývoj. Jsou to: **Efg1p, Tec1p, Bcr1p, Ndt80p, Brg1p a Rob1p** (Obr. 9 vlevo). Tyto regulátory tvoří propojenou transkripční síť, kde každý regulátor kontroluje dalších pět a většina cílových genů je kontrolována více než jedním hlavním regulátorem (Nobile *et al.*, 2012). Jejich význam se může lišit v závislosti na podmínkách prostředí, například v závislosti na teplotě, živinách nebo typu povrchu. Například pro tvorbu biofilmu na katérovém modelu hraje velkou roli Bcr1p, ale na modelu zubní protézky je jeho význam menší a jeho místo přebírá Brg1p (Nobile & Johnson, 2015). Bcr1p je zodpovědný hlavně za adhezi, a to jak k substrátu, tak vzájemnou adhezi hyf v biofilmu. Bcr1p stimuluje expresi několika genů pro povrchové proteiny (Obr. 9 vpravo). Mezi tyto Bcr1p-dependentní geny patří například *HWP1*, *ECE1*, *ALS1* a *ALS3* (Nobile *et al.*, 2006).



Obr. 9: Vlevo regulační síť tvorby biofilmu u *C. albicans*. Plné šipky znázorňují přímé interakce, přerušované nepřímé interakce. Převzato z Nobile *et al.*, 2015. Vpravo role Bcr1p a jeho cílových genů v tvorbě biofilmu. Převzato z Nobile *et al.*, 2006.

4.2.1 Als proteiny

Hlavní skupina adhezivů *C. albicans* je kódována rodinou genů *ALS* (Agglutinin-Like Sequence). Als proteiny se skládají ze tří hlavních částí. **C-terminální doména** je bohatá na Ser/Thr a obsahuje GPI - kotvu, která připojuje zbytek proteinu k buněčné stěně. C-terminální doména a následující část – **tandemové repetice** jsou u různých proteinů Als v podstatě

identické. Jednotlivé Als proteiny se mezi sebou liší zejména **N-terminálními sekvencemi**, jejichž variabilita je zodpovědná za substrátovou specifitu. Proteiny se mezi sebou liší adhezí například k fibronektinu, lamininu (složky pojivových tkání), endotelu a kolagenu (Sheppard *et al.*, 2004).

4.2.2 Hwp proteiny

Hwp1p a Hwp2p (Hyphal Wall Protein) jsou manózoové adheziny specifické pro hyfy. Jsou esenciální pro jejich normální růst a pro stabilní připojení hyf k hostitelským buňkám, podílí se tedy na patogenitě kvasinek. Mutanti *hwp1* jsou schopni infikovat hostitele, ale protože nemohou efektivně adherovat ke sliznici, nejsou tak virulentní a relativně brzy jsou odstraněni fagocytózou (Staab *et al.*, 1999; Tsuchimori *et al.*, 2000).

Geny *ALS* i *HWP* jsou oba důležité pro správnou tvorbu biofilmu, absence jednoho z nich vede k nesprávnému vývoji biofilmu. Dalším pro hyfy specifickým proteinem je Ece1p, jehož regulace je také závislá na Bcr1p. U mutantů *ece1* není poškozen vývoj biofilmu, pouze dochází ke snížené adhezi hyf (Fan *et al.*, 2013).

5 Mechanismy podílející se na rezistenci biofilmů

Jak již bylo zmíněno, zásadní vlastností biofilmů je jejich zvýšená rezistence vůči okolnímu prostředí. Ve vztahu k člověku je to rezistence vůči antimikrobiálním látkám či imunitnímu systému hostitele. Podle Douglas (2003) se na rezistenci podílí:

- omezená penetrace léků přes ECM,
- zvýšená metabolická aktivita a zvýšená exprese MDR pump,
- snížený růst, limitace živin a s tím spojené fenotypové změny,
- přítomnost persisterů.

Fakt, že za rezistenci není zodpovědný jeden mechanismus, významně komplikuje terapeutické postupy.

5.1 Extracelulární matrix (ECM)

Pomocí ESEM⁷ bylo u *S. cerevisiae* pozorováno, že na rozdíl od hladkých kolonií, kde jsou buňky blízko u sebe, u koloniových biofilmů se buňky vyskytují v separovaných skupinách. Mezi nimi se nachází bezbuněčný prostor propojující celou kolonii, který je vyplněn ECM (Kuthan *et al.*, 2003; Maršíková *et al.*, 2017). ECM je klíčovou součástí biofilmu; obklopuje jeho buňky a poskytuje jim tak jakousi ochranu a zároveň jim zajišťuje homeostázu (Davey & O'toole, 2000). Materiál ECM je vylučovaný kvasinkami biofilmu a obsahuje četné polysacharidové komponenty a proteiny, přesné složení se ale liší mezi druhy i kmeny (Al-Fattani & Douglas, 2006). ECM je důležitá také pro architekturu a chování mnohobuněčné komunity a její interakci s prostředím. Materiál

⁷ ESEM – environmentální rastrovací elektronová mikroskopie umožňuje pozorování povrchů biologických vzorků v jejich přirozeném stavu (Kuthan *et al.*, 2003).

izolovaný z ECM vykazoval velkou kapacitu retence vody, ECM je tedy zřejmě zahrnutá v ukládání vody (Šť'ovíček *et al.*, 2010) a živin (Maršíková *et al.*, 2017). O složení ECM u *S. cerevisiae* víme málo. Jedním z důvodů je její rezistence k různým analytickým postupům (Kuthan *et al.*, 2003).

Částečně známé je ale složení ECM *C. albicans*, která je jako důležitý patogen zkoumána více. Již dříve se předpokládalo, že je ECM *C. albicans* složena z polysacharidů podobných těm, které se nacházejí v buněčné stěně a že tyto polysacharidy obsahují glukózové a manózové zbytky, protože se na ně vázala barviva pro ně specifická (Chandra *et al.*, 2001).

Později Al-Fattani a Douglas (2006) extrahovali ECM *C. albicans* a *C. tropicalis* a porovnávali zastoupení některých látek. Chemická analýza ukázala, že zatímco u *C. albicans* většinu ECM tvoří sacharidy, přičemž hlavní zastoupení má glukóza, jež tvoří 32 % materiálu matrix, u *C. tropicalis* je hlavní složkou hexosamin (27,4 %) a glukóza tvoří pouze 0,5 %. Lišilo se i zastoupení dalších složek, což je v souladu s tvrzením výše, že složení ECM se mezi kvasinkami liší (Al-Fattani & Douglas, 2006).

Autoři jiného experimentu odhalili procentuální zastoupení makromolekulárních komponent ECM *C. albicans*. Proteiny (včetně glykosylovaných), kterých bylo identifikováno přes 500, jsou zastoupeny přibližně 55 %. Předpokládá se, že většinu z nich tvoří enzymy, včetně hydrolytických, které mohou hrát roli v aktivním rozkladu biopolymerů. Dále jsou zastoupeny sacharidy (25 %), z nichž nejvíce je α -1,2-mananů a α -1,6-mananů, zbytek tvoří β -1,6-glukany. V ECM se také nacházejí lipidy (15 %) a DNA (5 %). DNA, která je především nekódující, má zřejmě strukturální i protektivní funkci (Zarnowski *et al.*, 2014).

V několika experimentech bylo prokázáno, že při pěstování biofilmu v prostředí, ve kterém je zajištěn průtok tekutiny, dochází ke zvýšené produkci ECM ve srovnání s biofilmy, které jsou pěstovány ve statických podmínkách (Hawser, Baillie & Douglas, 1998; Al-Fattani & Douglas, 2006). Vysvětlením mohou být změny v množství kyslíku a živin nebo nutnost odolávat proudu tekutiny (Kumamoto, 2002). V těchto podmínkách, které simulují podmínky na katétru umístěném v krevním řečišti, se zvýšenou produkcí ECM roste i rezistence biofilmu (Al-Fattani & Douglas, 2006).

Ačkoliv role ECM v rezistenci není zcela jasná (Baillie & Douglas, 1998; Baillie, 2000), kromě možného aktivního rozkladu biopolymerů, zřejmě hraje roli zpomalování difúze antimikrobiálních látek a roztoků přes polymery ECM (Costerton, Stewart & Greenberg, 1999) a ochrana buněk uvnitř ECM před těmito látkami (Finkel & Mitchell, 2011).

5.2 Effluxní pumpy (MDR pumpy)

Biomembrány poskytují účinnou bariéru proti hydrofilním molekulám, z nichž většina může projít skrz jen díky specifickým transportním systémům. Na druhé straně jsou ale membrány

snadno prostupné pro amfifilní sloučeniny, mezi něž patří některé léky (Bambeke, Balzi & Tulkens, 2000). Buňky mají více možností, jak se vypořádat s cytotoxickými látkami; jednou z nich je redukce plazmatické koncentrace léčiv jejich transportem z buněk pryč pomocí membránových proteinů (Balzi & Goffeau, 1994). Tyto effluxní proteiny se nacházejí v mnoha typech buněk od archebakterií přes prokaryota a kvasinky až po vyšší eukaryota a většina z nich rozeznává široké spektrum nepříbuzných látek a může tak odstraňovat mnoho farmakologicky nepříbuzných léčiv (Bambeke, Balzi & Tulkens, 2000).

Běžným mechanismem vzniku rezistence je zvýšená exprese MDR pump, k níž dochází u planktonických buněk v odpovědi na přítomnost antifungálních látek. Naproti tomu u biofilmu se zvýšená exprese MDR pump objevuje několik hodin po kontaktu prvních buněk s povrchem a zůstává zvýšená po celou dobu vývoje biofilmu, ať už jsou přítomny antifungální látky nebo ne (Kumamoto, 2002; Mateus, Crow & Ahearn, 2004). Proteiny udělující kvasinkám rezistenci mohou být klasifikovány do dvou hlavních skupin (Bambeke, Balzi & Tulkens, 2000):

- **MFS** (Major Facilitators Superfamily) je třída sekundárně aktivních transportérů, které k exportu látek většinou využívají H⁺ antiport;
- **ABC** (ATP-Binding Cassette) je skupina více než 50 proteinů vyskytujících se od bakterií po člověka, které sdílí základní strukturu. Obsahují konzervovanou kazetu vázající ATP, jehož hydrolyzou získávají energii potřebnou k transportu cizorodých látek.

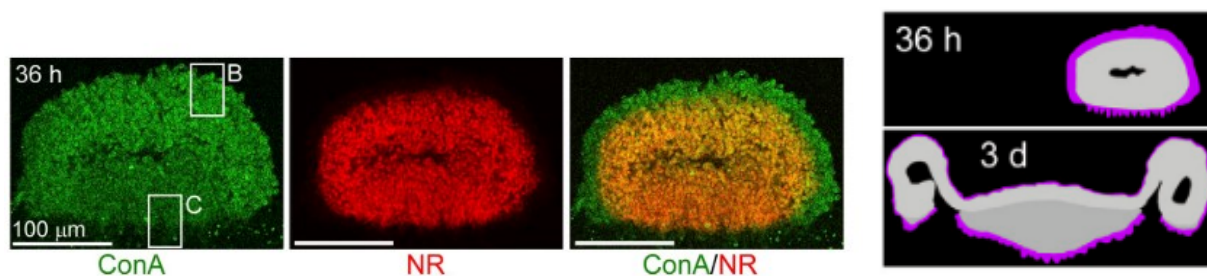
Buňky v tekuté kultuře, které mají mutované některé z genů pro MDR pumpy vykazují větší citlivost k antimykotickým přípravkům či jiným chemikáliím, zatímco biofilm tvořený těmito mutanty si svou rezistenci zachovává, což potvrzuje, že za rezistenci biofilmu není zodpovědný pouze jeden molekulární mechanismus (Douglas, 2003).

5.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Mezi proteiny mnohočetné lékové rezistence u *Saccharomyces cerevisiae* patří například Pdr5p (též Ydr1p) a Snq2p, které náleží do skupiny ABC proteinů. Ačkoliv jsou tyto dva transportéry strukturně podobné a vykazují i podobnosti ve specifitě, je mezi nimi několik substrátových odlišností. Např. Snq2p je zodpovědný za rezistenci k mutagenu 4-NQO⁸, Pdr5p za rezistenci k cykloheximidu a mnoha dalším nepříbuzným lékům. Oba přispívají k rezistenci *S. cerevisiae* k azolům (Hirata *et al.*, 1994; Mahé, Lemoine & Kuchler, 1996; Van Bambeke, Balzi & Tulkens, 2000).

⁸ 4-nitrochinolin-1-oxid.

Po aplikaci Nílské červeni (NR)⁹ na koloniové biofilmy *S. cerevisiae* Váchová et al. (2011) pozorovali, že povrchová vrstva struktury se nebarví. Vrstva nepřijímající barvivo byla nejsilnější u kolonií starých 24 – 36 hodin a postupně se zmenšovala, až zmizela úplně (Obr. 10). Nebarvení se okrsky poté byly patrné pouze na koncích pseudohyf invadujících do agaru. Po aplikaci NaN₃, který inhibuje ATPázu se obarvila celá kolonie včetně povrchové vrstvy. Což znamená, že i v povrchové části se nachází lipidy, ale Nílská červeň byla při prvním barvení pravděpodobně odstraněna nějakým mechanismem, který vyžaduje funkční ATPázu. Přidáme-li k tomu fakt, že u dvojitého mutantu *pdr5snq2* bylo odstraňování barviva z buňky zcela blokováno, můžeme říci, že za odstraňování NR z povrchových buněk koloniového biofilmu jsou v tomto případě zodpovědné Pdr5p a Snq2p náležící do skupiny ABC transportních proteinů (Váchová et al., 2011). Podobného efektu odstraňování NR lze dosáhnout narušením *PDR1* genu, který kóduje transkripční aktivátor MDR transportérů Pdr5p a Snq2p (Balzi & Goffeau, 1994).



Obr. 10: Vlevo pomocí barvení ConA (Concanavalin A) a NR je zřetelná vrstva aktivně odstraňující NR. Vpravo je ilustrován vývoj této vrstvy v čase. Převzato z Váchová et al., 2011.

5.2.2 *Candida albicans*

U *C. albicans* se na lékové rezistenci podílí effluxní pumpy patřící jak do rodiny ABC transportérů (Cdr1p a Cdr2p), tak i transportéry MFS (např. Mdr1p) (Van Bambeke, Balzi & Tulkens, 2000). Mutanti v těchto genech neměli narušenou schopnost vývoje biofilmu, ale byli výrazně citlivější vůči antimykotikům oproti nemutovaným kmenům, a to především v brzkých fázích vývoje biofilmu (Mukherjee et al., 2003) Stejně jako u *Saccharomyces cerevisiae* jsou tedy MDR pumpy zodpovědné za rezistenci zejména na začátku vývoje biofilmu (Blankenship & Mitchell, 2006).

5.3 Persistentní buňky

Kromě MDR pump a extracelulární matrix přispívají k rezistenci biofilmu i persistentní buňky, které vykazují vyšší odolnost a jsou schopny přežít aplikace vysokých koncentrací antifungálních prostředků i během dlouhodobých terapií. Persisteři, kteří byli pozorováni v biofilmu (nikoliv

⁹ Barvivo váží se na lipidová granula a membrány (Greenspan and Fowler, 1985).

v tekuté kultuře) *C. albicans*, tvoří jen malou část populace, přibližně 0,01 – 0,5 %. Přesto je toto množství dostačující pro rozšíření do dalších míst nebo vytvoření nového biofilmu se subpopulací persistentních buněk (LaFleur, Kumamoto & Lewis, 2006). Buňky, u kterých je snižená metabolická aktivita (pomalu rostoucí buňky nebo buňky ve stacionární fázi) jsou obecně méně citlivé k mnoha antimikrobiálním látkám. Podobně je tomu v případě persistentních buněk, u kterých byla pozorována inhibice většiny hlavních energetických drah. Zároveň je u nich zvýšená exprese „heat shock“ proteinů, které se podílí na stresové odpovědi při vystavení buněk nevhodným (extrémním) podmínkám (Li *et al.*, 2015).

6 Patogenita kvasinek

Lidské tělo hostí mnoho mikroorganismů; jejich počet několikanásobně převyšuje počet buněk těla vlastních. Nejvíce se jich nachází ve střevě, kde je přibližně 10^{14} komensálních bakterií (Berg, 1996; Gill *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2007). Mezi další mikroflóru patří kvasinky, které tvoří <0,1 % mikrobiomu. Většinu kvasinek tvoří *C. albicans*, méně zastoupená je *C. tropicalis* a *C. glabrata* (Barza *et al.*, 1987). Ačkoliv početně jsou kvasinky v menšině, jejich buněčná velikost je více než 10krát větší oproti bakteriím (Czerucka, Piche & Rampal, 2007; Underhill & Iliev, 2014). U zdravých jedinců je střevní (stejně jako např. vaginální nebo orální) mikroflóra v rovnováze díky vzájemné kompetici zástupců kvasinek i bakterií. Je mnoho způsobů, jak tuto rovnováhu narušit. Dojde-li například ke zvýšení hladiny glukózy nebo snížení pH, budou ve výhodě kvasinky, které tyto podmínky lépe tolerují (kandidózy u diabetiků). Známým a častým příkladem je také poškození bakteriální mikrobioty užíváním antibiotik, což vede k uvolnění místa pro *C. albicans* a k jejímu přemnožení (Iliev *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2012; Akimoto-Gunther *et al.*, 2016; Graf *et al.*, 2019).

Na fakt, že s nadužíváním antibiotik a narušováním komenzální mikroflóry se zvyšuje prevalence fungálních infekcí, upozornil již Kligman v roce 1952. Ten došel k závěru, že kandidóza následující antibiotickou terapií je způsobena přemnožením mikroorganismů, které jsou na léčbu antibiotiky rezistentní, ať už se jedná o kvasinky nebo bakterie (Kligman, 1952).

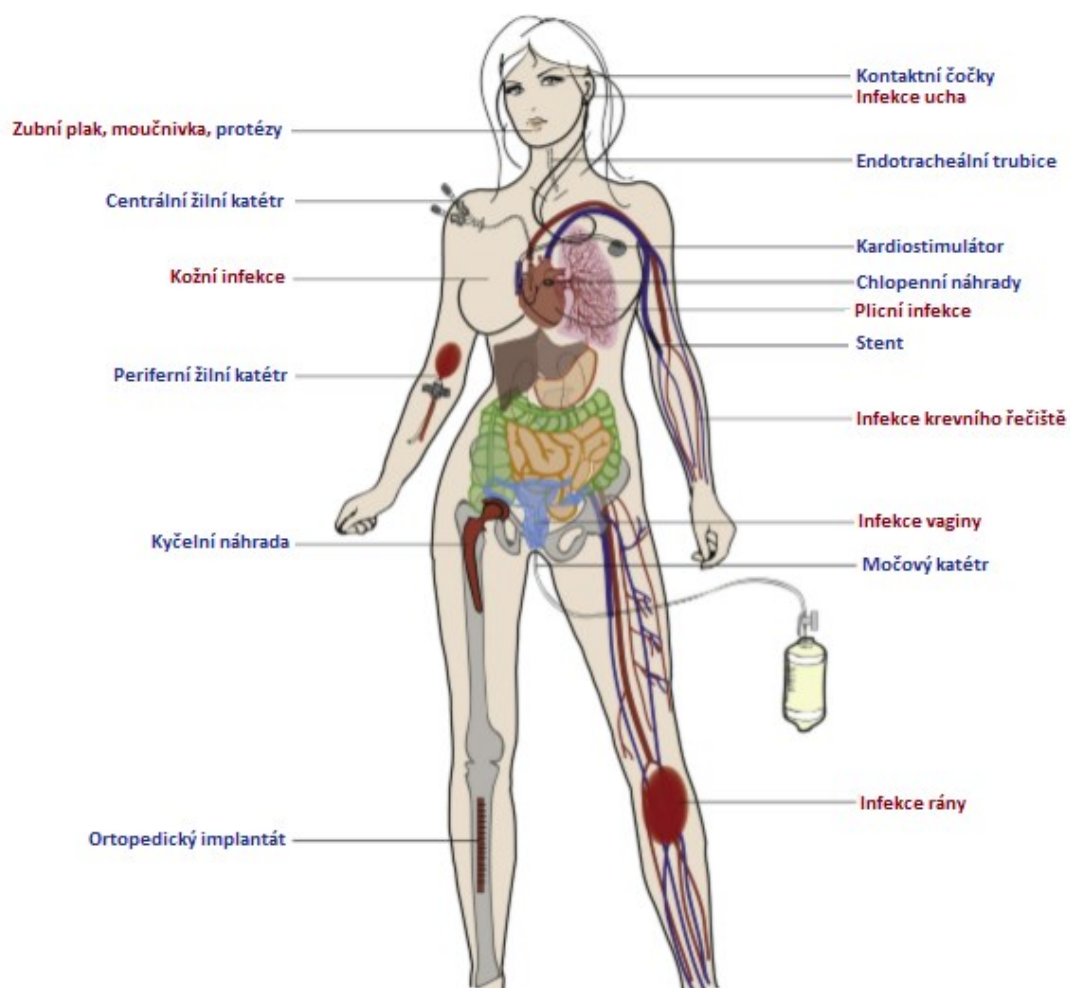
6.1 Patogenita kvasinky *Candida albicans*

Kvasinky jsou přirozenými obyvateli savčího gastrointestinálního traktu (GIT) (Iliev *et al.*, 2012), zástupci *Candida albicans* byli izolováni z GIT zdravých jedinců, kromě toho asymptomaticky kolonizují i močopohlavní trakt, ústa a kůži (Lohse *et al.*, 2018). Na rozdíl od *S. cerevisiae* ji zřídka nacházíme v prostředí, jako třeba v půdě.

Kromě toho, že je *Candida albicans* běžným komenzálem, má schopnost způsobovat širokou škálu onemocnění v mnoha tkáních hostitele. Musí být proto vysoce adaptovaná k přežití na

hostitelských povrchů za různých podmínek a musí být schopná na tyto měnící se podmínky reagovat. Změny genové exprese jsou u *C. albicans* v dynamické rovnováze s měnícím se prostředím (Natarajan *et al.*, 2001; Enjalbert *et al.*, 2003; Hube, 2004)

Některé možnosti zvratu od komenzála k patogenu byly zmíněny (užívání antibiotik, diabetes), mezi další rizikové faktory patří přítomnost různých umělých povrchů v těle, z nichž nejčastěji infikovaný je centrální žilní katétr (Douglas, 2003). Jak bylo zmíněno výše, příčinou časté tvorby biofilmů na umělých povrchích je absence imunitní odpovědi, která poskytuje ochranu povrchům tělu vlastním. Kvasinky, které se sem dostanou (z kůže, penetrací z GIT nebo i z rukou lékařského personálu) zde snáze vytvoří biofilm než v těle hostitele (Goldmann & Pier, 1993). Běžná místa infekcí spojených s tvorbou biofilmu *C. albicans* jsou znázorněna níže (Obr. 11).



Obr. 11: Lokality spojené s tvorbou biofilmu *Candida albicans*. Modře vyznačeny abiotické povrchy, červeně vyznačené jsou infekce související s přirozenými povrchy. Upraveno dle Gulati & Nobile, 2016.

Mezi nejčastější kvasinkové infekce objevující se na přirozených povrchích těla jsou infekce vagíny. Většina jich je způsobená *C. albicans* (kolem 95 %), zbytek je převážně způsoben dalšími kvasinkami rodu *Candida* (Akimoto-Gunther *et al.*, 2016). Kvasinková infekce vagíny se alespoň jednou za život objeví u většiny žen, někdy jsou tyto infekce rekurentní (Sobel *et al.*, 1993). Příčin

rozvoje infekce je zde několik, ale jednou z nejčastějších je opět používání antibiotik a poškození přirozené mikroflóry, v tomto případě především *Lactobacillus spp.*, který chrání sliznici vaginy před kolonizací jinými mikroorganismy (Sobel, 1992; Graf *et al.*, 2019).

Časté jsou též infekce ústní dutiny, které se stejně jako vaginální kandidóza vyskytují i u lehce imunokompromitovaných osob. Vážnější případy nastávají při penetraci *C. albicans* z povrchu hlouběji do tkání, odkud se může dostat do krevního oběhu a následně v podstatě kamkoliv po těle a způsobit život ohrožující systémové infekce. Široké spektrum infekcí je unikátní pro *C. albicans* právě díky její schopnosti účinně se adaptovat a snést různé hladiny kyslíku, CO₂, živin, pH a teploty (Calderone & Fonzi, 2001).

6.2 *Saccharomyces cerevisiae* jako patogen

Kvasinka *S. cerevisiae* je ubikvitní; kromě případů využití člověkem se tato saprofytická kvasinka běžně vyskytuje například v půdě a na rostlinách (Sobel *et al.*, 1993). Sporné je to s kolonizací lidského těla. Mnozí autoři, mezi nimi Murphy & Kavanagh (1999) a Martin *et al.* (2017) považují *S. cerevisiae* za běžnou součást lidské intestinální mikroflóry, zatímco například Enache-Angoulvant & Hennequin (2005) uvádějí, že není zcela jasné, zda je tato kvasinka stálým komenzálem nebo zda je přítomna pouze přechodně po jídle. Zřejmě vzhledem k jejímu širokému využití zmíněném na začátku, je spíše považována za nepatogenní organismus, avšak od konce minulého století postupně přibývá případů invazivních onemocnění, při nichž byla izolována z krve právě *S. cerevisiae*. Kromě systémových infekcí byly pozorovány i případy endokarditidy, pneumonie, vaginitidy atd. (Sobel *et al.*, 1993; Riquelme *et al.*, 2003); to vedlo k přerazení „pivní kvasinky“ do skupiny oportunních patogenů nízké virulence (Hoog, 1996).

První případ fungémie způsobené *S. cerevisiae* pochází z roku 1970 a popisuje pacientku, které byla voperována umělá mitrální chlopeč. Po zákroku jí byla podána antibiotika nejprve profylakticky a poté pro další nálezy a podezření na bakteriální endokarditidu byla léčena dalšími antibiotiky. Celkem byla pacientka léčena velkými dávkami antibiotik po 12 týdnů po operaci. Poté měla horečky a v několika hemokulturách byly přítomné kvasinky rodu *Saccharomyces*. Léčba amfotericinem B po několik týdnů byla úspěšná (Stein, Folkens & Hruska, 1970).

S. cerevisiae byla také identifikována jako původce vaginitid. Sobel a kolektiv (1993) v retrospektivní studii identifikovali 9 pacientek (z více než 2000 vyšetřovaných žen)¹⁰, u kterých byla z pochvy izolována *S. cerevisiae*. Většina pacientek vykazovala symptomy vaginitidy způsobené *C. albicans*, u dvou pacientek šlo zřejmě o bezpříznakovou kolonizaci. U většiny pacientek byly odhaleny rizikové faktory, např. léčba azolovými ATB, léčba více ATB během krátké doby nebo lokální aplikace kortikosteroidů, které snižují imunitní odpověď organismu. Žádná z pacientek neužívala probiotika, ani nepracovala s kvasinkami. Sobel *et al.* (1993) předpokládají,

¹⁰ Jednalo se o retrospektivní studii od roku 1985 na klinice v Michiganu.

že příčinou vaginitid bylo poškození přirozené mikrobioty a imunosuprese a následný nárůst rezistentní *S. cerevisiae*. Podle Nyirjesy *et al.* (1995)¹¹ může být původcem infekce *S. cerevisiae* exogenní inokulace. Kmen izolovaný z pochvy ženy trpící vaginitidou byl identifikován jako identický s kmenem, se kterým pracoval její muž při výrobě pizzy. Z čehož vyplývá, že i domestikované kmeny mají potenciál způsobit infekci. Identitu kmenů izolovaných z místa infekce s kmeny komerčně dostupnými k pečení potvrdil i Clemons *et al.* (1997).

U *S. cerevisiae* bylo identifikováno několik faktorů virulence. Podle McCuskera *et al.* (1994) je jedním z nich schopnost růstu při 42 °C, která umožňuje kvasince přežít zvýšenou teplotu vyvinutou v reakci na přítomnost infekce. Dalším faktorem je podle Clemonse *et al.* (1994) pseudohyfální růst a invazivita, které nebyly pozorovány u neklinických izolátů *S. cerevisiae*. Obě tyto domněnky vyvrátili Klingberg *et al.* (2008), když na klinických izolátech prokázali, že růst při 42 °C není nutný pro persistenci v hostiteli. Také během experimentu prokázali podobnou schopnost klinických i neklinických izolátů tvořit pseudohyfy a růst invazivně. Z čehož vyplývá, že nejdůležitějším faktorem je zřejmě stav imunitního systému hostitele než charakteristika daného kmenu *S. cerevisiae*.

Výhodou pro *S. cerevisiae* je její přirozená rezistence k některým běžně používaným antimykotikům. Citlivost k amfotericinu B je podobná jako u *C. albicans*, naproti tomu u některých azolů (např. itrakonazolu) byla MIC *S. cerevisiae* 10krát větší než *C. albicans* (Sobel *et al.*, 1993).

Infekce způsobené *S. cerevisiae* jsou vzácné, incidence fungémie způsobené *S. cerevisiae* je mezi 1 % a 3,6 % dle dvou různých retrospektivních studií (Taylor *et al.*, 1994; Piarroux *et al.*, 1999), u postižení pochvy je to 0,23 – 1,16 % kvasinkových infekcí (Echeverría-Irigoyen *et al.*, 2011). Mezi rizikové faktory patří snížená lokální nebo celková imunitní funkce, například po užívání antibiotik, stáří nebo onemocnění AIDS (Aucott *et al.*, 1990), i když jsou známy i případy infekcí i u lidí, kteří nevykazovali žádný z rizikových faktorů.

Dalším prokázaným rizikovým faktorem je užívání probiotik obsahujících *Saccharomyces boulardii* a to zejména při současně zavedeném cévním katétru (Enache-Angoulvant & Hennequin, 2005).

6.2.1 Probiotika – *Saccharomyces boulardii*

Probiotika jsou žijící mikroorganismy, které příznivě ovlivňují hostitele a jeho zdraví zlepšením vlastností jeho přirozené střevní mikroflóry (Havenaar, 1992). Kromě bakterií se jako probiotikum používá kvasinka *Saccharomyces boulardii*. Tato kvasinka je údajně schopná v kombinaci s ATB snížit rekurenci *Clostridium difficile* (Mcfarland *et al.*, 1994) a zároveň je

¹¹ Studie na 750 ženách s chronickými vaginálními symptomy.

klinicky efektivní v prevenci průjmů způsobených antibiotickou léčbou (Surawicz *et al.*, 1989). Je proto využívána v mnoha zemích jako prevence i jako terapeutikum při průjmu a dalších poruchách trávicího traktu (Czerucka, Piche & Rampal, 2007).

S. boulardii je termotolerantní a její teplotní optimum je 37 °C (pro *S. cerevisiae* je to 30 °C), tj. fyziologická teplota hostitele. Také je rezistentnější k prostředí žaludku (Fietto *et al.*, 2004) a zároveň je přirozeně rezistentní k antibiotikům, což z ní dělá vhodného kandidáta na probiotické použití. *S. boulardii* není přirozenou součástí autochtonní flóry, byla izolována z liči.

Dříve byly *S. cerevisiae* a *S. boulardii* považovány za rozdílné mikroorganismy s metabolickými a molekulárními rozdíly (McFarland, 1996). Nyní je *S. boulardii* spíše pokládána za subtyp *S. cerevisiae* podle determinace délky určitých mikrosatelity obsahujících lokusů (Enache-Angoulvant & Hennequin, 2005).

Je známo několik případů invazivních infekcí způsobených *S. cerevisiae* asociovaných s používáním *S. boulardii* jako probiotika. Jedním z nich je případ 60letého polymorbidního muže, kterému byla podávána širokospektrá antibiotika a zároveň užíval probiotikum obsahující *S. boulardii*, přestože měl zaveden centrální žilní katétr, jehož přítomnost je kontraindikací pro podání *S. boulardii* (Czerucka, Piche & Rampal, 2007). Po několika dnech se u něj rozvinula fungémie, jejímž původcem byla *S. cerevisiae*. Pomocí MALDI-TOF¹² byla prokázána velice blízká podobnost mezi izolátem *S. cerevisiae* z hemokultury a *S. boulardii* z probiotik v porovnání se vzorky *S. cerevisiae* z třech jiných případů. Následující léčba zahrnující odstranění centrálního žilního katétru a podávání flukonazolu byla úspěšná (Martin *et al.*, 2017).

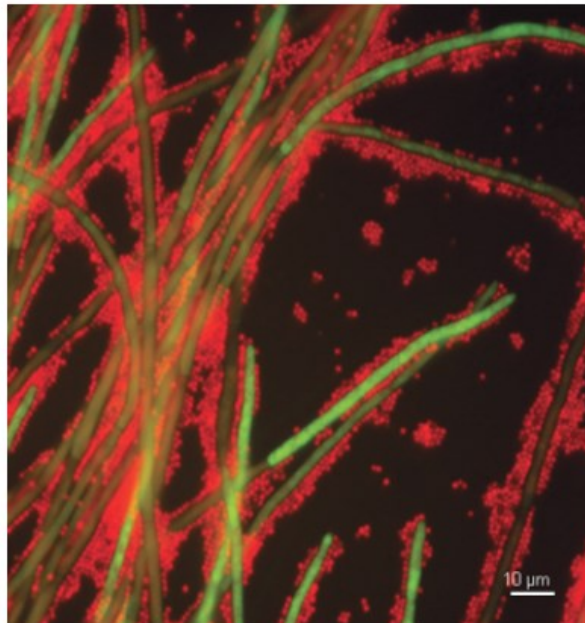
7 Polymikrobiální biofilmy

Bakteriální i kvasinkové biofilmy vykazují mnoho mechanismů rezistence. Ve skutečnosti ale situace může být ještě složitější a to proto, že kromě jednodruhových biofilmů se setkáváme i s biofilmy, které jsou složeny z více druhů mikroorganismů (Wolcott *et al.*, 2013). Podle některých autorů tyto polymikrobiální biofilmy dokonce převládají, a to jak během zdraví, tak i během nemoci (Stacy *et al.*, 2016). Polymikrobiální biofilmy mohou být tvořeny komenzálními či patogenními zástupci bakterií a eukaryotických kvasinek, což komplikuje jak diagnózu, tak i následnou terapii, která vyžaduje použití širšího spektra antimikrobiálních látek (Harriott & Noverr, 2011). Interakce mezi druhy může zahrnovat jak kooperaci, tak inhibici (Harriott & Noverr, 2009).

¹² MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight). Hmotnostní spektrometrie je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli (Havliš, 1999).

7.1 Vzájemné interakce *C. albicans* a *Staphylococcus aureus*

Přestože je *Staphylococcus aureus* klinicky významný patogen často spojený se systémovými infekcemi či infekcemi abiotických povrchů (např. permanentních katétrů), sám na těchto umělých površích biofilmy tak snadno netvoří. Harriott & Noverr (2009) zjistili, že jeho adheze na povrchy a tvorba biofilmu může být usnadněna přítomností *C. albicans*. Bylo pozorováno, že v takovém biofilmu jsou *C. albicans* i *S. aureus* rozprostřeni v celém biofilmu (Obr. 12), přičemž *S. aureus* tvoří mikrokolonie na hyfách *C. albicans*, které mu slouží jako jakési lešení. V tomto polymikrobiálním biofilmu je zvýšená rezistence „zlatého stafylokoka“ k vankomycinu ve srovnání s infekcí volnými buňkami (Harriott & Noverr, 2009).



Obr. 12: Polymikrobiální biofilm tvořený *C. albicans* a *S. aureus*. Adheze bakterií k hyfám *C. albicans* znázorněná pomocí fluorescenční metody. Převzato z Shirliff *et al.*, 2009

7.2 Vzájemné interakce *C. albicans* a *Pseudomonas aeruginosa*

Vzhledem k tomu, že *Pseudomonas aeruginosa* a *C. albicans* jsou běžně izolovány společně z místa infekce, předpokládala se jejich vzájemná interakce. Bylo prokázáno, že se nejedná o kooperaci (Shirliff *et al.*, 2009). *In vitro* bylo zjištěno, že patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je schopná se pomocí pili připojit na hyfy *C. albicans* a způsobit jejich smrt. Naopak téměř nikdy neadheruje na kvasinkové buňky *C. albicans* a ani neovlivňuje jejich životaschopnost. V experimentu bylo pozorováno, že *P. aeruginosa* tvoří biofilm přednostně na hyfách *C. albicans* než na okolním abiotickém povrchu (krycím sklíčku). Biofilm *C. albicans* tedy zřejmě usnadňuje tvorbu biofilmu *P. aeruginosa*. Mutant, který neprodukuje fosfolipázu C štěpící membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, má výrazně sníženou schopnost zabíjet hyfy *C. albicans* (Hogan & Kolter, 2002).

8 Antimykotika

Ve srovnání s antibiotiky je antimykotických přípravků méně kvůli větší podobnosti kvasinkové eukaryotické buňky s buňkami vyšších eukaryot. Hlavním cílem antimykotik je ergosterol, jakožto součást plazmatické membrány hub, která se nenachází u vyšších eukaryotických buněk. Jako antifungální přípravky se používají buď polyeny, jejichž zástupcem je amfotericin B¹³ produkovaný fermentací půdní aktinomycety *Streptomyces nodosus*, nebo azoly (Janoff et al., 1993). Azoly jsou syntetické léky, které nenalezneme v přírodě (Orozco et al., 1998).

Zatímco azoly inhibují syntézu ergosterolu, amfotericin B se váže přímo na ergosterol a poškozuje jeho funkce, což má obojí za následek ztrátu organizace plazmatické membrány kvasinek, narušení membránové permeability, poškození enzymů a smrt buňky (Berg et al., 1986; Gallis, Drew & Pickard, 1990). Antimykotická léčba je celkem úspěšná v likvidaci buněk uvolňovaných z biofilmu, ale samotný biofilm může dlouho odolávat. Z tohoto důvodu je pro biofilmové infekce typická jejich rekurence (Costerton et al., 1995).

¹³ Poprvé izolován roku 1953.

9 Závěr

Za rezistenci kvasinkových biofilmů zodpovídá několik různých mechanismů, které se navzájem doplňují. MDR pumpy, které jsou schopny snižovat plazmatickou koncentraci cizorodých látek, se podílí na rezistenci zejména na začátku vývoje biofilmu, poté jejich aktivita klesá. U extracelulární matrix je tomu naopak, v průběhu vývoje biofilmu se zvyšuje její množství a u maturovaných biofilmů je její role v rezistenci zásadní. Dalším mechanismem je snížená citlivost metabolicky méně aktivních persistentních buněk a buněk ve stacionární fázi.

Vzhledem k tomu, že je *Candida albicans* významným komenzálem a zároveň i patogenem člověka, jsou její biofilmy (včetně těch polymikrobiálních) intenzivně zkoumané. Výzkum probíhá i na biofilmech modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae* a to i z důvodu podobnosti některých procesů s *C. albicans*.

Biofilmy mohou tvořit jak mikroorganismy komenzální, tak cizorodé. Komenzálové se stávají patogenními v případech lokálního nebo celkového útlumu imunitní odpovědi nebo mohou tvořit biofilmy na abiotických površích, kde chybí protektivní role slizniční imunity.

Dalším predispozičním faktorem je například nedodržení aseptických postupů při zavádění katétrů a dalších umělých těles do těla pacienta, kdy se spolu s nimi mohou do těla dostat mikroorganismy z povrchu těla nebo dokonce z rukou lékařského personálu.

Rezistence biofilmu v čase roste a jeho odstranění se stává mnohem náročnějším. Léčba biofilmových infekcí je zátěží nejen pro zdravotnický systém, ale především pro zdraví pacienta. Paleta antifungálních prostředků se neustále rozšiřuje. Snahou je vyvinout takové látky, které by měly co nejméně nežádoucích účinků a zároveň byly co nejúčinnější v likvidaci buněk usazených v biofilmu. Z tohoto důvodu je důležité porozumět mechanismům, které za vznikem rezistence stojí. Boj s biofilmem je náročný, proto by měl být kladen velký důraz na preventivní opatření, která by jeho vzniku předcházela.

10 Použitá literatura

- Akimoto-Gunther, L. *et al.* (2016) 'Highlights regarding host predisposing factors to recurrent vulvovaginal candidiasis: Chronic stress and reduced antioxidant capacity', *PLoS ONE*, 11(7), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0158870.
- Al-Fattani, M. A. and Douglas, L. J. (2006) 'Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance', *Journal of Medical Microbiology*, 55(8), pp. 999–1008. doi: 10.1099/jmm.0.46569-0.
- Andrews, J. M. (2001) 'Determination of minimum inhibitory concentrations', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), pp. 5–16.
- Aucott, J. N. *et al.* (1990) 'Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*: Report of three cases and review', *Clinical Infectious Diseases*, 12(3), pp. 406–411. doi: 10.1093/clinids/12.3.406.
- Baillie, G. S. (2000) 'Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(3), pp. 397–403. doi: 10.1093/jac/46.3.397.
- Baillie, G. S. and Douglas, L. J. (1998) 'Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), pp. 1900–1905. doi: 10.1128/aac.42.8.1900.
- Balzi, E. and Goffeau, A. (1991) 'Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast', *BBA - General Subjects*, 1073(2), pp. 241–252. doi: 10.1016/0304-4165(91)90128-4.
- Balzi, E. and Goffeau, A. (1994) 'Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance', *BBA - Bioenergetics*, 1187(2), pp. 152–162. doi: 10.1016/0005-2728(94)90102-3.
- Van Bambeke, F., Balzi, E. and Tulkens, P. M. (2000) 'Antibiotic efflux pumps', *Biochemical Pharmacology*, 60(4), pp. 457–470. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00291-4.
- Bambeke, F. Van, Balzi, E. and Tulkens, P. M. (2000) 'Antibiotic efflux pumps (Commentary)', *Biochemical Pharmacology*, 60(c), pp. 1–24.
- Barza, M. *et al.* (1987) 'Effect of broad-spectrum parenteral antibiotics on "colonization resistance" of intestinal microflora of humans', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(5), pp. 723–727. doi: 10.1128/AAC.31.5.723.
- Berg, D. *et al.* (1986) 'Antimycotic sterol biosynthesis inhibitors', *Trends in Pharmacological Sciences*, 7(C), pp. 233–238. doi: 10.1016/0165-6147(86)90330-5.
- Berg, R. D. (1996) 'The indigenous gastrointestinal microflora', *Trends in Microbiology*, 4(11), pp. 430–435. doi: 10.1016/0966-842X(96)10057-3.
- Berman, J. and Sudbery, P. E. (2002) '*Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast', *Nature Reviews Genetics*, 3(12), pp. 918–930. doi: 10.1038/nrg948.
- Blankenship, J. R. and Mitchell, A. P. (2006) 'How to build a biofilm: a fungal perspective', *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), pp. 588–594. doi: 10.1016/j.mib.2006.10.003.
- Bowman, S. M. and Free, S. J. (2006) 'The structure and synthesis of the fungal cell wall', *BioEssays*, 28(8), pp. 799–808. doi: 10.1002/bies.20441.
- Brice Enjalbert, André Nantel, and M. W. (2003) 'Stress-induced Gene Expression in *Candida albicans*: Absence of a General Stress Response □D', *Molecular Biology of the Cell*, 14(April), p. 1460–1467.
- Brown, A. J. P. and Gow, N. A. R. (1999) 'Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis', *Trends in Microbiology*, 7(8), pp. 333–338. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01556-5.
- Čáp, M. *et al.* (2012) 'Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels

- with a Tumor-Affected Organism', *Molecular Cell*, 46(4), pp. 436–448. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.001.
- Carbrey, J. M. *et al.* (2001) 'Aquaporins in *Saccharomyces*: Characterization of a second functional water channel protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), pp. 1000–1005. doi: 10.1073/pnas.98.3.1000.
- Chandra, J. *et al.* (2001) 'Biofilm Formation by the Fungal Pathogen', *Society*, 183(18), pp. 5385–5394. doi: 10.1128/JB.183.18.5385.
- Clemons, K. V. *et al.* (1994) 'Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Infectious Diseases*, 169(4), pp. 859–867. doi: 10.1093/infdis/169.4.859.
- Clemons, K. V. *et al.* (1997) 'Application of DNA typing methods and genetic analysis to epidemiology and taxonomy of *Saccharomyces* isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), pp. 1822–1828.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987) 'Bacterial biofilms in nature and disease', 41(1), pp. 435–464. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251.
- Costerton, J. W. *et al.* (1995) 'Microbial biofilms', *Annual review of microbiology*, 49(1), pp. 711–745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999) 'Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections', *Science*, 284(5418), pp. 1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
- Czerucka, D., Piche, T. and Rampal, P. (2007) 'Review article: Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(6), pp. 767–778. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x.
- Daniels, K. J. *et al.* (2012) 'The "finger," a Unique multicellular morphology of *Candida albicans* induced by CO₂ and dependent upon the ras1-cyclic AMP pathway', *Eukaryotic Cell*, 11(10), pp. 1257–1267. doi: 10.1128/EC.00217-12.
- Daniels, K. J. *et al.* (2015) 'Role of Tec1 in the development, architecture, and integrity of sexual biofilms of *Candida albicans*', *Eukaryotic Cell*, 14(3), pp. 228–240. doi: 10.1128/EC.00224-14.
- Davey, M. E. and O'toole, G. A. (2000) 'Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp. 847–867. doi: 10.1128/mubr.64.4.847-867.2000.
- Donlan, R. M. and Costerton, and J. W. (2002) 'Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms', *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167.
- Douglas, L. J. (2003) 'Candida biofilms and their role in infection', *Trends in Microbiology*, 11(1), pp. 30–36. doi: 10.1016/S0966-842X(02)00002-1.
- Douglas, L. M. *et al.* (2007) 'Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion', *Eukaryotic Cell*, 6(12), pp. 2214–2221. doi: 10.1128/EC.00284-06.
- Echeverría-Irigoyen, M. J. *et al.* (2011) '*Saccharomyces cerevisiae* Vaginitis: Microbiology and In Vitro Antifungal Susceptibility', *Mycopathologia*, 172(3), pp. 201–205. doi: 10.1007/s11046-011-9414-x.
- Enache-Angoulvant, A. and Hennequin, C. (2005) 'Invasive *Saccharomyces* Infection: A Comprehensive Review', *Clinical Infectious Diseases*, 41(11), pp. 1559–1568. doi: 10.1086/497832.
- Engelberg, D. *et al.* (1998) 'Multicellular stalk-like structures in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bacteriology*, 180(15), pp. 3992–3996.
- Fan, Y. *et al.* (2013) 'Hyphae-Specific Genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and Relevant Signaling Pathways in *Candida albicans*', *Mycopathologia*, 176(5–6), pp. 329–335. doi: 10.1007/s11046-013-9684-6.

- Fietto, J. L. R. *et al.* (2004) 'Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*', *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), pp. 615–621. doi: 10.1139/w04-050.
- Finkel, J. S. and Mitchell, A. P. (2011) 'Genetic control of *Candida albicans* biofilm development', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 9(2), pp. 109–118. doi: 10.1038/nrmicro2475.
- Fonzi, R. A. C. and W. A. (2001) 'Virulence factors of *Candida albicans*', *TRENDS in Microbiology*, 9(7), pp. 327–335.
- Gallis, H. A., Drew, R. H. and Pickard, W. W. (1990) 'Amphotericin B: 30 years of clinical experience', *Reviews of Infectious Diseases*, 12(2), pp. 308–329. doi: 10.1093/clinids/12.2.308.
- Gill, S. R. *et al.* (2006) 'Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome', *Science*, 312(5778), pp. 1355–1359. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/312/5778/1355>.
- Gimeno, C. J. *et al.* (1992) 'Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS', *Cell*, 68(6), pp. 1077–1090. doi: 10.1016/0092-8674(92)90079-R.
- Goldmann, D. A. and Pier, G. B. (1993) 'Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization', *Clinical Microbiology Reviews*, 6(2), pp. 176–192+C+. doi: 10.1128/cmr.6.2.176.
- Graf, K. *et al.* (2019) 'Keeping *Candida* commensal: How lactobacilli antagonize pathogenicity of *Candida albicans* in an in vitro gut model', *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(9). doi: 10.1242/dmm.039719.
- Granek, J. A. and Magwene, P. M. (2010) 'Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast', *PLoS Genetics*, 6(1). doi: 10.1371/journal.pgen.1000823.
- Greenspan, P. and Fowler, S. D. (1985) 'Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red', *Journal of Lipid Research*, 26(7), pp. 781–789.
- de Groot, P. W. J. *et al.* (2013) 'Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick', *Eukaryotic Cell*, 12(4), pp. 470–481. doi: 10.1128/EC.00364-12.
- Gulati, M. and Nobile, C. J. (2016) '*Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 18(5), pp. 310–321. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.
- Harriott, M. M. and Noverr, M. C. (2009) '*Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Form Polymicrobial Biofilms : Effects on Antimicrobial Resistance', *Journal of Medical Microbiology*, 53(9), pp. 3914–3922. doi: 10.1128/AAC.00657-09.
- Harriott, M. M. and Noverr, M. C. (2011) 'Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 19(11), pp. 557–563. doi: 10.1016/j.tim.2011.07.004.
- Havenaar, R. (1992) 'Probiotics : A General View', 1, pp. 151–170.
- Havliš, J. (1999) 'Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF', *Vesmír*, pp. 445–448.
- Hawser, S. P., Baillie, G. S. and Douglas, L. J. (1998) 'Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms', *Journal of Medical Microbiology*, 47(3), pp. 253–256. doi: 10.1099/00222615-47-3-253.
- Hirata, D. *et al.* (1994) '*Saccharomyces cerevisiae* YDR1, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance', *Current Genetics*, 26(4), pp. 285–294. doi: 10.1007/BF00310491.
- Hogan, D. A. and Kolter, R. (2002) '*Pseudomonas*-*Candida* interactions: An ecological role for virulence factors', *Science*, 296(5576), pp. 2229–2232. doi: 10.1126/science.1070784.

- Hoog, G. S. (1996) 'Risk assessment of fungi reported from humans and animals', *Mycoses*, 39(11–12), pp. 407–417. doi: 10.1111/j.1439-0507.1996.tb00089.x.
- Hube, B. (2004) 'From commensal to pathogen: Stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*', *Current Opinion in Microbiology*, 7(4), pp. 336–341. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.003.
- Iliev, I. D. *et al.* (2012) 'Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor dectin-1 influence colitis', *Science*, 336(6086), pp. 1314–1317. doi: 10.1126/science.1221789.
- Janoff, A. S. *et al.* (1993) 'JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, 3(3), 451471 (1993) A. S. Janoff', W. R. Perkins,' 3(3).
- Jass, J., Surman, S. and Walker, J. (2003) *Medical biofilms: detection, prevention and control*. 2nd edn. John Wiley & Sons, 2003.
- Joshi, K. R., Wheeler, E. E. and Gavin, J. B. (1973) 'Scanning electron microscopy of colonies of six species of *Candida*', *Journal of Bacteriology*, 115(1), pp. 341–348.
- Kligman, A. M. (1952) 'Are fungus infections increasing as a result of antibiotic therapy?', *Journal of the American Medical Association*, 149(11), pp. 979–983. doi: 10.1001/jama.1952.02930280001001.
- Klingberg, T. D. *et al.* (2008) 'Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits', *FEMS Yeast Research*, 8(4), pp. 631–640. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00365.x.
- Kumamoto, C. A. (2002) 'Candida biofilms', *Current Opinion in Microbiology*, 5(6), pp. 608–611. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00371-5.
- Kuthan, M. *et al.* (2003) 'Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology', *Molecular Microbiology*, 47(3), pp. 745–754. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03332.x.
- LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A. and Lewis, K. (2006) 'Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), pp. 3839–3846. doi: 10.1128/AAC.00684-06.
- Li, P. *et al.* (2015) 'Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), pp. 6101–6112. doi: 10.1128/AAC.00543-15.
- Lo, W. and Dranginis, A. M. (1998) 'Flo11.pdf', 9(January), pp. 161–171.
- Lo, W. S. and Dranginis, A. M. (1996) 'FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin', *Journal of Bacteriology*, 178(24), pp. 7144–7151. doi: 10.1128/jb.178.24.7144-7151.1996.
- Lohse, M. B. *et al.* (2018) 'Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 16(1), pp. 19–31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107.
- MacDonald, F. and Odds, F. C. (1983) 'Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant', *Journal of General Microbiology*, 129(2), pp. 431–438. doi: 10.1099/00221287-129-2-431.
- Mahé, Y., Lemoine, Y. and Kuchler, K. (1996) 'The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo', *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), pp. 25167–25172. doi: 10.1074/jbc.271.41.25167.
- Maršiková, J. *et al.* (2017) 'Metabolic differentiation of surface and invasive cells of yeast colony biofilms revealed by gene expression profiling', *BMC Genomics*, 18(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12864-017-4214-4.
- Martin, I. W. *et al.* (2017) '*Saccharomyces boulardii* probiotic-associated fungemia: questioning the

- safety of this preventive probiotic's use', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier Inc., 87(3), pp. 286–288. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.12.004.
- Martineau, C. N., Beckerich, J. M. and Kabani, M. (2007) 'Flo11p-independent control of "mat" formation by Hsp70 molecular chaperones and nucleotide exchange factors in yeast', *Genetics*, 177(3), pp. 1679–1689. doi: 10.1534/genetics.107.081141.
- Mason, K. L. *et al.* (2012) 'Candida albicans and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy', *Infection and Immunity*, 80(10), pp. 3371–3380. doi: 10.1128/IAI.00449-12.
- Mateus, C., Crow, S. A. and Ahearn, D. G. (2004) 'Adherence of Candida albicans to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), pp. 3358–3366. doi: 10.1128/AAC.48.9.3358-3366.2004.
- McCusker, J. H. *et al.* (1994) 'Genetic characterization of pathogenic Saccharomyces cerevisiae isolates', *Genetics*, 136(4), pp. 1261–1269.
- McFarland, L. V. *et al.* (1994) 'A Randomized Placebo-Controlled Trial of Saccharomyces boulardii in Combination With Standard Antibiotics for Clostridium difficile Disease', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 271(24), pp. 1913–1918. doi: 10.1001/jama.1994.03510480037031.
- McFarland, L. V. (1996) 'Saccharomyces boulardii is not Saccharomyces cerevisiae [4]', *Clinical Infectious Diseases*, 22(1), pp. 200–201. doi: 10.1093/clinids/22.1.200.
- Moreno-García, J. *et al.* (2016) 'Stress responsive proteins of a flor yeast strain during the early stages of biofilm formation', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 51(5), pp. 578–588. doi: 10.1016/j.procbio.2016.02.011.
- Mukherjee, P. K. *et al.* (2003) 'Mechanism of fluconazole resistance in Candida albicans biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols', *Infection and Immunity*, 71(8), pp. 4333–4340. doi: 10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003.
- Murphy, A. and Kavanagh, K. (1999) 'Emergence of Saccharomyces cerevisiae as a human pathogen Implications for biotechnology', *Enzyme and Microbial Technology*, 25(7), pp. 551–557. doi: 10.1016/S0141-0229(99)00086-1.
- Nantel, André *et al.* (2002) 'Transcription Profiling of Candida albicans Cells Undergoing the Yeast-to-Hyphal Transition', *Molecular Biology of the Cell*, 13, pp. 3452–3465. doi: 10.1091/mbc.E02.
- Natarajan, K, 1 *et al.* (2001) 'Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast', 21(13), pp. 4347–4368. doi: 10.1128/MCB.21.13.4347.
- Nguyen, P. Van *et al.* (2018) 'Cyc8p and Tup1p transcription regulators antagonistically regulate Flo11p expression and complexity of yeast colony biofilms', *PLoS Genetics*, 14(7), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pgen.1007495.
- Nobile, C. J. *et al.* (2006) 'Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo', *PLoS Pathogens*, 2(7), pp. 0636–0649. doi: 10.1371/journal.ppat.0020063.
- Nobile, C. J. *et al.* (2012) 'A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans', *Cell*. Elsevier Inc., 148(1–2), pp. 126–138. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.048.
- Nobile, C. J. and Johnson, A. D. (2015) 'Candida albicans Biofilms and Human Disease', *Annual Review of Microbiology*, 69(1), pp. 71–92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.
- Nyirjesy, P. *et al.* (1995) 'Saccharomyces cerevisiae vaginitis: Transmission from yeast used in baking', *Obstetrics and Gynecology*, 86(3), pp. 326–329. doi: 10.1016/0029-7844(95)00174-P.
- Orozco, A. S. *et al.* (1998) 'Mechanism of fluconazole resistance in Candida krusei', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), pp. 2645–2649. doi: 10.1128/aac.42.10.2645.

- Palkova, Z. (2004) 'Multicellular microorganisms: Laboratory versus nature', *EMBO Reports*, 5(5), pp. 470–476. doi: 10.1038/sj.embor.7400145.
- Palková, Z. and Váchová, L. (2006) 'Life within a community: Benefit to yeast long-term survival', *FEMS Microbiology Reviews*, 30(5), pp. 806–824. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00034.x.
- Palková, Z. and Váchová, L. (2016) 'Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 57, pp. 110–119. doi: 10.1016/j.semcd.2016.04.006.
- Palková, Z., Wilkinson, D. and Váchová, L. (2014) 'Aging and differentiation in yeast populations: Elders with different properties and functions', *FEMS Yeast Research*, 14(1), pp. 96–108. doi: 10.1111/1567-1364.12103.
- Piarroux, R. *et al.* (1999) 'Are live saccharomyces yeasts harmful to patients?', *Lancet*, 353(9167), pp. 1851–1852. doi: 10.1016/S0140-6736(99)02001-2.
- Pringle, John R and Hartwell, L. H. (1981) 'The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle', *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 11, pp. 97–142.
- Radford, D. R., Challacombe, S. J. and Walter, J. D. (1994) 'A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*', *Journal of Medical Microbiology*, 40(6), pp. 416–423. doi: 10.1099/00222615-40-6-416.
- Reynolds, T. B. *et al.* (2008) 'Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients', *Eukaryotic Cell*, 7(1), pp. 122–130. doi: 10.1128/EC.00310-06.
- Reynolds, T. B. and Fink, G. R. (2001) 'Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation', *Science*, 291(5505), pp. 878–881. doi: 10.1126/science.291.5505.878.
- Riquelme, Arnaldo J. *et al.* (2003) 'Saccharomyces cerevisiae Fungemia After Saccharomyces boulardii Treatment in Immunocompromised Patients' *Journal of Clinical Gastroenterology*, 36(1):41–43
- Roehm, N. W. *et al.* (1991) 'An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT', *Journal of Immunological Methods*, 142(2), pp. 257–265. doi: 10.1016/0022-1759(91)90114-U.
- Sandai, D. *et al.* (2016) 'Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system', *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(11). doi: 10.5812/jjm.37385.
- Scaduto, C. M. and Bennett, R. J. (2015) 'Candida albicans the chameleon: Transitions and interactions between multiple phenotypic states confer phenotypic plasticity', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 26, pp. 102–108. doi: 10.1016/j.mib.2015.06.016.
- Scherz, R., Shinder, V. and Engelberg, D. (2001) 'Anatomical Analysis of', *Society*, 183(18), pp. 5402–5413. doi: 10.1128/JB.183.18.5402.
- Sheppard, D. C. *et al.* (2004) 'Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*', *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), pp. 30480–30489. doi: 10.1074/jbc.M401929200.
- Shirtliff, M. E., Peters, B. M. and Jabra-Rizk, M. A. (2009) 'Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria', *FEMS Microbiology Letters*, 299(1), pp. 1–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x.
- Smukalla, S. *et al.* (2008) 'FLO1 Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast', *Cell*, 135(4), pp. 726–737. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.037.
- Soares, E. V. (2011) 'Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review', *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), pp. 1–18. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x.
- Sobel, J. D. (1992) 'Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis', *Clinical*

- Infectious Diseases*, 14, pp. S148-S153. doi: 10.1093/clinids/14-Supplement_1-S148.
- Sobel, J. D. *et al.* (1993) 'Vaginitis Due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, Clinical Aspects, and Therapy', *Clinical Infectious Diseases*, 16(1), pp. 93–99. doi: 10.1093/clinids/16.1.93.
- Šťovíček, V. *et al.* (2010) 'General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies', *Fungal Genetics and Biology*, 47(12), pp. 1012–1022. doi: 10.1016/j.fgb.2010.08.005.
- Staab, J. F. *et al.* (1999) 'Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1', *Science*, 283(5407), pp. 1538–1538. doi: 10.1126/science.283.5407.1538.
- Stacy, A. *et al.* (2016) 'The biogeography of polymicrobial infection', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 14(2), pp. 93–105. doi: 10.1038/nrmicro.2015.8.
- Stein, P. D., Folkens, A. T. and Hruska, K. A. (1970) 'Saccharomyces fungemia.', *Chest*, 58(2), pp. 173–175. doi: 10.1378/chest.58.2.173.
- Šťovíček, V. *et al.* (2014) 'Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast', *BMC Genomics*, 15(1). doi: 10.1186/1471-2164-15-136.
- Šťovíček, V., Váchová, L. and Palková, Z. (2012) 'Yeast biofilm colony as an orchestrated multicellular organism', *Communicative & Integrative Biology*, 5(2), pp. 203–205. doi: 10.4161/cib.18912.
- Stratford, M. (1992) 'Yeast flocculation: A new perspective', *Advances in Microbial Physiology*, 33, pp. 1–71. doi: 10.1016/s0065-2911(08)60215-5.
- Sudbery, P. E. (2011) 'Growth of *Candida albicans* hyphae', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 9(10), pp. 737–748. doi: 10.1038/nrmicro2636.
- Surawicz, C. M. *et al.* (1989) 'Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: A prospective study', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 96(4), pp. 981–988. doi: 10.1016/0016-5085(89)91613-2.
- Taylor, G. D. *et al.* (1994) 'Trends and sources of nosocomial fungaemia', *Mycoses*, 37(5–6), pp. 187–190. doi: 10.1111/j.1439-0507.1994.tb00298.x.
- Teunissen, A. W. R. H. and Steensma, H. Y. (1995) 'The Dominant Flocculation Genes of *Saccharomyces cerevisiae* Constitute a New Subtelomeric Gene Family', 11, pp. 1001-1013.
- Tsuchimori, N. *et al.* (2000) 'Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells', *Infection and Immunity*, 68(4), pp. 1997–2002. doi: 10.1128/IAI.68.4.1997-2002.2000.
- Turnbaugh, P. J. *et al.* (2007) 'The Human Microbiome Project', *Nature*, 449(7164), pp. 804–810. doi: 10.1038/nature06244.
- Underhill, D. M. and Iliev, I. D. (2014) 'The mycobiota: Interactions between commensal fungi and the host immune system', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 14(6), pp. 405–416. doi: 10.1038/nri3684.
- Váchová, L. *et al.* (2011) 'Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies', *Journal of Cell Biology*, 194(5), pp. 679–687. doi: 10.1083/jcb.201103129.
- Váchová, L. and Palková, Z. (2018) 'How structured yeast multicellular communities live, age and die?', *FEMS Yeast Research*, 18(4). doi: 10.1093/femsyr/foy033.
- Varon, M. and Choder, M. (2000) 'Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies', *Journal of Bacteriology*, 182(13), pp. 3877–3880. doi: 10.1128/JB.182.13.3877-3880.2000.
- Verstrepen, K. J. *et al.* (2003) 'Yeast flocculation: What brewers should know', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(3), pp. 197–205. doi: 10.1007/s00253-002-1200-8.
- Verstrepen, K. J. and Klis, F. M. (2006) 'Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts',

Molecular Microbiology, 60(1), pp. 5–15. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x.

Vopálenská, I. *et al.* (2010) 'Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture', *Environmental Microbiology*, 12(1), pp. 264–277. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02067.x.

Wolcott, R. *et al.* (2013) 'The polymicrobial nature of biofilm infection', *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 19(2), pp. 107–112. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x.

Zara, G. *et al.* (2009) 'FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flour strains of *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology*, 155(12), pp. 3838–3846. doi: 10.1099/mic.0.028738-0.

Zara, S. *et al.* (2005) 'Model for Air-Liquid Interfacial Biofilm Formation by', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), pp. 2934–2939. doi: 10.1128/AEM.71.6.2934.

Zarnowski, R. *et al.* (2014) 'Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia', *mBio*, 5(4), pp. 1–13. doi: 10.1128/mBio.01333-14.