

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Zuzana Sochorová

Sledování tvorby plovoucího biofilmu *Mycobacterium smegmatis*

**-
morfologická a proteomová analýza**

Monitoring of *Mycobacterium smegmatis* floating biofilm development

**-
morphological and proteome analysis**

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jaroslav Weiser, CSc.

Praha, 2012

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, 23. 8. 2012

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jaroslavu Weiserovi, CSc. za odborné vedení, trpělivý přístup a cenné rady při tvorbě této práce. Dále děkuji RNDr. Denise Petráčkové, PhD. za všestrannou pomoc, rady i připomínky a celému kolektivu Laboratoře mikrobiální proteomiky za vytvoření přátelského prostředí a technickou výpomoc. Mé poděkování patří také RNDr. Oldřichu Benadovi, CSc. a jeho kolektivu za vykonání elektronové mikroskopie.

V neposlední řadě velmi děkuji mé rodině a příteli za všestrannou podporu během celého mého studia.

Tato práce vznikla v letech 2010-2012 v Laboratoři mikrobiální proteomiky na MBÚ AV ČR s podporou grantové agentury Akademie věd České Republiky (grant IAA500200913, 2009-2013. Adaptivní změny v proteomech populací k antibiotiku rezistentních bakterií *Escherichia coli* a *Mycobacterium smegmatis* během růstu v kontinuálních kultivačních systémech v přítomnosti subletálních koncentrací těchto antibiotik).

ABSTRAKT

Mikroorganismy se mohou vyskytovat v planktonní formě nebo mohou ulpívat na povrchu a vytvářet trojrozměrné útvary zvané biofilmy. Plovoucí biofilmy, tvořené na rozhraní prostředí voda-vzduch, jsou jednou z životních strategií, kterou se mohou bakterie ubírat. Při studiu tohoto typu biofilmu nám jako laboratorní model sloužil nepatogenní druh *Mycobacterium smegmatis*. Pochopení mechanismů tohoto druhu by mohlo být aplikovatelné i na patogenní zástupce rodu *Mycobacterium*, jejichž studium obnáší v laboratorních podmínkách řadu nevýhod.

Tato diplomová práce se zabývá morfologickou a proteomovou analýzou plovoucího biofilmu *M. smegmatis*. S využitím binokulární lupy a skenovací elektronové mikroskopie bylo pozorováno, že se bakterie na počátku tvorby biofilmu shlukují a vytváří tzv. „nukleační centra“, ze kterých dochází k postupnému rozrůstání biofilmu do okolí. V pozdějších fázích vývoje dochází k jejich postupnému splynutí a vytvoření jedolité vrstvy, která s dalším vývojem sílí a utváří se vícevrstevnatý biofilm.

Stěžejní metodou této práce byla dvourozměrná elektroforéza proteinů. S její pomocí byla provedena proteomová analýza plovoucího biofilmu. Před samotným provedením 2D elektroforézy bylo nutné optimalizovat přípravu proteinových vzorků a měření jejich koncentrace. Stejně jako u morfologické analýzy byla sledována 4 vývojová stádia plovoucího biofilmu v 8., 18., 24. a 30. hodině růstu. Výsledkem bylo určení 22 proteinů, 4 z nich jsou unikátní pro určitou vývojovou fázi, exprese zbylých 18 se v čase signifikantně mění. U 18 měnících se proteinů byly popsány expresní profily v čase a pomocí korelační analýzy byly určeny skupiny proteinů se stejným expresním profilem a tedy se stejnou nebo podobnou regulací jejich exprese. Tyto proteiny budou dále identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie, což nám umožní lepší interpretaci dosažených výsledků.

Klíčová slova:

Mykobakterie, plovoucí biofilm, *Mycobacterium smegmatis*, vývoj biofilmu, morfologie, skenovací elektronová mikroskopie, proteomika, proteiny, skleněné mikrokuličky, 2D elektroforéza.

ABSTRACT

Microorganisms grow in planktonic form, but more often they adhere to a number of surfaces and create three-dimensional structures called biofilms. Floating biofilms, which are formed at the water-air interface, are one of the life strategies, which the bacteria can take. Non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis* was used as a laboratory model for the study of this kind of biofilm. The understanding of mechanisms of their formation of this species may be applicable to the pathogenic species of the genus *Mycobacterium*, study of which in the laboratory brings a number of disadvantages.

This diploma thesis focuses on the morphological and proteome analysis of the *M. smegmatis* floating biofilm. Using a stereo microscope and scanning electron microscopy was observed that bacteria clump and create the „nucleation centres“ at the beginning of the biofilm development. This centers grow to the surroundings and connect afterwards. In the later stages of the development the centers fuse in compact layer, which then grows into the compact and multilayer biofilm.

The key method in this study was two-dimensional electrophoresis of proteins. The proteome analysis of floating biofilm was performed with this method. The preparation of protein samples and the method for protein concentration measurement was optimized. We focused on the study of 4 developmental stages of floating biofilm after 8, 18, 24 and 30 hours of cultivation as in the morphological analysis. As a result of 2D electrophoretic analyses there was determined 22 proteins as important in this process. Four of them were unique for the specific developmental stage and the expression of 18 remaining was changing in time significantly. For 18 changing proteins, their expression profiles were described and grouped into sets characterized by the same expression profile and possibly the same or similar regulation of their expression. The identification of these proteins by mass spectrometry is under way.

Key words:

Mycobacteria, floating biofilm, *Mycobacterium smegmatis*, biofilm development, morphology, scanning electron microscopy, proteomics, proteins, glass microbeads, 2D electrophoresis.

SEZNAM ZKRATEK

1-DE	one-dimensional electrophoresis	jednorozměrná elektroforéza
2-DE	two-dimensional electrophoresis	dvourozměrná elektroforéza
A.U.	arbitrary units	bezrozměrné jednotky intenzity proteinů v programu PDQuest
AG	arabinogalactan	arabinogalaktan
AHL	acyl-homoserine lactone	acyl-homoserin lakton
AIDS	acquired immune deficiency syndrome	syndrom získané imunitní nedostatečnosti
Bap	biofilm associated protein	protein asociovaný s tvorbou biofilmu
BCA	bicinchoninic acid	bicinchoninová kyselina
BCG	Bacillus Calmette-Guérin	Bacillus Calmette-Guérin
bp	base pair	páry bazí
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue	barva Coomassie Brilliant Blue
c-di-GMP	cyclic di-guanosinmonophosphate	cyklický di-guanosinmonofosfát
ddH ₂ O	double deionized water	dvakrát deionizovaná voda
DGC	diguanylate cyclase	diguanylát cykláza
dH ₂ O	deionized water	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EAL	EAL domain (glutamic acid, alanine, leucine)	doména obsahující kyselinu glutamovou, alanin a leucin
e-DNA	extracellular DNA	mimobuněčná DNA
EMB	ethambutol	ethambutol
EPS	extracellular polymeric substance	extracelulární polymerní substance, extracelulární matrix
ETH	ethionamide	ethionamid
FM	free mycolic acid	volné mykolové kyseliny
GC	guanosine, cytosine	guanosin, cytosin
GGDEF	GGDEF domain (glycine, aspartic	doména obsahující 2x glycin,

	acid, glutamic acid, phenylalanine)	kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou a fenylalanin
GTP	guanosinetriphosphate	guanosintrifosfát
HD-GYP	type II c-di-GMP-specific phosphodiesterase	c-di-GMP specifická fosfodiesteráza typu II
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
Hsp	heat-shock protein	protein teplotního šoku
IEF	isoelectric focusing	izoelektrická fokusace
INH	isoniaside	isoniazid
IPG	immobilized pH gradient	zakotvený pH gradient
LAM	lipoarabinomannan	lipoarabinomannan
LM	lipomannan	lipomannan
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>Mycobacterium avium</i> komplex
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MK	mycolic acid	mykolová kyselina
MS	mass spectrometry	hmotnostní spektrometrie
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex
NC	nonculturable	nekultivovatelné
OD	optical density	optická denzita
PBP	penicillin-binding protein	protein vázající penicilin
PDE	phosphodiesterase	fosfodiesteráza
PGL	phenolic glycolipid	fenolický glykolipid
pGpG	5'-phosphoguananylyl-(3'-5')-guanosine	5'-fosfoguananylyl-(3'-5')-guanosin
pI	isoelectric point	izoelektrický bod
PIA	polysaccharide intercellular adhesin	buněčný adhesin polysacharidové povahy
PNAG	poly-N-acetyl-1,6-β-glucosamine	poly-N-acetyl-1,6-β-glukosamin
QS	quorum sensing	„quorum sensing“
RIP	RNAIII-inhibiting peptide	RNAIII-inhibující peptid
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina

SDS-PAGE	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide elektroforéza gel <u>e</u> lectrophoresis	v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SEM	<u>s</u> canning <u>e</u> lectron <u>m</u> icroscopy	skenovací elektronová mikroskopie
Ser	serine	serin
SSP	<u>s</u> ample <u>s</u> pot <u>p</u> rotein	označení spotu na gelu v programu PDQuest
STR	streptomycine	streptomycin
TDM	<u>t</u> rehalose <u>d</u> imycolate	trehalóza dimykolát
Thr	threonine	threonin
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation	Světová zdravotnická organizace

Zkratky použitých chemikálií jsou uvedeny v tabulce v Kap. 3.1.3.

OBSAH

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
2.1. Bakteriální biofilmy	14
2.1.1. Obecná charakteristika biofilmu	14
2.1.2. Vývoj biofilmu	18
2.1.2.1. Regulační mechanismy při vývoji biofilmu	20
2.1.2.1.1. „Quorum sensing“	21
2.1.2.2. Šíření biofilmu	24
2.1.3. Bakteriální biofilmy a povrchy	25
2.2. Mykobakterie	26
2.2.1. Charakteristika mykobakterií	26
2.2.1.1. <i>Mycobacterium smegmatis</i>	29
2.2.2. Buněčný obal mykobakterií	30
2.2.3. Dormance u mykobakterií	32
2.2.4. Sporulace u mykobakterií	33
2.2.5. Růst a buněčné dělení aktinomycet	35
2.2.6. Mykobakterie a biofilmy	37
2.2.7. Proteomika & rod <i>Mycobacterium</i>	40
3. MATERIÁL A METODY	42
3.1. Materiál	42
3.1.1. Biologický materiál	42
3.1.2. Kultivační média	42
3.1.3. Chemikálie	43
3.1.4. Pufry, roztoky a komerční kity	45
3.1.4.1. Pufry, roztoky a komerční kity pro izolaci proteinů	45
3.1.4.2. Ostatní komerční kity	45
3.1.4.3. Pufry a roztoky pro polyakrylamidovou elektroforézu	45
3.1.4.4. Roztoky pro barvení gelů koloidní Coomassie Blue	47
3.1.5. Laboratorní vybavení a přístroje	47
3.2. Metody	49
3.2.1. Metody kultivace	49
3.2.1.1. Submerzní kultivace <i>M. smegmatis</i> a kultivace na pevném médiu	49

3.2.1.2. Kultivace <i>M. smegmatis</i> ve formě plovoucího biofilmu.....	49
3.2.2. Mikroskopie	50
3.2.2.1. Binokulární lupa.....	50
3.2.2.2. Optická mikroskopie	50
3.2.2.3. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	50
3.2.3. Izolace proteinů.....	51
3.2.4. Metody stanovení koncentrace proteinů	53
3.2.4.1. Pierce® BCA Protein Assay Kit	53
3.2.4.2. 2D Quant Kit.....	53
3.2.5. Jednorozměrná elektroforéza (1-DE).....	54
3.2.6. Dvojitá elektroforéza (2-DE)	55
3.2.6.1. Isoelektrická fokusace.....	55
3.2.6.2. SDS polyakrylamidová elektroforéza	56
3.2.7. Digitalizace a počítačová analýza gelů	57
4. VÝSLEDKY	59
4.1. Morfologická analýza plovoucího biofilmu <i>Mycobacterium smegmatis</i>	59
4.1.1. Pozorování tvorby plovoucího biofilmu v čase pod binokulární lupou.....	60
4.1.2. Morfologická analýza pomocí skenovací elektronové mikroskopie.....	62
4.2. Proteomová analýza plovoucího biofilmu <i>Mycobacterium smegmatis</i>	67
4.2.1. Porovnání metod izolace proteinů.....	67
4.2.2. Stanovení koncentrace proteinů před 2D elektroforézou.....	69
4.2.3. Proteomová analýza vývoje plovoucího biofilmu v čase.....	70
4.2.3.1. Kvalitativní analýza	71
4.2.3.2. Kvantitativní analýza	73
5. DISKUZE.....	81
6. SOUHRN.....	88
7. SEZNAM LITERATURY	89

1. ÚVOD

Mycobacterium smegmatis je půdní bakterie patřící do kmene *Actinobacteria*. Jde o nepatogenní, rychle rostoucí bakterii, která je díky svým vlastnostem velmi často využívána v laboratořích jako modelový organismus pro studium mechanismů a vlastností patogenních zástupců rodu (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis* a dalších).

Převážná část bakterií vyskytujících se v životním prostředí vytváří mnohobuněčná uskupení zvaná biofilmy. Mikroorganismy žijící v biofilmu obklopuje extracelulární polymerní substance (EPS, extracellular polymeric substance), kterou bakterie samy produkují. Tato matrix, tvořená převážně polysacharidy, mimo jiné udržuje strukturu biofilmu, hraje roli v adhezi buněk k povrchu či chrání buňky před vlivy okolního prostředí (FLEMMING a WINGENDER 2010). Mykobakterie patří mezi bakterie, které netvoří EPS polysacharidové povahy, nýbrž hlavní složkou mimobuněčné hmoty jimi tvořených biofilmů jsou lipidy buněčných stěn (ZAMBRANO a KOLTER 2005).

Biofilmy se tvoří na nesčetném množství povrchů, významnou roli mohou hrát v patogenезi ortopedických infekcí, jelikož ideálním prostředím pro jejich vznik mohou být například kloubní náhrady, katetry či umělé srdeční chlopně. Ke tvorbě biofilmů může docházet také na rozhraní prostředí voda-vzduch. Takové biofilmy jsou nazývány jako plovoucí.

M. smegmatis patří mezi bakterie, které jsou schopné biofilmy utvářet. V naší laboratoři je tvorba biofilmu *M. smegmatis* intenzivně studována. Byla provedena morfoloická a proteomová analýza biofilmu na povrchu skleněných a zirkoniových kuliček a výsledky byly porovnány s proteomem planktonicky rostoucí kultury (SITAŘOVÁ 2011).

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na morfoloickou a proteomovou analýzu plovoucího biofilmu *M. smegmatis* během vývoje v čase. Cílem práce bylo pomocí světelné a elektronové mikroskopie detailněji prostudovat především rané fáze tvorby biofilmu a za pomoci 2D elektroforézy vytvořit proteinové profily kultur v daných vývojových stádiích. Výsledky práce přispějí k identifikaci pro tento proces významných proteinů, což by mohlo vést k lepšímu pochopení mechanismu vývoje a fyziologie buněk v biofilmu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Bakteriální biofilmy

2.1.1. Obecná charakteristika biofilmu

Mikroorganismy se mohou v přírodě vyskytovat v planktonické formě, řada z nich ale ulpívá na povrchu a vytváří trojrozměrné struktury - biofilmy. Biofilmy bývají často vícedruhové. Shromážděné bakterie jsou zanořené v hydratované extracelulární polymerní substanci (EPS, extracellular polymeric substance), kterou si buňky samy vytvářejí.

Biofilmy se mohou tvořit na živých i neživých površích a mohou být zdrojem řady akutních i chronických infekcí (APARNA a YADAV 2008). Jsou příčinou onemocnění lidí, živočichů i rostlin. S přítomností biofilmu je spojena patogeneze mnoha ortopedických infekcí, ideálním místem pro vznik bakteriální infekce jsou i jiné implantované náhrady jako např. umělé srdeční chlopně, umělé cévy nebo katetry. Bakteriální biofilm se vytváří i na povrchu zubů, kde se označuje jako dentální plak. Biofilmy se vyskytují všude v životním prostředí, především v půdě, dále pak na trupech lodí, říčních kamenech či jako kontaminace rozvodů pitné vody. Jejich tvorba může být i prospěšná - jako v případě *Pseudomonas fluorescens*, která vytváří biofilm na kořenech rostlin a chrání je tak produkcí antibiotik před patogeny (HARRISON *et al.* 2005). Vrstva biofilmu je mnohdy natolik silná, že je vidět pouhým okem. Proto se biofilmy řadily mezi první zkoumané předměty rozvíjející se mikrobiologie. Anton Van Leeuwenhoek za použití svého mikroskopu jako první pozoroval mikroorganismy dentálního plaku (APARNA a YADAV 2008). V posledních letech dochází k rozvoji metod vedoucích k lepšímu pochopení molekulárních mechanismů a architektury biofilmů. Mikroskopické techniky, a to hlavně skenovací elektronové mikroskopie (SEM), jsou v dnešním výzkumu běžné.

Povrch biofilmu je různorodý, mění se z hladkého na drsný či nerovnoměrný a je ovlivňován několika faktory. Jedním z faktorů je dostupnost živin (NADELL *et al.* 2009). Buňky na okraji biofilmu mají snazší přístup k živinám, díky čemuž rostou rychleji. Na difúzi živin a rychlosti jejich zpracování je závislá také tloušťka biofilmu.

Když je živin dostatečné množství, proniknou hlouběji a biofilm je pak silnější (NADELL *et al.* 2009).

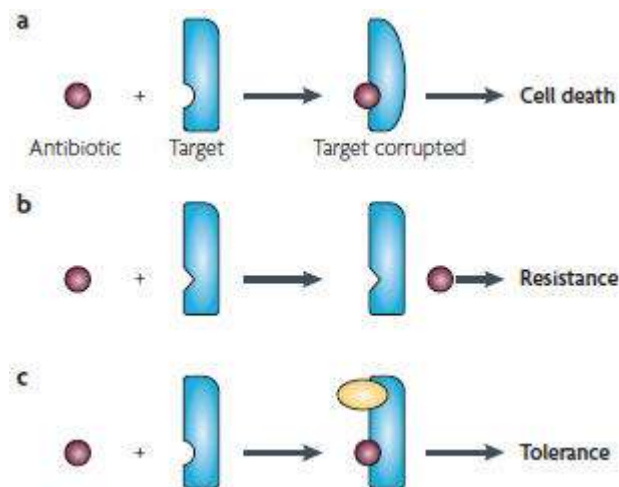
Buňky v biofilmu spolu navzájem komunikují. Bakterie vnímá hustotu buněk díky speciálnímu signálnímu systému zvanému „quorum sensing“ (QS), při kterém dochází k sekreci a detekci malých difúzních molekul označovaných jako signální molekuly nebo autoinduktory (CAMILLI a BASSLER 2006). Díky této signalizaci může bakterie sledovat změny v hustotě populace nebo změny životních podmínek v okolním prostředí a díky tomu regulovat genovou expresi a přizpůsobit ji potřebám biofilmu. Tématika QS je podrobněji probrána níže (viz Kap. 2.1.2.1.1.).

Většina biofilmů je tvořena z méně než 10 % mikroorganismy, zatímco extracelulární matrix (EPS) představuje přes 90 % biofilmu (FLEMMING a WINGENDER 2010). EPS udržuje strukturu biofilmu a ovlivňuje aktuální podmínky v biofilmu. Hraje také roli při adhezi buněk k povrchu, zajišťuje soudržnost buněk mezi sebou a chrání buňky před vlivy prostředí (FLEMMING a WINGENDER 2010). Matrix je tvořena biopolymery, obsahuje mnoho polysacharidů, proteinů či glykoproteinů, glykolipidů a extracelulární DNA (e-DNA). Biopolymery EPS jsou vysoce hydratované a vytváří hmotu, která drží buňky biofilmu pohromadě a zadržuje vodu. Prostřednictvím matrix komunikují buňky biofilmu s okolím a získávají živiny. Tvorba EPS je ovlivněna řadou faktorů - druhem bakterie, fází jejich růstu, dostupností živin či podmínkami prostředí. Hlavní složkou EPS jsou polysacharidy (FLEMMING a WINGENDER 2010). Většina z nich jsou heteropolysacharidy skládající se z neutrálních a nabitých cukerných zbytků. Jeden z nejlépe prostudovaných modelů tvorby biofilmu byl popsán u *Pseudomonas aeruginosa* (RYDER *et al.* 2007). Ve své extracelulární matrix obsahuje nejméně tři exopolysacharidy - alginát, Pel a Psl. Alginát je tvořen zbytky uronové kyseliny a jeho produkce je charakteristická pro mukoidní kmeny, často izolované z plic pacientů s cystickou fibrózou. Podílí se na vzniku mikrokolonií během počátku vývoje biofilmu a zodpovídá za mechanickou stabilitu biofilmu (FLEMMING a WINGENDER 2010). Polysacharidy Pel a Psl jsou zastoupeny převážně v EPS nemukoidních kmenů. Pel je polysacharid bohatý na glukózu a je esenciální při tvorbě biofilmu na rozhraní vzduch-kapalina, Psl je opakující se pentasacharid bohatý na manózu podílející se na adhezi k povrchům a udržení struktury biofilmu. Matrix u rodu *Staphylococcus* obsahuje mimo jiné intercelulární adhesin PIA (polysacharide intercellular adhesin), kódovaný *ica* lokusem a napomáhající adhezi buněk k povrchu (GOTZ 2002). Další složkou EPS jsou extracelulární proteiny. Mezi ně se řadí

strukturální proteiny a enzymy. Jako příklad strukturálních proteinů lze uvést lektiny LecA a LecB *Ps. aeruginosa* (TIELKER *et al.* 2005, DIGGLE *et al.* 2006), Bap proteiny *Staphylococcus aureus* (LASA a PENADES 2006) a jim podobné proteiny u ostatních druhů bakterií nebo amyloidy podílející se na adhezi k neživým povrchům a hostitelským buňkám a fungující jako cytotoxiny (OTZEN a NIELSEN 2008). Další proteinové struktury důležité pro utváření biofilmu jsou pili, fimbrie nebo bičíky (FLEMMING a WINGENDER 2010). V posledních letech se pozornost obrací také k nukleovým kyselinám v EPS. Allesen-Holm *et al.* zjistili, že e-DNA *Ps. aeruginosa* je podobná DNA genomové (ALLESEN-HOLM *et al.* 2006). Má se za to, že e-DNA přítomná v matrix je genomovou DNA, která je uvolňována lyzí z buněk v biofilmu. Nicméně lyzované buňky nejsou jediným zdrojem e-DNA a nemůže být vyloučena ani aktivní exkrece DNA. e-DNA má v biofilmu stabilizující roli, zdá se, že funguje také jako mezibuněčná spojka. Její uvolnění je řízeno QS a regulováno železem (YANG *et al.* 2007).

Život v biofilmu poskytuje mikroorganismům mnoho výhod. Tou nejdůležitější je zvýšená rezistence k antimikrobiálním látkám. Zásadou rezistence a dalších obranných mechanismů je obtížné chorobu způsobenou biofilmy vyléčit nebo biofilm zcela odstranit. Jestliže bakterie nemá rezistenci k antibiotikům geneticky podloženou, může svou vnímavost snížit tím, že vytvoří biofilm (STEWART a COSTERTON 2001). Stewart a Costerton ve své práci naznačují, že bakterie v biofilmu nezískají rezistenci mutací nebo mobilními genetickými elementy, protože když se buňka odtrhne od biofilmu, rezistenci rychle ztrácí (STEWART a COSTERTON 2001). Podobnou myšlenku vyjádřili také Levin a Rozen (LEVIN a ROZEN 2006), kteří se domnívali, že bakterie se brání antibiotiku tím, že změní svůj fenotyp jako odpověď na podmínky prostředí, a tato změna ovlivňuje jejich citlivost k antibiotikům. Mechanismů, kterými se bakterie vzdoruje působení antibiotik, je několik. Jedním z nich je omezené pronikání antimikrobiálních látek do biofilmu díky EPS (LEWIS 2001). Extrapolymerní matrix je negativně nabitá, váže často pozitivně nabitá antibiotika a zpomaluje tak difúzi těchto látek. Díky ní je biofilm rezistentní k velkým molekulám, jako je lysozym nebo molekuly komplementu. Dalším mechanismem rezistence je pomalý růst bakterií (LEWIS 2001). Bakterie na povrchu biofilmu mají lepší přístup k živinám a kyslíku oproti bakteriím ve středu biofilmu, které tak rostou pomaleji. Jelikož antibiotika jsou všeobecně účinnější při působení na rychle rostoucí buňky (např. penicilin, ampicilin), jsou tak bakterie ve středu biofilmu ve výhodě a stávají se k nim rezistentními

(HARRISON *et al.* 2005). Mezi další mechanismy rezistence patří fyziologická a genetická různorodost buněk v biofilmu. Jelikož se v biofilmu vytváří gradient živin, odpadních látek a signálních faktorů, každá buňka biofilmu roste jinou rychlostí. V závislosti na těchto gradientech bakterie mění svou fyziologickou aktivitu a reaguje tím na působení antibiotika či jiného stresového faktoru. Bakterie zapínají geny reagující na stres a mění tak svůj fenotyp na více tolerantní (FUX *et al.* 2005). U bakteriálních biofilmů je možno pozorovat jev nazývaný bakteriální perzistence. Perzistentní buňky jsou k antibiotiku tolerantní, jejich schopnost přežití tedy nesouvisí s expresí nebo použitím mechanismu rezistence (LEWIS 2007). Princip tolerance spočívá v inhibici cílového místa antibiotika navázáním jiné molekuly, antibiotikum tak nepůsobí na metabolismus buňky a ta je pak tolerantní (viz Obr. 1). Antibiotikum se do cílového místa může navázat, ale funkci buňky neovlivní. Perzistentní buňky mají zpomalený metabolismus a nedělí se (LEWIS 2007). Po snížení koncentrace antibiotika v prostředí nebo po jeho odstranění se z perzistentních buněk vytvoří nová populace biofilmu. Tento mechanismus se jeví jako jedna z hlavních příčin vzniku chronických infekcí a jejich návratů po antibiotické léčbě.



OBR. 1 - Rezistence versus tolerance k antibiotikům (LEWIS 2007). a) Antibiotikum (fialová kulička) se váže do cílového místa a způsobuje smrt buňky. b) Cílové místo je pozměněno, antibiotikum se tak nenaváže a buňka se stává rezistentní. c) Jiná molekula (žlutý ovál) svým navázáním na buňku inhibuje cílové místo, navázání antibiotika tak buňku neovlivní a ta se stává tolerantní k jeho působení.

Biofilm je ideálním prostředím pro horizontální přenos genů (NGUYEN *et al.* 2010). Buňky jsou v těsném kontaktu a působí zde minimální střižné síly, které by mohly poškodit přenášenou DNA. Plasmidy jsou často nositeli genů rezistence a toto je ideální cesta k jejich šíření. V důsledku toho tak dochází ke zvyšování virulence mikroorganismů. Lze spekulovat i o tom, že DNA a jiné molekuly přechází v biofilmu z buňky do buňky také prostřednictvím nano-kanálků vytvářených mezi nimi. Tento způsob komunikace byl prokázán vnitrodruhově mezi buňkami *Bacillus subtilis*, mezidruhově či dokonce mezi Gram-pozitivními a Gram-negativními bakteriemi (DUBEY a BEN-YEHUDA 2011). Autoři prokázali, že tímto způsobem může docházet k přenosu genů pro rezistenci k antibiotikům.

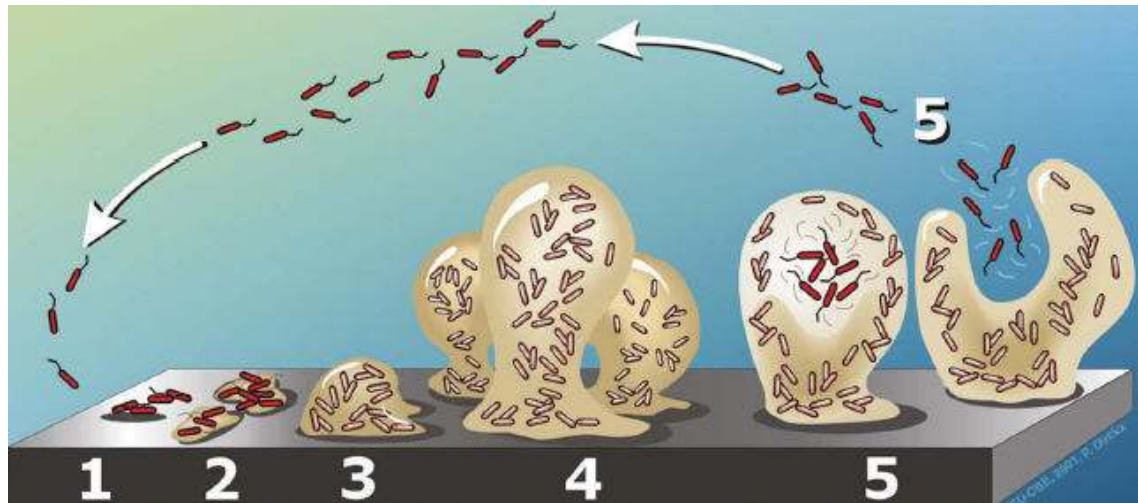
2.1.2. Vývoj biofilmu

Vytváření biofilmu lze přirovnat k vývoji mnohobuněčného organismu (HARRISON *et al.* 2005). Jde o velmi dobře regulovaný systém, kdy se jednobuněčné organismy seskupují a vytváří mnohobuněčný útvar. Bližší studium tohoto procesu je jedním z předmětů výzkumu dnešních mikrobiologů zabývajících se mikrobiálními biofilmy. Lemon *et al.* publikovali obecný model vývoje biofilmu (LEMON *et al.* 2008). Když planktonní bakterie dosáhne povrchu, dojde nejprve k vytvoření slabých reverzibilních vazeb. Pokud nastanou příznivé fyzikálně-chemické podmínky, reverzibilní vazba se změní na irreverzibilní, dochází k produkci extracelulárních polymerů a adhesinů. Buňky interagují navzájem mezi sebou i s povrchem a vytváří se jednovrstevný biofilm. Bakterie dále rostou a dělí se, komunikují spolu chemickými signály a v důsledku toho vznikají mikrokolonie a tvoří se vícevrstevnatý biofilm. Dochází k produkci EPS, biofilm maturuje (zraje) a vyvíjí je trojrozměrná struktura. Pokud dojde k odeznění biofilm-stimulujících podmínek, buňky se mohou uvolnit a v planktonním stavu se opět šířit dál do okolí. Signální molekuly uvolňované z biofilmu mohou sloužit jako atraktant pro nalákání jiných druhů bakterií (HARRISON *et al.* 2005).

Způsob kolonizace povrchu se liší u pohyblivých a nepohyblivých druhů bakterií. Pro pohyblivé druhy (např. *E. coli*) jsou pro prvotní vazbu důležité přívěsky jako jsou bičíky, fimbrie nebo pili. Po vazbě k povrchu buňky ztrácí svou pohyblivost a začínají produkovat extracelulární matrix, díky které drží pohromadě (LEMON *et al.*

2008). U nepohyblivých druhů (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*) probíhá prvotní vazba převážně prostřednictvím adhesinů, jejichž exprese bakterie za příznivých podmínek zvýší. Tím se zlepší jak koheze buněk mezi sebou, tak adheze k povrchu. U rodu *Staphylococcus* jsou to převážně povrchové proteiny Bap (LASA a PENADES 2006). Hlavní roli v utváření biofilmu patogenní bakterie *Streptococcus mutans* hraje patrně glukan (LYNCH *et al.* 2007). Tento patogen syntetizuje několik proteinů vázajících glukany (GbpA, GbpC, GbpD). Díky těmto proteinům bakterie lépe shlukuje a vytváří biofilm, vliv mají také na výslednou strukturu biofilmu.

Po prvním kontaktu bakterie s povrchem se spustí regulace mnoha genů. Prigent-Combaret *et al.* uvedli, že u *E. coli* dochází v biofilmu k rozdílné regulaci 38 % genů oproti planktonicky rostoucím buňkám (PRIGENT-COMBARET *et al.* 1999). Buňky v biofilmu mají zvýšenou hladinu metabolismu, zbavují se rychleji zplodin a škodlivých látek, produkují vyšší koncentrace toxinů a dokážou se vyhýbat imunitní obraně hostitele (APARNA a YADAV 2008). Přisedlé bakterie v hostiteli uvolňují antigeny a stimulují produkci protilátek, před nimiž jsou ale buňky v biofilmu chráněné extracelulární matrix.



OBR. 2 - Vývoj biofilmu (VAN HOUDT a MICHIELS 2005).

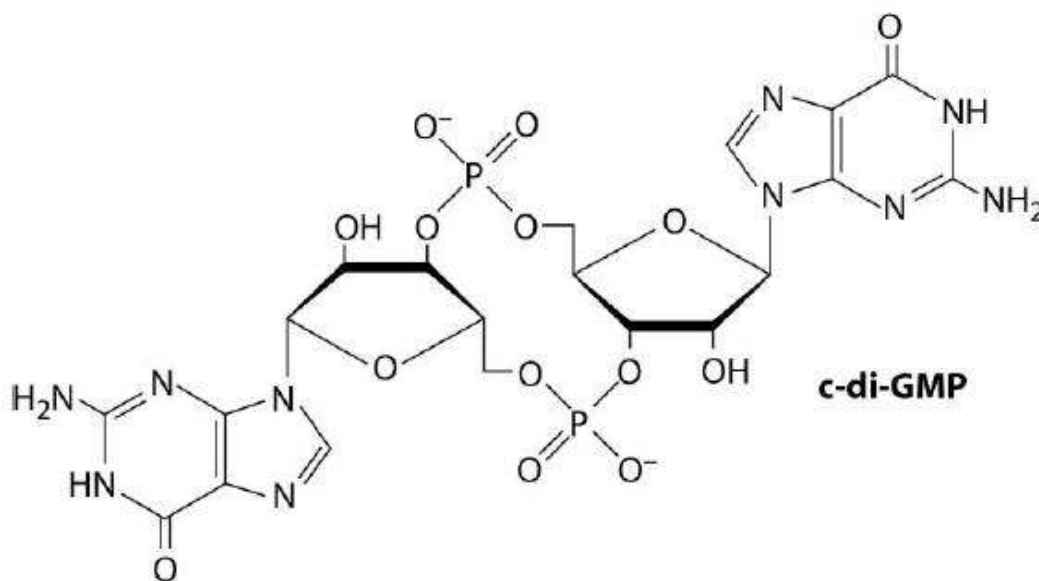
2.1.2.1. Regulační mechanismy při vývoji biofilmu

Jelikož vytvoření biofilmu je považováno za obranný mechanismus bakterií před vnějšími vlivy prostředí, je logické, že metabolické dráhy podílející se na vývoji biofilmu budou řízeny také zvnějšku. Tyto signály mohou být různého původu. Signální molekuly mohou být produkovány a sekretovány přímo bakteriemi vznikajícího biofilmu, v takovém případě se označují jako autoinduktory a signalizační proces jako „quorum sensing“ (QS). Kromě autoinduktorů se jako signální molekuly uplatňují i sekundární metabolity, ať už antibiotika, pigmenty nebo siderofory (LOPEZ *et al.* 2010). Bagge *et al.* publikovali, že subinhibiční koncentrace antibiotika imipenemu indukuje expresi alginátu u biofilmů tvořených *Ps. aeruginosa* (BAGGE *et al.* 2004). Takto ošetřené biofilmy byly silnější a pokrývaly větší plochu substrátu. Dalším faktorem ovlivňujícím tvorbu biofilmu jsou bezesporu živiny. Například bakterie *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vytváří vícevrstevnatý biofilm v důsledku limitace živin. Sigma faktor stacionární fáze, RpoS, se podílí na aktivaci řady genů vývoje biofilmu (GERSTEL a ROMLING 2003). Opačně je tomu u *Vibrio cholerae*, u níž dochází k vývoji biofilmu v prostředí bohatém na živiny, RpoS se tak podílí na represí genů účastnících se při vývoji biofilmu (YILDIZ *et al.* 2004). Spouštěcím faktorem tvorby biofilmu je tedy na živiny bohaté prostředí. Mezi další signály, které ovlivňují prvotní vazbu bakterií k povrchu, patří pH prostředí, teplota, koncentrace kyslíku, osmolarita nebo koncentrace železa (APARNA a YADAV 2008).

Mezi hlavní regulátory tvorby biofilmu patří 3',5'-cyklický diguanosin monofosfát (c-di-GMP, viz Obr. 3). Tato signální molekula hraje mimo jiné jednu z hlavních rolí při rozhodování buňky mezi pohyblivou planktonní a přisedlou formou života bakterie a také při regulaci virulence (COTTER a STIBITZ 2007, HENGGE 2009). c-di-GMP stimuluje biosyntézu adhesinů a EPS v biofilmech. Je syntetizován ze dvou molekul GTP pomocí enzymu diguanylát cyklázy (DGC) a degradován fosfodiesterázou (PDE) na dinukleotid 5'-fosfoguanylyl-(3',5')-guanosin (pGpG), který je dále štěpen na dvě molekuly GMP.

Aktivita DGC je spojena s GGDEF doménou, která je součástí aktivního místa enzymu, PDE je enzymaticky aktivní díky doméně EAL a HD-GYP (RYAN *et al.* 2006). Nadprodukce proteinů s GGDEF doménou silně stimuluje syntézu adhesinů a složek EPS, zatímco nadprodukce proteinů s EAL doménou vykazuje opačný jev. Tento systém regulace lze považovat za čtyř-složkový. Dva enzymy v závislosti na signálu

tvoří nebo degradují c-di-GMP. Specifické efektory (proteiny, RNAs) vážou c-di-GMP a následně přímo ovlivňují cílovou molekulu či strukturu. Tou může být promotor DNA (efektor je pak transkripční faktor), enzym nebo jiná buněčná struktura (bičík, aparát syntézy EPS či sekrece) (HENGGE 2009). Mezi signály ovlivňující tvorbu c-di-GMP patří např. světlo, hladovění, množství kyslíku, antibiotika, polyaminy nebo intercelulární signální molekula (RYAN *et al.* 2006, HENGGE 2009).



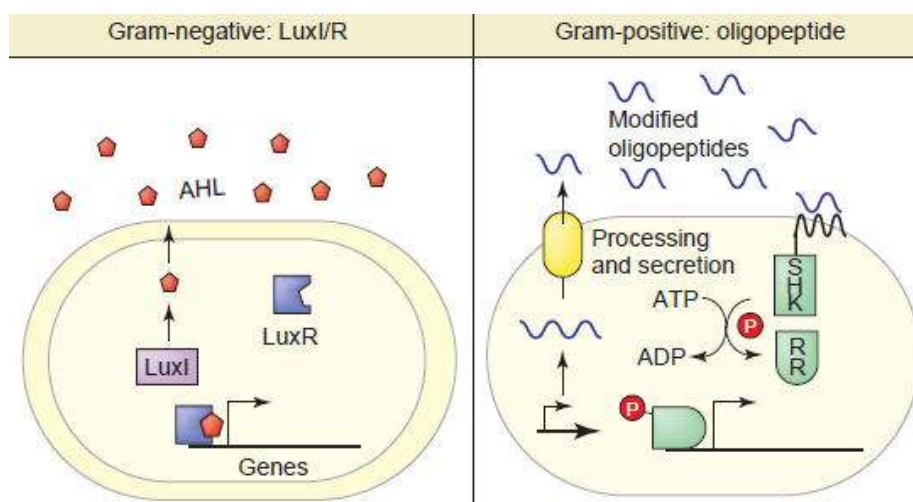
OBR. 3 - *Strukturní vzorec c-di-GMP (KARATAN a WATNICK 2009).*

2.1.2.1.1. „Quorum sensing“

Jak již bylo řečeno, bakterie vnímá hustotu buněk díky signálnímu systému zvanému QS. Pod kontrolou tohoto systému je mnoho procesů jako např. bioluminiscence, exprese virulenčních faktorů, produkce antibiotik, sporulace nebo právě vývoj biofilmu (CAMILLI a BASSLER 2006). Signální molekuly jsou produkovány, sekretovány a detekovány samotnými bakteriemi, proto se nazývají autoinduktory. Dochází k jejich extracelulární akumulaci a při dosažení prahové hodnoty (quorum) dojde ke spuštění signalizační kaskády, která vede ke změně genové exprese.

„Quorum sensing“ u Gram-negativních bakterií (Obr. 4 - vlevo) funguje na principu homologních proteinů LuxI/LuxR *Vibrium fischeri* (FUQUA *et al.* 2001). Signálními molekulami jsou acyl-homoserin laktony (AHLs). AHLs jsou syntetizovány

pomocí syntetáz typu LuxI a transportovány ven z buňky. Většina AHLs prochází volně přes membránu. V cytoplazmě jsou pak rozpoznávány proteiny typu LuxR. LuxR-AHL komplex se váže na DNA promotor a dochází k aktivaci příslušných genů (FUQUA *et al.* 2001). U Gram-pozitivních bakterií (Obr. 4 - vpravo) jsou signální molekulami sekretované peptidy (STURME *et al.* 2002). Tyto peptidy mají délku od 5 do 17 aminokyselin, jsou syntetizovány jako prekurzorové peptidy a exportovány ven z buňky pomocí ABC přenašečů (STURME *et al.* 2002, CAMILLI a BASSLER 2006). Během tohoto procesu jsou prekurzory post-translačně modifikovány. Když jejich koncentrace dosáhne prahové hodnoty, dojde k navázání na receptorovou kinázu a spuštění fosforylační kaskády. Na rozdíl od AHLs tedy nevstupují do buňky. Dráha končí fosforylací transkripčního regulátoru a aktivací strukturálních genů pro autoinduktory, genů regulačního systému či genů pro ABC přenašeče (STURME *et al.* 2002).

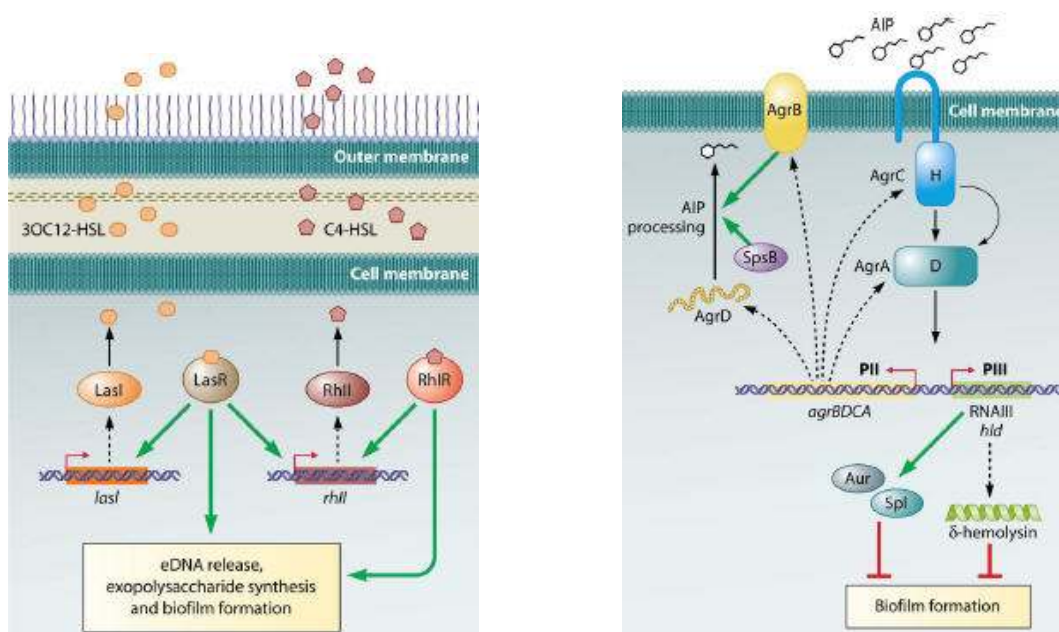


OBR. 4 - Znárodnění systému QS u Gram-negativních (vlevo) a Gram-pozitivních bakterií (vpravo) (HENKE a BASSLER 2004).

Jako příklad QS Gram-negativních bakterií tvořících biofilm lze uvést bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Tato bakterie má dva typy LuxI/R systémů - LasI/R a RhlI/R, každý z nich má svůj typ AHLs (viz Obr. 5). LasR váže molekulu autoinduktoru a aktivuje geny syntetáz LasI a RhlI a geny zahrnuté v produkci extracelulární matrix, uvolnění e-DNA a geny vývoje biofilmu (KARATAN a

WATNICK 2009). *Rhl* geny mají vliv na produkci rhamnolipidů a ovlivňují tak architekturu biofilmu.

Mezi Gram-pozitivní bakterie vytvářející biofilm patří např. *Staphylococcus aureus*. U této bakterie je signální molekulou peptid AIP jako produkt genu *agrD* (KARATAN a WATNICK 2009). AIP je sekretován do extracelulárního prostoru a detekován kinázou AgrC (viz Obr. 5). Transkripčním regulátorem je pak AgrA, který pozitivně reguluje transkripci genů pro extracelulární proteázy uplatňující se v procesu šíření biofilmu. QS tak vývoj biofilmu reguluje negativně (BOLES a HORSWILL 2008).



OBR. 5 - Systém QS u *Pseudomonas aeruginosa* (vlevo) a *Staphylococcus aureus* (vpravo) (KARATAN a WATNICK 2009).

Již výše bylo zmíněno, že v biofilmu dochází ke tvorbě gradientu signálních faktorů. Buňky zanořené ve vnitřní části biofilmu vykazují sníženou metabolickou aktivitu, což ovlivňuje množství potřebných substrátů pro tvorbu signálních molekul. Lze tedy říci, že úroveň syntézy AHLs, a tím pádem intenzita signalizace, se liší uvnitř biofilmu a na jeho okrajích (PARSEK a GREENBERG 2005). Na gradient signálů má také vliv architektura biofilmu. Pokud mluvíme o biofilmech vytvářených na rozhraní pevná látka-kapalina, má na intenzitu signalizace vliv i rychlost průtoku kapaliny. Na intenzitu signalizace u biofilmů tvořených na rozhraní kapalina-vzduch či pevná

látka-vzduch mají pravděpodobně vliv odlišné charakteristiky (PARSEK a GREENBERG 2005).

2.1.2.2. Šíření biofilmu

Důležitou částí vývoje a života biofilmu je oddělení buněk z biofilmu a jejich následné šíření do nových míst. Tím jak biofilm roste, buňky uvnitř biofilmu nemají dostatek živin a dochází zde k akumulaci toxických produktů. Pokud tedy dojde ke změně optimálních podmínek prostředí, bakterie se vrátí k planktonickému růstu a může biofilm vytvořit jinde. Mechanismus oddělení buněk z biofilmu může být trojího typu (HALL-STOODLEY *et al.* 2004, KARATAN a WATNICK 2009):

- 1) aktivní proces, kdy se planktonické buňky šíří dál do okolí (návrat pohyblivosti syntézou bičíků)
- 2) pasivní proces, kdy k odloučení buněk dochází následkem změn hydrodynamických parametrů (zvýšení proudění kapaliny)
- 3) chemický proces, kdy dochází k enzymatické degradaci proteinů extracelulární matrix, povrchových proteinů či k produkci detergentních látek

Chování bakterií je často ovlivňováno množstvím živin a jinak tomu není ani u biofilmů. Jak snížení, tak zvýšení koncentrace živin v prostředí může vést šíření buněk z biofilmu (KARATAN a WATNICK 2009). Se vzrůstající tloušťkou biofilmu se snižuje účinnost průniku kyslíku do vnitřních částí. Bakterie v těchto částech tak musí využívat anaerobní metabolismus. Jak nedostatek kyslíku, tak i vedlejší produkty anaerobního metabolismu zapříčiňují oddělování buněk z biofilmu. Jak již bylo zmíněno výše, molekulou, která reguluje přechod mezi planktonickým růstem a růstem v biofilmu, je c-di-GMP. V případě, že dochází ke stimulaci fosfodiesterázové aktivity, dochází tak i k indukci oddělování buněk z biofilmu. Jako příklad enzymatické degradace EPS lze uvést produkci alginát lyázy, která rozkládá exopolysacharid alginát, vyskytující se v EPS biofilmů mukoidních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (BOYD a CHAKRABARTY 1994). Boyd *et al.* publikovali, že zvýšená exprese alginát lyázy urychluje oddělování bakterií z biofilmu. Přestože je šíření biofilmu jedna z nejméně prozkoumaných oblastí jeho vývoje, lze říci, že stejně jako u prvotních fází tvorby biofilmu, jde o vysoce regulovaný proces zahrnující řadu signálních drah.

2.1.3. Bakteriální biofilmy a povrchy

Všechny přirozeně se vyskytující bakterie jsou schopny produkovat adhesiny, které jim pomáhají rozpoznat a navázat se na široké spektrum povrchů, od tkání nebo buněk přes materiály jako je plast, sklo či nerezavějící ocel. Adhesiny slouží jako prostředek k vazbě na specifický povrch a hlavně udržení se na něm. Uchycení patogenních bakterií na povrchu hostitele je důležitým krokem v patogenezi skoro všech infekcí. Bakteriální adheze je rozhodujícím prvkem ve vývoji biofilmu. Mnoho ortopedických či jiných chirurgických infekcí je spojeno právě s biofilmy. Často se tyto infekce stanou chronickými, a to právě proto, že přisedlé bakterie jsou více odolné k antibiotikům, imunitnímu systému či hydrodynamickým silám. Až 78% infekcí spojených s implantáty je způsobeno stafylokoky, především *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* (CAMPOCCIA *et al.* 2006).

Na základě znalosti procesu vzniku biofilmu by možné strategie pro omezení jeho tvorby měly být založeny na (FRANCOLINI a DONELLI 2010):

- 1) inhibici adheze,
- 2) inhibici signalizace regulující vývoj biofilmu (QS),
- 3) rozkladu složek matrix biofilmu.

Mikrobiální adheze závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech povrchu, jeho hydrofilnosti a náboji. Jednou z možností inhibice adheze je pokrytí povrchu hydrofilními polymery či antimikrobiálními látkami (FRANCOLINI a DONELLI 2010). Mezi hydrofilní polymery lze zařadit např. kyselinu hyaluronovou či polyethylenglykol, použít je možné také proteinové obaly jako např. heparin nebo albumin. Pokrytí materiálu polymerem s antibiotikem je účinné hlavně pro jeho pomalé uvolňování.

Pro inhibici QS u Gram-negativních bakterií lze využít tři cíle - a) místo syntézy signální molekuly, b) samotnou signální molekulu, anebo c) receptor signálu. Inhibitory QS představují nejperspektivnější strategii pro odstranění infekcí spojených s biofilmy (FRANCOLINI a DONELLI 2010), a to hlavně za použití analogů signálních molekul, které by blokovaly vazebné místo na receptoru. U Gram-pozitivních bakterií je efektivním QS inhibítorem RNAIII-inhibující peptid (RIP) (FRANCOLINI a DONELLI 2010), využitelný hlavně u stafylokokových infekcí.

Matrix biofilmu slouží bakteriím jako velmi účinná ochranná bariéra. Proto je narušení její celistvosti další z možností omezení tvorby biofilmu. Donelli *et al.*

dokázali, že β -N-acetylglukosaminidáza dispersin B brání vývoji biofilmu u *Staphylococcus epidermidis* (DONELLI *et al.* 2007). Dispersin B působí svou hydrolytickou aktivitou na rostoucí řetězce poly-N-acetyl-1,6- β -glukosaminu (PNAG), který je složkou EPS u stafylokoků a hraje klíčovou roli při vývoji biofilmu a intercelulární adhezi.

2.2. Mykobakterie

2.2.1. Charakteristika mykobakterií

Rod *Mycobacterium* (mykobakterie) se řadí do kmene Actinobacteria. Tyto mikroorganismy jsou tedy taxonomicky příbuzné se streptomycetami, korynebakteriemi, nokardiemi či rhodokoky. Mykobakterie jsou aerobní, poměrně pleiomorfní, jejich tvar je různý, od koků až po tyčinky (0,3-0,5 μm v průměru), mohou tvořit větvené či filamentózní struktury. Právě mycelium však nevytváří. Genom mykobakterií obsahuje vysoký podíl guaninu a cytosinu (65-71%) a jeho velikost se pohybuje v rozmezí od 3 268 203 párů bazí (bp) u *M. leprae* do 6 988 209 bp u *M. smegmatis* (COOK *et al.* 2009). Typickou vlastností pro mykobakterie je acidorezistence, tedy obtížná barvitelnost organickými barvivy a následná odolnost k odbarvení kyselinami. Díky tomu jsou špatně barvitelné podle Grama. Acidorezistence je způsobena přítomností charakteristických lipidů zvaných mykolové kyseliny, které dělají povrch mykobakterií hydrofobním. Mykobakterie jsou pak více odolné k dehydrataci a více rezistentní k antibiotikům a jiným chemoterapeutickým látkám. Pro specifické obarvení mykobakterií se používá například barvení podle Ziehl-Neelsena, které je založeno na principu obarvení bakterie zahřátým barvivem (karbolfuchsinem). Acidorezistentní bakterie se pak jeví jako červené až růžové. Když už bychom měli mykobakterie charakterizovat podle Grama, jsou považovány za Gram-pozitivní bakterie.

Obecně se mykobakterie dělí podle rychlosti růstu na dvě skupiny, pomalu rostoucí a rychle rostoucí. Mezi pomalu rostoucí se řadí například *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis* nebo *M. leprae*. Generační doba u *M. tuberculosis* je mezi 20 a 30

hodinami, u *M. leprae* je to až 20 dní. Mezi rychle rostoucí lze zařadit *M. smegmatis*, *M. fortuitum* nebo *M. chelonae*, jejichž generační doba se pohybuje v rámci hodin.

Mnoho mykobakterií je schopno produkovat žluté karotenoidní pigmenty. Podle pigmentace se mykobakterie rozdělují do tří skupin:

- nepigmentované (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) - pigmenty netvoří
- fotochromogenní (*M. kansasii*, *M. marinum*) - pigmenty tvoří pouze na světle
- skotochromogenní (*M. gordonae*) - pigmenty tvoří i ve tmě

Indukce tvorby pigmentů na světle vyžaduje krátké vlnové délky (400-500 nm) a přítomnost O₂. Zdá se, že karotenoidní pigmenty chrání bakterie před oxidativním stresem a inhibice jejich tvorby by mohla skýtat jeden z dalších možných cílů antimikrobiální léčby (LIU *et al.* 2005).

Z hlediska živin nejsou mykobakterie náročné. Pro růst jim stačí jednoduché minerální soli, amoniak jako zdroj dusíku, glycerol nebo acetát jako zdroj uhlíku a kyslík jako donor elektronů. Růst *M. tuberculosis* se často podporuje přidáním vaječného žloutku jako zdroje lipidů. Lowenstein-Jensenovo médium, obsahující právě vaječnou složku, se používá pro izolaci *M. tuberculosis* z patogenních materiálů.

Rod *Mycobacterium* zahrnuje druhy obligátně i podmíněně patogenní. Řada mykobakterií je ale neškodná. Žijí převážně ve vodě a v půdě, kde rozkládají organickou hmotu a tvoří tak významnou složku přírodních biotopů. Z medicínského hlediska lze mykobakterie rozdělit do čtyř skupin:

- *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) - mykobakterie způsobující tuberkulózu u lidí či zvířat (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microtii*, *M. africanum*, *M. canetti*)
- *M. leprae* - mykobakterie způsobující lepru (malomocenství, Hansenova nemoc)
- *Mycobacterium avium* complex (MAC) - skupina mykobakterií zahrnující *M. avium* a *M. intracellulare*
- netuberkulózní mykobakterie - běžně se vyskytují v prostředí, většinou nepatogenní, některé druhy jsou podmíněně patogenní (*M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* a další)

M. tuberculosis je původcem lidské tuberkulózy. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) je v současné době tuberkulózou nakažena 1/3 světové

populace. Ze statistik roku 2009 vyplývá, že prevalence byla 12-16 milionů případů, roční incidence, tedy počet nových onemocnění, byla 9,4 milionů případů a zemřelo asi 1,3 milionu HIV-negativních nemocných. V České republice byla v r. 2009 incidence 8,8 případů na 100 tisíc obyvatel. Nejvíce problematické je toto onemocnění u imunosuprimovaných pacientů s AIDS. Infekční agens vstupuje aerogenní cestou do dýchacího ústrojí, kde vznikají primární ložiska (BEDNÁŘ *et al.* 1996). Ta se pak mohou buď vyhojit, nebo přecházejí do klidového stádia (tzv. latentní tuberkulóza), v němž mohou mykobakterie perzistovat až několik desítek let. Jen asi u 10 % jedinců se toto klidové stádium vyvíjí v tzv. postprimární tuberkulózu, která je důsledkem reaktivace infekce (BEDNÁŘ *et al.* 1996). Důležitým prvkem v patogenním účinku *M. tuberculosis* je toxický glykolipid označovaný jako „cord-faktor“. V podstatě se jedná o disacharid trehalózu, která je esterifikovaná dvěma mykolovými kyselinami (SPARGO *et al.* 1991). Tento faktor brání fúzi fosfolipidových váčků (fagozomu a lysozomu) a mykobakterie je tak schopna přežít ve fagozomu hostitele (SPARGO *et al.* 1991). Faktor ovlivňuje také membránu mitochondrií, čímž inhibuje respiraci a fosforylaci, je i významným imunomodulátorem (BEDNÁŘ *et al.* 1996).

V současné době se v řadě zemí využívá pro kontrolu tuberkulózy očkování bacilem Calmette-Guérin (BCG), což je atenuovaný kmen *Mycobacterium bovis*. V České republice očkování není povinné, probíhá pouze u rizikových skupin nebo na vyžádání.

M. leprae je původcem malomocenství (lepry). Jde o intracelulární bakterii, která má výraznou afinitu ke kůži, nervům a svalům a velmi dlouhou generační dobu - 10 až 20 dnů (BEDNÁŘ *et al.* 1996). Inkubační doba onemocnění je proto velmi dlouhá a to 2 až 3 roky. Podle statistik WHO byla na počátku r. 2010 celosvětová prevalence onemocnění 192 246 případů. Přestože díky správné diagnostice a účinné léčbě dochází v posledních letech k výraznému poklesu onemocnění, jsou země, kde tomu tak bohužel není. Jedná se především o země východního Středomoří.

MAC zahrnuje atypické druhy mykobakterií *M. intracellulare* a *M. avium*. Tyto mykobakterie jsou často spojeny s onemocněním lidí. Jedná se především o plicní patogeny imunosuprimovaných jedinců, často způsobují infekci u pacientů s AIDS. Mykobakterie MAC jsou všudypřítomné, byly izolovány z vody, půdy či zvířat. Do komplexu je řazeno i *M. avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). MAP je obligátní patogen způsobující Johnovu chorobu přežvýkavců (např. u mléčného skotu), což má za následek úbytek dojivosti, průjmy a úbytek na hmotnosti. Některá mikrobiologická a

klinická data naznačují, že se *MAP* podílí také na patologii Crohnovy choroby (HERMON-TAYLOR a EL-ZAATARI 2004, UZOIGWE *et al.* 2007), což je chronické zánětlivé onemocnění gastrointestinálního traktu. Na jeho vzniku se ale podílejí i jiné faktory, především genetické predispozice, vliv prostředí či stav imunitního systému.

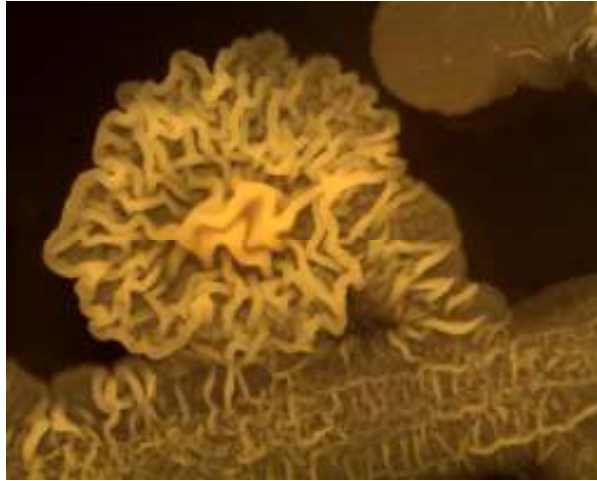
2.2.1.1. *Mycobacterium smegmatis*

Bakterie *Mycobacterium smegmatis* byla poprvé objevena a izolována v r. 1884 Lustgartenem, který objevil v syfilitickém tvrdém vředu bacillus s barevným vzhledem podobným bacilu tuberkulózy. Podobný organismus našli i Alvarez a Tavel v r. 1885 a pojmenovali ho jako *Smegma Bacillus*. Trevisan v r. 1889 použil poprvé označení *Bacillus smegmatis* a pojmenování *Mycobacterium smegmatis* bylo zavedeno až v r. 1899 Lehmannem a Neumannem (GORDON a SMITH 1953).

M. smegmatis se běžně vyskytuje v půdě, vodě či na rostlinách. Přežívá ve vícebuněčných uskupeních zvaných biofilmy. Je považováno za nepatogenní mikroorganismus, jen vzácně může být příčinou onemocnění. Většinou se jedná o infekce kůže či měkkých tkání a do lidského těla se infekce dostává znečištěním chirurgických ran (PENNEKAMP *et al.* 1997, BEST a BEST 2009). Rozšířené infekce pak postihují převážně imunosuprimované jedince.

Genom *M. smegmatis* má délku 6 988 209 nukleotidů a obsahuje 67% podíl GC bazí (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Poprvé byl osekvenován v r. 2006.

Pro práci v laboratoři je *M. smegmatis* velice vhodné hlavně proto, že je nepatogenní a mezi mykobakteriemi patří k rychle rostoucím. Generační doba *M. smegmatis* se pohybuje okolo 2,5 hodin. Slouží tedy jako účelný laboratorní model pro studium vlastností a mechanismů patogenních mykobakterií, jako např. *M. tuberculosis* či *M. bovis*. Optimální kultivační teplota pro *M. smegmatis* je 37 °C. Při kultivaci na agaru s glycerolem vytváří zvrásněné kolonie krémově bílé barvy. S dobou kultivace se barva kolonií mění na krémově žlutou až oranžovou (viz Obr. 6). Díky přítomnosti mykolových kyselin v buněčné stěně mají kolonie voskovitý povrch.



OBR. 6 - Kolonie *M. smegmatis* na agaru 7H10 s glycerolem. Kultivováno při 37 °C po dobu 2 dnů. Pozorováno binokulární lupou National (MOTIC, Čína) se zvětšením 10x.

M. smegmatis je využíváno také v biotechnologickém průmyslu pro produkci xylitolu či L-arabinózy (AHMED 2001). Xylitol, zvaný též dřevný či březový cukr, je přírodní sladidlo využívané jako náhražka cukru vhodná pro diabetiky. Využívá se jako přídatek do žvýkaček či zubních past. L-arabinóza je přírodní sacharid využívaný v biotechnologiích, v potravinářství či jako složka kultivačních médií.

2.2.2. Buněčný obal mykobakterií

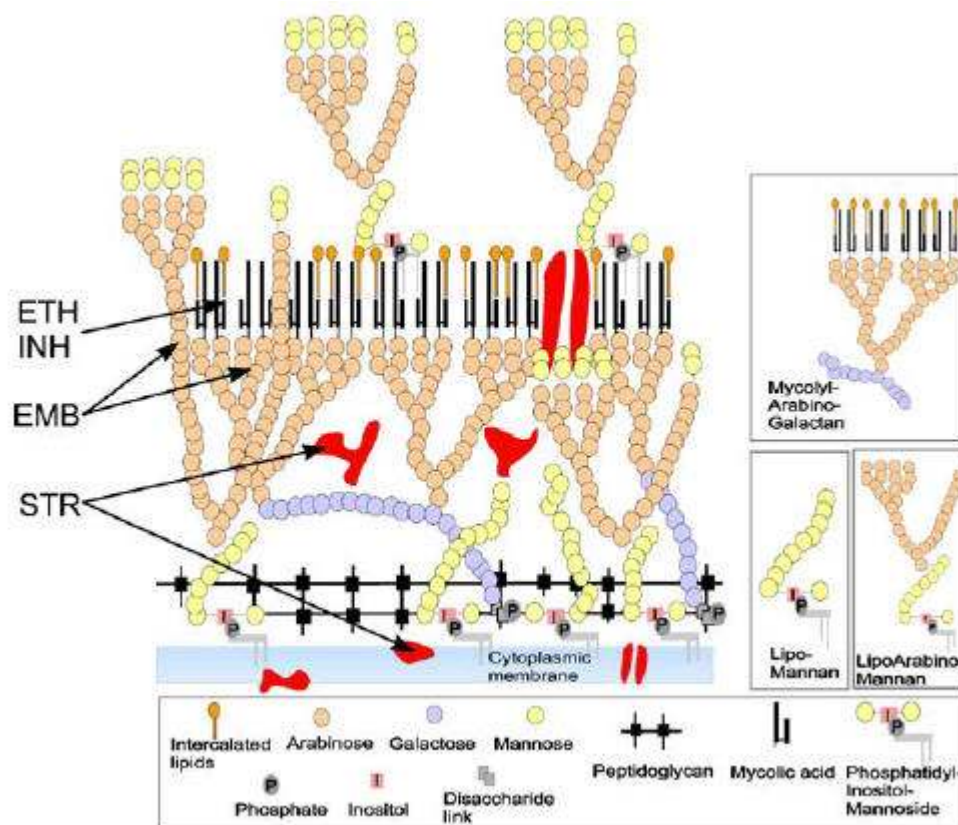
Buněčný obal patogenních mykobakterií je esenciální pro jejich růst a přežití v hostiteli. Obměny ve struktuře buněčného obalu byly připisovány ke schopnosti přežití mykobakterií v rozmanitých prostředích (GUENIN-MACE *et al.* 2009). Hlavním znakem, který přispívá k rezistenci mykobakteriálních patogenů k většině antibiotik a chemoterapeutickým činidlům, je právě neobvyklá struktura buněčné obálky s vysokým podílem lipidů a v souvislosti s tím i její snížená propustnost. Složení buněčného obalu ovlivňuje i jiné charakteristiky buňky, ať už je to výše zmiňovaná acidorezistence či hydrofobicita. Variacemi ve složení lipidů na povrchu buňky unikají mykobakterie imunitnímu systému hostitele (GUENIN-MACE *et al.* 2009). Obálka mykobakterií je prostorově organizovaná do tří částí - plazmatická membrána, kostra buněčné stěny a pouzdro. Mezi hlavní komponenty buněčného obalu

jsou zahrnuty mykolové kyseliny (MK), arabinogalaktan (AG), lipoproteiny, lipomannan (LM) a lipoarabinomannan (LAM) (viz Obr. 7).

Plazmatická membrána je lipidická dvojvrstva složená z fosfolipidů a proteinů. Jsou v ní zakotveny lipoglykany LAM a LM, což jsou mnohonásobně glykosylované fosfatidylinositol mannosidy. Buněčná stěna udává velikost a tvar mykobakterií. Je tvořena peptidoglykanem, ke kterému je kovalentně navázán arabinogalaktan esterifikovaný mykolovými kyselinami. Peptidoglykan mykobakterií je složen z jednotek *N*-acetylglukosaminu a muramové kyseliny, která je oproti ostatním bakteriím *N*-glykosylovaná (BESRA a BRENNAN 1997). Přítomnost AG je specifická pro mykobakterie. Jedná se heteropolysacharid složený z jednotek D-arabinofuranosylu a D-galaktofuranosylu (DAFFE *et al.* 1990). Pro podřád *Corynebacterineae*, kam řadíme i mykobakterie, je typická produkce mykolových kyselin. Mykolové kyseliny tvoří povrch buňky voskovým a ovlivňují tak propustnost buněčné stěny. Mykolové kyseliny mykobakterií jsou dlouhé mastné kyseliny s 60-90 uhlíky, α -alkyl větvené a β -hydroxylované. MK pomalu rostoucích patogenních mykobakterií (*M. tuberculosis*) obsahují cyklopropanové jádro, zatímco rychle rostoucí saprofyty (*M. smegmatis*) ho neobsahují (CHATTERJEE 1997).

Buněčný obal mykobakterií obsahuje také řadu lipidů, které jsou asociovány se strukturálními elementy obalu nekovalentními hydrofobními vazbami (GUENIN-MACE *et al.* 2009). Tyto lipidy se mezidruhově liší a můžeme je rozdělit do dvou rodin - trehalózové lipidy a phthiocerolové lipidy. Trehalózové lipidy obsahují trehalózu, která je tvořena dvěma glukózovými jednotkami spojenými α -1,1 vazbou, esterifikovanou mastnými kyselinami. Lipidy phthiocerolové rodiny se vyskytují pouze u pomalu rostoucích mykobakterií a obsahuje dimykokerosáty nebo fenolické glykolipidy (GUENIN-MACE *et al.* 2009).

Enzymatické dráhy syntézy buněčného obalu mykobakterií jsou jedním z cílových míst dostupné antimikrobiální látky účinné na mykobakterie. Pro příklad lze uvést ethionamid (ETH) a isoniazid (INH), které inhibují biosyntézu mykolových kyselin, nebo ethambutol (EMB) zasahující do syntézy glykosylovaných molekul obalu (ALSTEENS *et al.* 2008).



OBR. 7 - Schéma buněčného obalu mykobakterií (ALSTEENS et al. 2008). Znázorněny jsou všechny hlavní složky obalu. Šipkami jsou vyznačena cílová místa uvedených antimikrobiálních látek - ethionamid (ETH), isoniazid (INH), ethambutol (EMB) a streptomycin (STR).

2.2.3. Dormance u mykobakterií

V souvislosti s latentní tuberkulózou bývá často zmiňován pojem dormantních (nekultivovatelných, NC) buněk *M. tuberculosis*, které mohou v hostiteli přežívat měsíce až roky bez viditelné známky onemocnění. Klasické biochemické a mikrobiologické metody na odhalení dormantních buněk prakticky nestačí, protože bakterie jsou v tomto stádiu nekultivovatelné na běžných laboratorních médiích, postrádají buněčné dělení a díky snížené metabolické aktivitě jsou odolné vůči antibiotikům (SALINA et al. 2010). U dormantních buněk v podstatě dochází k přechodnému zastavení nebo omezení fyziologických procesů, buňka tak šetří energii a je schopná přežít nepříznivé období. Latentní stav je pro hostitele nebezpečný hlavně z toho důvodu, že je bakterie schopná náhlé a rychlé přeměny v metabolicky aktivní agens, což vede k rozvoji akutního onemocnění. Mechanismus přeměny mykobakterií

do dormantního stavu a jejich reaktivace je stále málo prostudovanou oblastí, přesto bylo publikováno několik modelů aktivace nekultivovatelných mykobakterií. Shleeva *et al.* navrhli model přeměny z aktivního do dormantního stavu u *M. smegmatis* (SHLEEVA *et al.* 2004), kdy mykobakterie inkubovali za suboptimálních podmínek, v modifikovaném médiu, při změněné kultivační teplotě či dostupnosti kyslíku. K reaktivaci bakterií pak došlo po přidání proteinu Rpf (resuscitation promoting factor). U mutanty *M. smegmatis*, která měla plazmid obsahující *rpf* gen, došlo k reaktivaci spontánně.

Salina *et al.* studovali biochemické a morfologické změny, ke kterým dochází u *M. smegmatis* při přeměně do dormantního stavu (SALINA *et al.* 2010). Pomocí elektronové mikroskopie zjistili, že dormantní buňky mění velikost a tvar, oproti metabolicky aktivním buňkám se jeví spíše jako sférické. Podstatná část dormantních buněk měla zesílenou buněčnou stěnu, kondenzovanou cytoplazmu a snížený počet ribozomů. Dormantní formy vykazují sníženou respirační aktivitu, aktivitu enzymů Krebsova cyklu a glyoxylátového cyklu. Naopak přetrvávající membránový potenciál u NC buněk pravděpodobně umožňuje schopnost reaktivace. Oproti metabolicky aktivním buňkám dochází u dormantních buněk k přibližně dvojnásobnému poklesu celkového množství lipidů, množství hydrofobních proteinů se naopak zvyšuje (SALINA *et al.* 2010). U dormantních buněk nebyly nalezeny volné mykolové kyseliny, které jsou u metabolicky aktivních buněk hojné. Stejná skupina později publikovala, že při přeměně mykobakterií dochází ke ztrátě hlavní lipidové složky, trehalóza monomykolátu (NAZAROVA *et al.* 2011). Dále přišli poprvé s poznatkem, že přidání lipidů k NC buňkám *M. smegmatis* indukuje jejich resuscitaci, což je způsobeno přítomností mastných kyselin. Zdá se tedy, že lipidové složky mají signální roli při přeměně dormantních buněk na buňky metabolicky aktivní (NAZAROVA *et al.* 2011).

2.2.4. Sporulace u mykobakterií

Sporulace je proces, kdy je bakterie schopna vytvořit z vegetativní buňky buňku metabolicky inaktivní a extrémně odolnou vůči nepříznivým vnějším podmínkám. Ke sporulaci dochází ve stacionární fázi růstu mikroorganismu, tedy při vyčerpání živin z okolí. Mezi sporulující řadíme například rody *Bacillus* nebo *Clostridium*, které

vytvářejí endospory (spory vznikající uvnitř mateřské buňky), či aktinomycety, které tvoří spory septací vzdušného mycelia.

I když mykobakterie řadíme mezi aktinomycety, byly vždy považovány za nesporulující bakterie. Ghosh *et al.* však ve své práci publikovali doklady o tom, že *M. marinum* a pravděpodobně i *M. bovis* BCG mohou tvořit spory (GHOSH *et al.* 2009). V případě *M. marinum* byla kultura pěstována na agaru při 30°C po dobu dvou týdnů, *M. bovis* BCG při 37°C po dobu 6 měsíců. Velikosti a morfologie buněk a spor *M. marinum* byly analyzovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), vnitřní struktura spor pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a obrázky byly porovnány se spory dobře prozkoumané bakterie *Bacillus subtilis*. Díky výrazné shodě tak byly identifikovány endospory *M. marinum* a *M. bovis* BCG. Po inokulaci spor do čerstvého média došlo k obnovení vegetativního růstu. Aby si autoři byli jisti, že se opravdu jedná o pravé spory, bylo třeba potvrdit několik znaků typických právě pro endospory. Tím prvním byla specifická biochemie povrchu spory, díky které jsou spory barvitelné malachitovou zelení, což se potvrdilo. Druhým znakem byla vysoká rezistence k fyzikálním a chemickým stresům. Autoři otestovali působení tepla (65°C) a glutaraldehydu, u obou faktorů došlo k přežití až 40% buněk stacionární fáze, což kvalitativně odpovídá poměru spor v populaci. Dalším znakem byla přítomnost typické genetické výbavy. Geny exprimované při sporulaci byly popsány například u *B. subtilis*. Ghosh *et al.* identifikovali předpokládané homology známých genů a prokázali jejich zvýšenou expresi ve stacionární fázi růstu *M. marinum*. Posledním ze znaků byla přítomnost dipikolinové kyseliny ve sporách, kterou taktéž prokázali (GHOSH *et al.* 2009).

Teorie o sporulaci publikovaná Ghoshem *et al.* (GHOSH *et al.* 2009) vyvolala u jiné skupiny nesouhlas. Traag *et al.* provedli sekvenční analýzu genomu *M. marinum* a otestovali produkci endospor a tepelnou odolnost kolonií *in vitro* a v žabím modelu (TRAAG *et al.* 2010). Autoři neidentifikovali u mykobakterií žádný ortolog genů sporulace jasně sporulujících organismů a nepodařilo se jim ani reprodukovat postupy publikované Ghoshem *et al.*

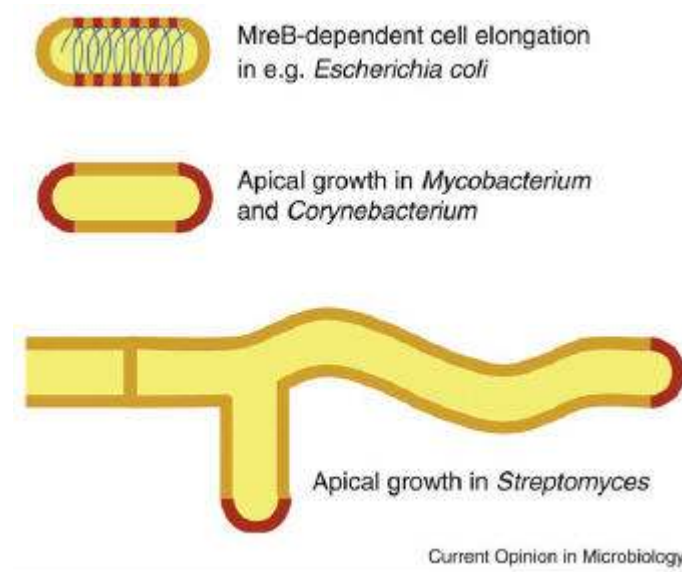
V současné době se výzkum soustředí na sporulaci mykobakterií za použití izolačních metod Ghoshe *et al.* (GHOSH *et al.* 2009). Lamont *et al.* zkoumali, zda se sporulace týká pouze *M. marinum*, anebo zahrnuje i jiné druhy, jako například *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (LAMONT *et al.* 2012). Autoři izolovali sporám podobné struktury z jednoletých kultur MAP. Všechny sporám podobné morfotypy

měly patřičnou ultrastrukturu, obsahovaly dipikolinovou kyselinu, *MAP* specifickou inzerční sekvenci (*IS900*), homology sporulačních genů a vykazovaly rezistenci k teplu (LAMONT *et al.* 2012). Navíc si teplem ošetřené *MAP* spory během klíčení ponechaly infekčnost a acidorezistenci. Lze tedy předpokládat, že sporulace je jedna z možných cest, jak může *MAP* a pravděpodobně i jiné mykobakterie perzistovat v prostředí za nepříznivých podmínek. Pokud bude potvrzeno, že sporulace je běžný proces využívaný mykobakteriemi jako odpověď na podmínky prostředí, lze uvažovat o tom, že sporulace je jeden ze způsobů, jakým mykobakterie dosahuje dormantního stavu v hostiteli. Tato poznání by otevřela dosud neznámou oblast mykobakteriálního vývoje a mohla by sloužit jako nástroj prevence a boje proti onemocněním jako je například tuberkulóza.

2.2.5. Růst a buněčné dělení aktinomycet

Většina tyčkovitých bakterií využívá při vegetativním růstu aktinu podobný MreB cytoskelet k organizaci inserce nového peptidoglykanu do podélných stěn buňky (DANIEL a ERRINGTON 2003). Oproti tomu aktinobakterie včetně mykobakterií vykazují apikální růst, který je charakterizován insercí prekurzorů nového peptidoglykanu na růstové vrcholy (vrcholy hyf u streptomycet či póly buňky u mykobakterií) (NGUYEN *et al.* 2007). Filamentózní (streptomycety) i tyčkovité (mykobakterie, corynebakterie) aktinobakterie využívají při apikálním růstu protein DivIVA, u rodu *Mycobacterium* známým jako antigen 84 či Wag31 (NGUYEN *et al.* 2007). DivIVA je tropomyosinu podobný protein, který tvoří oligomery na růstových vrcholech. Oproti *B. subtilis*, kde se DivIVA podílí na vzniku septa, u aktinobakterií je spíše růstovým markerem. Spouští vznik nových míst pro růst buňky ovlivněním enzymů syntézy buněčné stěny (NGUYEN *et al.* 2007, HEMPEL *et al.* 2008). U *M. tuberculosis* se Wag31 váže k PBP3 (penicilin-binding protein), což je transpeptidáza syntetizující peptidoglykan (MUKHERJEE *et al.* 2009). Společně s dalšími proteiny tvoří ternární komplex, který zodpovídá nejen za syntézu peptidoglykanu, ale i za apikální růst.

U mykobakterií je funkce DivIVA regulována dvěma Ser/Thr kinázami eukaryotického typu PknA a PknB (KANG *et al.* 2005), které ho fosforylují na Thr73, což stimuluje růst a syntézu buněčné stěny.



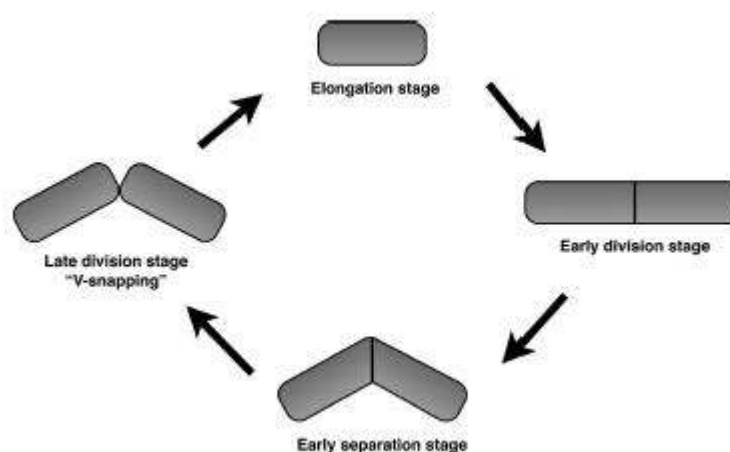
OBR. 8 - Typy buněčného růstu u bakterií (FLARDH 2010). Nahoře je znázorněn růst buněk u většiny tyčkovitých bakterií, uprostřed je znázorněn apikální růst u rodů *Mycobacterium* a *Corynebacterium* a dole je zobrazen hyfální růst rodu *Streptomyces*.

Většina známých tyčkovitých bakterií roste podél své osy a dělí se binárním dělením. Po replikaci chromozomu dochází k formování dělicího septa ve střední části buňky a rozdělení na dvě buňky dceřinné, z nichž každá obsahuje jednu kopii chromozomu (HARRY 2001). Jde o prostorově a časově regulovaný proces, kdy musí být replikace chromozomu koordinována s buněčným dělením. Tyto mechanismy byly intenzivně studovány na modelech *E. coli* a *B. subtilis*. Prvotní fází buněčného dělení je tvorba Z-kruhu, který je tvořen polymerem FtsZ proteinu, který je podobný tubulinu (BI a LUTKENHAUS 1991). Z-kruh pak za hydrolýzy GTP pohání cytokinezi. Dochází ke konstrikcí Z-kruhu dovnitř buňky, čímž dojde ke vtáhnutí cytoplazmatické membrány provázenému syntézou peptidoglykanu. Tvar buňky je udržován pomocí funkce Mre proteinů, které vážou cytoskeletální prvky buňky s proteiny, které syntetizují peptidoglykan (STEWART 2005). Umístění Z-kruhu v „divisomu“ je zajištěno kombinací negativních kontrolních systémů. Proteiny MinCDE brání tvorbě Z-kruhu mimo střed buňky tím, že se shromažďují na pólech buňky (HARRY 2001). Proteiny Noc a Slm zase zabraňují polymerizaci v místech, kde se nacházejí bakteriální nukleoidy (BERNHARDT a DE BOER 2005).

Mykobakterie díky svému specifickému buněčnému obalu vyžadují další specializované mechanismy jak pro koordinaci růstu a buněčného dělení, tak i pro

udržení tvaru buňky. Mechanismus výběru místa pro vznik Z-kruhu u mykobakterií zatím nebyl objasněn, stejně tak homology Min systému nebo Noc proteinů nebyly zatím identifikovány. Rozdíl mezi modelem *E. coli/B. subtilis* a mykobakteriemi je také v tom, že u mykobakterií nejprve dochází ke vzniku septa a poté až ke konstrikcí buňky (VIJAY *et al.* 2012), zatímco u modelu *E. coli* a *B. subtilis* byl prokázán současný průběh těchto dějů.

Pro mykobakterie je typická tvorba tzv. „V-forem“ („V-snapping forms“) během buněčného dělení (THANKY *et al.* 2007). Tyto struktury byly pozorovány ve všech stádiích růstu, ale jejich množství se stářím buněk klesalo. V-formy jsou výsledkem nestejnomyerného štěpení vnějšího obalu buňky v místě dělicího septa. Poslední fáze buněčného dělení mykobakterií je provázána puknutím („snapping“), kdy se buňka rozdělí na dvě dceřinné (viz Obr. 9). Za tuto morfologii pravděpodobně zodpovídá vrstva AG a MK, které při konstrikcí Z-kruhu zůstávají intaktní (HETT a RUBIN 2008).



OBR. 9 - „Snapping-model“ buněčného dělení mykobakterií (HETT a RUBIN 2008).

2.2.6. Mykobakterie a biofilmy

Mezi bakterie schopné tvořit biofilmy řadíme i bakterie rodu *Mycobacterium*. Relativně málo je však známo o tom, jakým mechanismem mykobakterie biofilmy tvoří. Většina studií mykobakteriálních biofilmů je zaměřena na rychle rostoucí druhy jako je *M. smegmatis* či *M. marinum* (ALAVI *et al.* 2007, SHI *et al.* 2011). Avšak i pomalu rostoucí *M. tuberculosis* sdílí řadu charakteristik s organismy běžně

produkcí biofilm. Ať už je to vysoká míra perzistence, rezistence k antibiotikům či tendence k tlumení imunitního systému hostitele. *M. tuberculosis* má i růstové vlastnosti připomínající biofilm. Dobře známým jevem u mykobakterií je shlukování v tekuté kultuře, tzv. „clumping“, či tvorba plovoucího biofilmu na rozhraní vzduch-médium (OJHA *et al.* 2008, KULKA *et al.* 2012). Ojha *et al.* zkoumali specifické potřeby biofilmu *M. tuberculosis* oproti planktonním buňkám (OJHA *et al.* 2008). Zjistili, že jedním z faktorů majících vliv na tvorbu biofilmu je schopnost produkce CO₂. Mutanty postrádající gen pro 2-oxoglutarát dehydrogenázu a vyžadující přísun exogenního CO₂ byly v tvorbě biofilmu defektní. Dále publikovali, že faktorem majícím vliv na zrání biofilmu je množství železa v médiu. Snížení jeho množství nemělo vliv na planktonní kulturu, ale vedlo ke zpomalení růstu biofilmu. Efekt byl nejvíce znatelný v pozdních fázích vývoje biofilmu, nicméně u buněk přetrvala schopnost vazby na pevný povrch. Odstranění zinku z média mělo podobný efekt. Zajímavé je, že jak železo, tak zinek jsou důležitými kofaktory enzymů zahrnutých v syntéze CO₂, stejně tak i v syntéze mykolových kyselin (OJHA *et al.* 2008). Skupina Ishidy *et al.* objevila nový inhibitor tvorby biofilmu u *M. smegmatis* a *M. bovis* BCG, kterým je desferrioxamin E, což je bakteriální siderofor izolovaný z mořské aktinomycety (ISHIDA *et al.* 2011). Tato látka funguje jako chelatační činidlo, které vyvazuje železité ionty z prostředí. Je to tak další důkaz toho, že množství dostupného železa je důležitým faktorem při tvorbě biofilmu.

Jak bylo řečeno dříve, bakterie při vývoji biofilmu syntetizují extracelulární matrix polysacharidové povahy. U některých bakterií tomu tak není. Mezi takové patří právě mykobakterie (ZAMBRANO a KOLTER 2005). Nebyly u nich identifikovány žádné exopolysacharidové komponenty matrix, stejně tak analýza genomu neodhalila schopnost jejich produkce. Přesto jsou mykobakterie schopny tvořit nápadné biofilmy na hydrofobních pevných površích či plovoucí biofilm na povrchu média (ZAMBRANO a KOLTER 2005). Recht *et al.* publikovali, že u *M. smegmatis* jsou pro prvotní vazbu na povrch důležité glykopeptidolipidy (RECHT *et al.* 2000). Ojha *et al.* identifikovali novou třídu mastných kyselin, které hrají důležitou roli při utváření biofilmu *M. smegmatis* (OJHA *et al.* 2005). Naznačili, že součástí syntézy těchto mastných kyselin je GroEL1, což je chaperon rodiny Hsp60 vyskytující se u mykobakterií. Ve své studii prokázali, že profil mykolových kyselin v biofilmu *M. smegmatis* se výrazně liší od profilu planktonických buněk. Tou novou skupinou mastných kyselin byly mnohem kratší molekuly o délce 56-68 uhlíků, které by mohly být prekurzorem klasických dlouhých mykolových kyselin. Mutanta postrádající gen

pro GroEL1 nebyla schopna vyvinout biofilm a byla také defektní v tvorbě mykolových kyselin. Defekt byl nejvíce patrný při produkci biofilmu, kdy dochází k hromadění těchto krátkých mykolových kyselin. To napovídá tomu, že GroEL1 hraje specifickou roli v syntéze krátkých mykolových kyselin. Přímou interaguje s KasA (β -keto-acyl carrier protein syntáza), což je složka multienzymového komplexu podílejícího se na syntéze mykolových kyselin.

Otázkou tedy zůstává, jakým způsobem je zprostředkováná agregace buněk a prvotní fáze vývoje biofilmu. Jednou z možností je, že jsou tyto krátké mykolové kyseliny uvolňovány a tvoří hydrofobní extracelulární matrix biofilmu (OJHA *et al.* 2005). Mykobakteriální biofilmy tedy mají odlišné složení od biofilmů ostatních bakterií, jejich extracelulární matrix je lipické povahy spíše než polysacharidové. Bylo zjištěno, že biofilmy *M. tuberculosis* obsahují velké množství extracelulárních volných mastných kyselin (FM, free mycolic acids) (OJHA *et al.* 2008). V roce 2010 Ojha *et al.* publikovali práci o původu FM v biofilmech *M. smegmatis* (OJHA *et al.* 2010). K produkci FM dochází enzymatickým uvolňováním z konstitutivně přítomných mykolových derivátů. Jedním z nich je trehalóza dimykolát (TDM), který je štěpen TDM-specifickou serin esterázou. Mutace v ní vede k nedetekovatelné hydrolytické aktivitě, sníženému množství FM a ke zpomalení růstu biofilmu (OJHA *et al.* 2010).

Dalším proteinem hrajícím roli ve vývoji biofilmu a morfologii kolonie *M. smegmatis* je protein Lsr2 (CHEN *et al.* 2006). Analýza lipidů buněčné stěny u mutanta postrádajícího gen *lsr2* prokázala, že ve stěně se mění profil apolárních lipidů. Přestože jde o protein ovlivňující biosyntézu buněčné stěny, bylo prokázáno, že Lsr2 je protein cytosolický a není asociován s buněčnou stěnou (CHEN *et al.* 2006).

Faktorem, který také ovlivňuje charakter buněčné stěny a následně tedy schopnost tvorby biofilmu, je nedostatek anorganického polyfosfátu (SHI *et al.* 2011). Polyfosfát ovlivňuje složení mastných kyselin v buněčné stěně *M. smegmatis*, což vede k ovlivnění schopnosti klouzavého pohybu a tvorby biofilmu.

M. tuberculosis kóduje protein polyketid syntázu Pks15/1, která je nezbytná pro produkci fenolických glykolipidů (PGL). Pang *et al.* provedli studii, kdy analyzovali mutanty neschopné tvořit plovoucí biofilm (PANG *et al.* 2012). Jedna z nejvíce oslabených mutant měla defektní právě gen *pks1*. Komplementace tohoto genu obnovila schopnost tvorby biofilmu nezávisle na znalosti přesné funkce *pks1* v syntéze PGL. Vše tedy nasvědčuje tomu, že především neobvyklá buněčná stěna mykobakterií je hlavním faktorem ovlivňující schopnost vytvářet biofilm.

V části věnující se regulaci vývoje biofilmu jsem zmiňovala vliv molekuly c-di-GMP, jejíž zvýšená hladina stimuluje produkci extracelulární matrix a adhesinů, což podporuje tvorbu biofilmu. Kumar *et al.* se věnovali této molekule u *M. smegmatis*, jakožto modelovému organismu mykobakterií (KUMAR a CHATTERJI 2008). Hledali protein s GGDEF a EAL doménami. Většina proteinů s těmito doménami má buď diguanylát cyklázovou nebo fosfodiesterázovou aktivitu. Kumar *et al.* však zjistili, že *M. smegmatis* kóduje bifunkční protein MSDGC-1 s doménami vykazující obě tyto aktivity. Pro studium role tohoto proteinu ve fyziologii *M. smegmatis* připravili deleční mutantu. Při kontrole schopnosti tvorby biofilmu nepozorovali žádné rozdíly oproti divokému kmeni, stejně tak planktonický růst a klouzavý pohyb nebyl ovlivněn. Rozdíl byl pozorován pouze u schopnosti přežití při dlouhodobém hladovění na uhlík, kdy mutanta byla až 100x méně životaschopná oproti divokému kmeni (KUMAR a CHATTERJI 2008).

2.2.7. Proteomika & rod *Mycobacterium*

Proteomika je vědecká disciplína zabývající se studiem proteomu, tedy souboru proteinů v buňce za určitých fyziologických podmínek. Pojem proteom byl poprvé použit v r. 1994 Marcem R. Wilkinsem na konferenci v Sydney pro označení celkového proteinového komplementu kódovaného genomem (WASINGER *et al.* 1995). Na rozdíl od genomu, který je v daném organismu neměnný, je proteom proměnlivý a závisí na řadě vnějších a vnitřních faktorů. Díky studiu expresních profilů v buňkách v konkrétních životních fázích a studiu interakcí proteinů mezi sebou je proteomika komplexním pohledem na genovou expresi organismu. Klasickou metodou proteomiky je dvourozměrná elektroforéza, kterou je možné proteiny rozdělit a po obarvení jimi tvořených skvrn vytvořit proteinové mapy. Ty lze pak hodnotit bioinformatickými postupy, popřípadě je lze využít k dalšímu studiu, např. pomocí hmotnostní spektrometrie. Oproti hodnocení genové exprese na úrovni transkriptomu, tedy souboru všech RNA v buňce, má proteomika výhodu v tom, že její pomocí lze identifikovat posttranslační modifikace proteinů.

Přestože řada genomů u rodu *Mycobacterium* byla již osekvenována, stále zůstává nezodpovězeno mnoho otázek v souvislosti s fylogenezí či mechanismy kontroly buněčného růstu. Jak již bylo řečeno výše, mykobakterie jsou charakteristické

svou silnou a nepropustnou buněčnou stěnou, díky které přežívají v extrémních podmínkách a v přítomnosti antibiotik. Jejich povrch je velmi komplexní, obsahující proteiny, cukry a lipidy, které jsou alespoň částečně pro mykobakteriální rod konzervované. Řada proteinů je zanořena do buněčného obalu, některé jsou ale vystaveny na povrchu a hrají roli v životních procesech, např. mezibuněčných interakcích, transportu iontů a živin, buněčné signalizaci či hrají roli v patogenních mechanismech. Proto He *et al.* provedli proteomovou analýzu buněčné stěny *M. smegmatis* s cílem najít případné kandidáty pro vakcinaci či vývoj léčebných preparátů proti patogenním druhům (HE a DE BUCK 2010). Za využití proteomických přístupů identifikovali 390 proteinů buněčné stěny a 63 proteinů vystavených na povrchu buňky. Studií věnujících se proteomu přímo patogenních mykobakterií je málo. Jednou z nich je studie Wolfe *et al.*, kteří provedli proteomickou analýzu buněčné stěny *M. tuberculosis* (WOLFE *et al.* 2010). Identifikovali 528 proteinů, z nichž 105 jich nebylo do té doby publikováno. U 35 % identifikovaných proteinů bylo dokázáno, že se podílejí na metabolismu malých molekul a 25 % na syntéze a degradaci makromolekul. To svědčí o faktu, že buněčná stěna *M. tuberculosis* je značně zapojena do mechanismů přežití a přestavby buňky. Kruh *et al.* provedli *in vivo* analýzu proteomu patogenní *M. tuberculosis* (KRUIH *et al.* 2010). Na modelu morčete analyzovali proteom během rané a chronické fáze tuberkulózy. Jelikož do té doby nebyla provedena *in vivo* analýza vyvolavatele tuberkulózy, jednalo se o první proteomovou studii svého druhu, kdy identifikovali přes 500 unikátních proteinů. Přesto je ale studium proteinové exprese *in vivo* náročné především kvůli tomu, že bakteriální proteiny tvoří jen malou část z obrovského množství hostitelských proteinů v pozadí.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Biologický materiál

Bakteriální kmen *Mycobacterium smegmatis* mc²155 byl získán ze sbírek Mikrobiologického ústavu AV ČR. Kmen byl izolován v roce 1990 (SNAPPER *et al.* 1990). Jde o dobře transformovatelnou mutantu vhodnou pro analýzu genové exprese u mykobakterií. Délka genomu je 6 988 209 bp.

3.1.2. Kultivační média

Middlebrook 7H9 Broth (DIFCO, Francie)

Složení (na 1 litr):

Hydrogenfosforečnan disodný	2,5 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	1 g
Síran amonný	0,5 g
L-glutamová kyselina	0,5 g
Citrát sodný	0,1 g
Síran hořečnatý	0,05 g
Citrát železito-amonný	0,04 g
Pyridoxin	0,001 g
Síran zinečnatý	0,001 g
Síran měďnatý	0,001 g
Biotin	0,0005 g
Chlorid vápenatý	0,0005 g

2,35 g směsi rozpustit v 0,5 l destilované vody a přidat glycerol v konečné koncentraci 0,2% (v/v). Médium sterilizovat v autoklávu. Konečné pH média je $6,6 \pm 0,2$. Pro submerzní kultivaci do média po sterilizaci přidat sterilní Tween 80[®] v konečné koncentraci 0,05% (v/v).

Middlebrook 7H10 Agar (DIFCO, Francie)

Složení (na 1 litr):

Agar	15 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,5 g
Hydrogenfosforečnan disodný	1,5 g
Síran amonný	0,5 g
L-glutamová kyselina	0,5 g
Citrát sodný	0,4 g
Citrát železito-amonný	0,04 g
Síran hořečnatý	0,025 g
Pyridoxin hydrochlorid	0,001 g
Síran zinečnatý	0,001 g
Síran měďnatý	0,001 g
Chlorid vápenatý	0,0005 g
Biotin	0,0005 g
Malachitová zeleň	0,00025 g

9,5 g směsi rozpustit v 0,5 l destilované vody a přidat glycerol v konečné koncentraci 0,5% (v/v). Médium sterilizovat v autoklávu. Konečné pH média je $6,6 \pm 0,2$.

3.1.3. Chemikálie

Název chemikálie	Výrobce	Zkratka
Aceton	Lachema	
Agaróza	Sigma	
Akrylamid	Serva	
Amfoliny	Sigma	
Benzonáza	Merck	
Bisakrylamid	Serva	
Bromfenolová modř	Lach-Ner	
Coomassie Blue G-250	Serva	
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	Lach-Ner	
Dithiothreitol	Serva	DTT

Název chemikálie	Výrobce	Zkratka
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	Lachema	
Dusičnan stříbrný	Penta	
Ethanol	Lagron	
Glycerol	Lach-Ner	
Glycin	Serva	
Heptahydrát síranu hořečnatého	Lachema	
Hydroxid sodný	Lachema	
CHAPS	Serva	
Chlorid draselný	Lachema	
Chlorid sodný	Lachema	
Iodoacetamid	Sigma	IAA
Isopropanol	Lach-Ner	
Kyselina ethylendiamintetraoctová	Sigma	EDTA
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner	
Kyselina octová	Lach-Ner	
Kyselina orto-fosforečná	Lach-Ner	
Kyselina trichloroctová	Lach-Ner	TCA
Methanol	Lach-Ner	
Methylenová modř	Lach-Ner	
Minerální olej	Amersham	
Močovina	AppliChem	
Peroxodisíran amonný	Sigma	APS
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma	PMSF
Síran amonný	Lach-Ner	
Tetramethyldiamin	Serva	TEMED
Thiomočovina	Sigma	
Tris báze	AppliChem	
Tris-HCl	Serva	
Tween [®] 80	Serva	

3.1.4. Pufry, roztoky a komerční kity

3.1.4.1. Pufry, roztoky a komerční kity pro izolaci proteinů

- Qproteome[®] Bacterial Protein Prep Kit (QIAGEN, Německo)

Kit obsahuje Native Lysis Buffer, Bensonase[®] Nuclease, Lysozyme.

- Complete[™] - Protease Inhibitor Coctail Tablets (ROCHE, Německo)

- Lyzační pufr - 50mM Tris, 100mM MgSO₄ · 7H₂O, 100mM KCl, 10mM DTT.

Všechny složky kromě DTT rozpustit v 50 ml dH₂O, upravit pH na 7,4 a doplnit dH₂O do 100 ml. Před použitím přidat DTT. Pufr uchovávat při 4 °C.

- 50% TCA (w/v) - k 25 g TCA přidat dH₂O do konečného objemu 50 ml, uchovávat při 4 °C.

- Fosfátový pufr (pH = 6,8) - 0,1M NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0,1M Na₂HPO₄ · 12H₂O. Obě složky pufru smíchat v poměru 51 ml 0,1M NaH₂PO₄ · 2H₂O a 49 ml 0,1M Na₂HPO₄ · 12H₂O. Na závěr upravit pH pufru na 6,8. Uchovávat při 4 °C.

- Sonikační pufr (pH = 8) - 50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF. Nejprve připravit roztok Tris + NaCl + EDTA, upravit na pH = 8, vysterilizovat a uchovávat při 4 °C. Zásobní roztok 1M DTT uchovávat při -20 °C. PMSF rozpouštět v isopropanolu, 100mM zásobní roztok uchovávat při -20 °C.

3.1.4.2. Ostatní komerční kity

Stanovení koncentrace proteinů:

- Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (THERMO SCIENTIFIC, USA)
- 2D Quant Kit (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES, USA)

Příprava vzorků pro 2D elektroforézu:

- ReadyPrep[™] 2-D Cleanup Kit (BIO-RAD, USA)

3.1.4.3. Pufry a roztoky pro polyakrylamidovou elektroforézu

- Vzorkový pufr pro 1D elektroforézu - 1 ml 1M Tris-HCl (pH = 6,8), 1 ml 98% glycerolu, 4,16M močovina, 5% SDS (w/v), 5% DTT (w/v), 2 mg bromfenolové modři. Uchovávat v poměrném množství při -20 °C.

- Vzorkový pufr pro 2D elektroforézu - 7M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS (w/v), 1% amfoliny (pH 3-10) (v/v), 1% DTT (w/v), několik krystalků bromfenolové modři. Uchovávat v poměrném množství při -80 °C.
- Zásobní roztok akrylamidu - 30% akrylamid (w/v), 0,8% bisakrylamid (w/v). Přefiltrovat, uchovávat ve tmě při 4 °C.
- Tris-HCl pufry
 - 0,5M Tris-HCl pH = 6,8 (w/v) - 23,64 g Tris-HCl rozpustit v 150 ml dH₂O, poté upravit pH na 6,8 a doplnit do objemu 300 ml, uchovávat při 4 °C.
 - 1M Tris-HCl pH = 6,8 (w/v) - 47,28 g Tris-HCl rozpustit v 150 ml dH₂O, poté upravit pH na 6,8 a doplnit do objemu 300 ml, uchovávat při 4 °C.
 - 1,5M Tris-HCl pH = 8,8 (w/v) - 130,8 g Tris báze a 66,3 g Tris-HCl rozpustit v 500 ml dH₂O, poté upravit pH na 8,8 a doplnit do objemu 1000 ml, uchovávat při 4 °C.
- 10% SDS (w/v) - k 100 g SDS přidat dH₂O do konečného objemu 1000 ml, uchovávat při pokojové teplotě.
- 10% APS (w/v) - k 0,05 g APS přidat 450 µl dH₂O, připravovat vždy čerstvý.
- 10x koncentrovaný elektrodový pufr (zásobní roztok, pH = 8,3) - 144 g/l glycinu, 0,25M Tris, 1% SDS (w/v). Uchovávat při pokojové teplotě.
- 15mM DTT - 0,024 g DTT rozpustit v 10 ml dH₂O, uchovávat v poměrném množství při -20 °C.
- Ekvilibrační roztok (zásobní roztok) - 50mM Tris-HCl (pH = 6,8), 6M močovina, 30% glycerol (v/v), 2% SDS (w/v). Uchovávat při pokojové teplotě.
- Ekvilibrační roztok s DTT - k 15 ml ekvilibračního roztoku přidat 0,3 g DTT. Připravovat vždy čerstvý.
- Ekvilibrační roztok s IAA - k 15 ml ekvilibračního roztoku přidat 0,375 g IAA a pár krystalků bromfenolové modři. Připravovat vždy čerstvý.
- 0,5% agaróza (w/v) - k 0,1 g agarózy přidat 20 ml 1x elektrodového pufru. Roztok připravovat vždy čerstvý.

3.1.4.4. Roztoky pro barvení gelů koloidní Coomassie Blue

- Fixační roztok (pro fixaci 45 min.) - 50% methanol (v/v), 7% kyselina octová (v/v), uchovávat při pokojové teplotě.
- Barvicí roztok A - 8% orto-fosforečná kyselina (v/v), 40% síran amonný (w/v), uchovávat při pokojové teplotě.
- Barvicí roztok B - 1,2% Coomassie Blue G-250 (w/v), uchovávat při pokojové teplotě, před použitím důkladně promíchat.
- Výsledný barvicí roztok - 20% methanol (v/v), 5% barvicí roztok B (v/v), 20% barvicí roztok A (v/v). Připravovat vždy čerstvý.

3.1.5. Laboratorní vybavení a přístroje

- Mikrokuličky

Skleněné mikrokuličky č. 10, neboli balotina, jsou vyráběny firmou Ornela a.s. se sídlem v Desné v Jizerských horách. Mikrokuličky se využívají jako reflexní aditivum do silničních barev. Námi používané kuličky měly velikost 265-325 µm.

- Laminární box Aura mini (BIOAIR, Itálie)
- UV/Vis spektrofotometr DU[®] 730 Life Science (BECKMAN COULTER, USA)
- Binokulární lupa

Binokulární digitální lupa National (MOTIC Group Co. Ltd., Čína)

- Mikroskopy

Digitální mikroskop Motic BA 300 s fázovým kontrastem (MOTIC Group Co. Ltd., Čína)

Skenovací elektronový mikroskop Aquasem (TESCAN, Česká republika)

Skenovací elektronový mikroskop Vega II LSU (TESCAN, Česká republika)

- Centrifugy

Biofuge A (HERAEUS SEPATECH, Německo)

Centrifuge Z 160 M (HERMLE, Německo)

MiniSpin plus (EPPENDORF, Německo)

Spectrafuge[™] Mini Centrifuge (LABNET, USA)

Universal 320 R (HETTICH, Německo)

- Váhy

Analytické váhy A 200 S (SARTORIUS, Německo)

Přesné váhy 572 (KERN, Německo)

- Kývače, míchače, vortexy

ProBlot™ Rocker 25 (LABNET, USA)

Magnetic stirrer MM5 (POLAMED, Polsko)

Magnetic stirrer 4802-02 (COLE PARMER®, USA)

Shaker Labotron (INFORS HT, Švýcarsko)

Vortex Genie (BENDER & HOBEIN AG, Švýcarsko)

Vortex SA8 (STUART®, Velká Británie)

- Inkubátor AccuBlock™ Digital Dry Bath (LABNET, USA)
- pH metr Seven Easy (METTLER TOLEDO, USA)
- Nastavitelné pipety (GILSON®, USA)
- Ultrasonic homogenizer 4710 Series (COLE PARMER®, USA)
- Vybavení pro elektroforézu

1D electrophoresis Mini-PROTEAN® (BIO-RAD, USA)

Electrophoresis Power Supply EPS 301 (AMERSHAM BIOSCIENCES, Švédsko)

Multiphor II Electrophoresis system (PHARMACIA BIOTECH, Švédsko)

Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL (AMERSHAM BIOSCIENCES, Švédsko)

2-D Casting and Running Systems Investigator™ (GENOMIC SOLUTIONS™, USA)

Scanner Expression 10000 XL (EPSON, USA)

- Počítačový software

Motic Images Plus 2.0 (software pro binokulární lupu a digitální mikroskop)

Quantity One® 4.6.9 (1-D Gel Analysis Software, BIO-RAD)

PDQuest™ 7.1.1 (2-D Gel Analysis Software, BIO-RAD)

3.2. Metody

3.2.1. Metody kultivace

3.2.1.1. Submerzní kultivace *M. smegmatis* a kultivace na pevném médiu

Pro kultivaci v tekutém médiu bylo třeba nejprve napěstovat *M. smegmatis* na pevném médiu. Pro tento typ kultivace byly použity Petriho misky o průměru 9 cm s 25 ml Middlebrook 7H10 Agarů s 0,5% glycerolem. Agar byl inokulován pomocí kličky z glycerolové konzervy (obsah glycerolu 30 %, uchovávání při -80 °C). Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C. Souvislý nárůst byl patrný třetí den. Poté byla kultura přeočkována do 250ml Ehrenmayerovy baňky s 25 ml tekutého média Middlebrook 7H9 Broth s 0,2% glycerolem a 0,05% Tweenem 80[®]. Tween se ke kultuře přidává pro zajištění homogenního planktonického růstu bakterií. Kultura byla kultivována za stálého třepání při 37 °C. Jakmile dosáhla hodnoty OD mezi 1,0 - 1,6 (měřeno při 600 nm), byla předkultura přeočkována do čerstvého tekutého média s konečnou OD 0,1. Po opětovném dosažení OD odpovídající exponenciální fázi bylo možné kulturu použít pro inokulaci dalších submerzních kultur či pro kultivaci plovoucího biofilmu.

3.2.1.2. Kultivace *M. smegmatis* ve formě plovoucího biofilmu

Stěžejní kultivační metodou byla kultivace *M. smegmatis* ve formě plovoucího biofilmu. *Mycobacterium* při takové kultivaci vytváří blanku na povrchu kultivačního média. Kultivace probíhala na Petriho miskách o průměru 6 cm. Na dno misky byly dány 2 ml skleněných mikrokuliček a přidáno 11 ml tekutého média s kulturou. Množství inokula bylo stanoveno tak, aby výsledná OD kultury v kultivačním systému bylo 0,1.

Mikrokuličky bylo nutné před použitím promýt a povařit v 0,1M HCl (v poměru 1:1) a důkladně promýt vodovodní a destilovanou vodou. To, zda byla vymyta veškerá HCl, je možné vyzkoušet přidáním AgNO₃. Pokud se vytvoří zákal, kuličky je nutné nadále promývat. Nakonec byly mikrokuličky vysušeny a vysterilizovány.

Samotná příprava kultivace probíhala následovně. Do sterilní Petriho misky byly nasypány 2 ml skleněných kuliček a přidáno přibližně 10 ml tekutého média (přesná korekce množství dle nárůstu inokula). Dané množství inokula pak bylo pipetou nakapáno na hladinu média. Misky byly uloženy do skleněného boxu, který nebyl hermeticky uzavřen a kde byla vysoká vzdušná vlhkost, aby nedocházelo k vysychání média v miskách. Kultivace probíhala staticky bez třepání při 37 °C, dle typu vzorku 8, 18, 24 a 30 hodin.

3.2.2. Mikroskopie

3.2.2.1. Binokulární lupa

Binokulární lupa National byla používána pro morfologické studie plovoucího biofilmu *M. smegmatis* při sledování vývoje v čase. Biofilm byl pozorován dvojitým způsobem, buď jako nativní biofilm, nebo bylo injekční stříkačkou odsáto médium a pozorován biofilm spadlý na skleněné mikrokuličky. Pro lepší vizualizaci bylo možné biofilm obarvit methylenovou modří.

3.2.2.2. Optická mikroskopie

Digitální mikroskop Motic byl používán pro vyloučení kontaminace kultury z jednotlivých kultivací plovoucího biofilmu. Část kultury z hladiny média byla sebrána kličkou a byl připraven preparát na podložním skle. Obarvení methylenovou modří v tomto případě nebylo nutné.

3.2.2.3. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Metoda skenovací elektronové mikroskopie byla využívána pro morfologickou analýzu plovoucího biofilmu. Vzorky byly připraveny třemi různými způsoby. V prvním případě byl plovoucí biofilm kultivován na malých skleněných mističkách o průměru 2 cm. Na dno sterilních mističek byl sterilně nasypán 1 ml skleněných mikrokuliček a přidány 2 ml média s kulturou. Množství inokula bylo stanoveno tak, aby výsledné OD kultury v kultivačním systému bylo 0,1 a inokulum bylo nakapáno na hladinu média. Kultivace vzorků probíhala dle typu vzorku 8, 18, 24 a 30 hodin. Po

ukončení kultivace bylo z misek odsáto injekční stříkačkou médium tak, že biofilm vytvořený na hladině spadl na kuličky a jeho lícovou stranu tak bylo možné pozorovat pod elektronovým mikroskopem. V dalších případech byl plovoucí biofilm kultivován běžným způsobem. V daných časech byl pak připraven vzorek pro SEM tak, že pomocí malého (speciálně připraveného) podložního sklíčka byl biofilm podebrán, čímž byl připraven vzorek pro pozorování lícové strany plovoucího biofilmu. Pro pozorování rubové (spodní) strany biofilmu bylo sklíčko přiloženo k hladině s biofilmem a následně rychle otočeno tak, že výsledkem byl biofilm přichycený na sklíčko lícovou stranou (SITAŘOVÁ 2011).

Vzorky byly dále zpracovány podle Kofroňové *et al.* (KOFROŇOVÁ *et al.* 2002) s tím, že se nevyužívala imobilizace nízkoutuhnoucí agarózou. Vzorky byly fixovány v exsikátoru parami 2% OsO₄ po dobu alespoň 1 týdne. Po dehydrataci alkoholem mohly být preparáty pozorovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu Aquasem (TESCAN, Česká republika) při 15 kV. Pozorování plovoucího biofilmu na sklíčko bylo provedeno ve skenovacím elektronovém mikroskopu Vega II LSU (TESCAN, Česká republika) při 20 kV.

3.2.3. Izolace proteinů

Po ukončení kultivace plovoucího biofilmu byla injekční stříkačkou odsáta vrstva média, čímž biofilm vytvořený na jeho povrchu spadl na kuličky. Poté bylo do každé misky přidáno 0,5 ml Qproteome[®] Bacterial Protein Prep Kitu a 2,5 μl Complete[™]. Qproteome[®] kit obsahuje lyzační pufr, benzonázu a lysozym a Complete[™] je inhibitor proteáz. Obsah misky byl důkladně promíchán, miska zaparafilmována a uložena do -20 °C pro další zpracování.

V případě rozbíjení buněk sonikací nebylo médium odsáto, ale kopíčkem byl sebrán biofilm z hladiny média a přenesen do ependorfky. Vzorek byl omyt fosfátovým pufrem a uložen do -20 °C. Před rozbíjením byla kultura zcentrifugována (5 min/9000 rpm/4 °C), supernatant slit a sediment resuspendován v sonikačním pufru. Sonikace probíhala na ledu v 8 cyklech po 30 sekundách, mezi každým cyklem byl vzorek 1 minutu inkubován na ledu. Po sonikaci byl vzorek zcentrifugován, aby se odstranily rozbité buňky (10 min/5000 rpm/4 °C), supernatant byl odpipetován a byl

změřen jeho objem. Ke vzorku byla přidána 50% TCA v konečné koncentraci 6 % (v/v) a vzorek byl inkubován minimálně 1 hodinu na ledu.

Před rozbíjením buněk třením nebo vortexem bylo nutné misky z mrazáku vyndat a nechat samovolně rozmrazat. Další postup se lišil podle způsobu rozbíjení buněk. V případě rozbíjení třením byl obsah misek i s kuličkami přelit do třecí misky a Petriho misky důkladně opláchnuty lyzačním pufrem. V jedné třecí misce bylo možné třít maximálně obsah ze 4 misek. Kultura byla třena na ledu 3 x 6 min. Poté byl obsah třecí misky převeden do 50ml centrifugační kónické zkumavky. V případě rozbíjení buněk vortexováním byl obsah misek i s kuličkami přelit do skleněné tlustostěnné zkumavky a misky byly důkladně opláchnuty lyzačním pufrem. Poměr kuliček a tekutiny ve zkumavce byl upraven tak, aby se vortexoval celý obsah zkumavky, přibližně na 1:2. Vortexování probíhalo v 10 cyklech po 30 sekundách, mezi každým cyklem byla zkumavka 1 minutu inkubována na ledu. Po dokončení byl obsah zkumavky převeden do 50ml centrifugační kónické zkumavky.

Od tohoto kroku již byl postup izolace proteinů třením nebo vortexováním shodný. Vzorky byly zcentrifugovány (5 min/5000 rpm/4 °C), aby se odstranily kuličky a zbytky rozbitých buněk. Supernatant byl po stočení odpipetován, kuličky byly znovu promyty 5 ml lyzačního pufru a opět zcentrifugovány (5 min/5000 rpm/4 °C). Supernatant byl přidán k předchozímu supernatantu a oba byly zcentrifugovány (10 min/5000 rpm/4 °C). Poté byl supernatant odpipetován a byl změřen jeho objem. Ke vzorku byla přidána 50% TCA v konečné koncentraci 6 % (v/v) a vzorek byl inkubován na ledu minimálně 1 hodinu.

Od inkubace vzorků s TCA je další postup shodný pro všechny tři metody rozbíjení buněk. Vzorek byl zcentrifugován (15 min/9000 rpm/4 °C), supernatant slit a sediment opláchnut 1 ml ledového ethanolu. Po opětovné centrifugaci (10 min/9000 rpm/4 °C) a slítí supernatantu byl vzorek rozpuštěn v ddH₂O a přesrážen v trojnásobném množství ledového acetonu. V acetonu byl vzorek inkubován přes noc při -20 °C. Druhý den byla provedena centrifugace (10 min/9000 rpm/4 °C), aceton byl odpipetován a jeho zbytky se nechaly odtékat. Poté byl ke vzorku přidán fosfátový pufr a vzorek byl řádně solubilizován. V této fázi bylo možné vzorek uschovat při -80 °C pro pozdější stanovení množství proteinů.

Před 2D elektroforézou byl vzorek pročištěn pomocí ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kitu, aby byl zbaven nečistot a možných interferujících látek. Množství proteinů, které bylo pročištěno, bylo stanoveno komerčním Pierce® BCA Protein Assay Kitem (Pierce).

Po pročištění byl vzorek již rozpuštěn v 2D vzorkovém pufru a 1 hodinu byl solubilizován při pokojové teplotě. Protože během pročištění docházelo ke ztrátám proteinů, konečné množství bylo poté přeměřeno pomocí 2D Quant kitu.

3.2.4. Metody stanovení koncentrace proteinů

3.2.4.1. Pierce[®] BCA Protein Assay Kit

Tato metoda stanovení proteinů využívá redukci Cu^{2+} na Cu^{1+} proteinem v alkalickém médiu. Následně dochází k reakci s kyselinou bicinchoninovou (bicinchoninic acid, BCA), která kompletuje měďné ionty. Produkt reakce vzniká chelatací dvou molekul BCA a měďným iontem. Reakce je kolorimetricky detekovatelná díky vzniku fialově zbarveného komplexu. Tento ve vodě rozpustný komplex vykazuje absorpenci při 562 nm. Koncentrace proteinů je pak stanovena podle standardní kalibrační křivky s BSA (bovine serum albumin).

3.2.4.2. 2D Quant Kit

Měření koncentrace proteinů touto metodou je vhodné pro vzorky rozpuštěné ve vzorkovém pufru s močovinou a dalšími interferujícími látkami, které běžné stanovení koncentrace bílkovin neumožňují. Tato poměrně nákladná metoda se tedy hodí pro přesné stanovení nanášky proteinů na 2D elektroforézu. Metoda funguje na principu kvantitativní precipitace proteinů, zatímco interferující látky zůstávají v roztoku. Analýza je založena na specifické vazbě iontů mědi na protein. Precipitované proteiny jsou resuspendovány v roztoku obsahujícím měď a nenavázaná měď je pak kolorimetricky měřena při 480 nm. Naměřená absorbance je nepřímě úměrná koncentraci proteinů, která je stanovena podle standardní kalibrační křivky s BSA.

3.2.5. Jednorozměrná elektroforéza (1-DE)

Jednorozměrná elektroforéza byla využívána pro rychlou detekci účinnosti různých způsobů rozbíjení buněk a především pro kontrolu kvality a koncentrace vzorků před náročnější dvojrozměrnou elektroforézou. Byla využita SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE) podle Laemmliho (LAEMMLI 1970). Při 1-DE dochází k rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti. Separační gel obsahoval polyakrylamid v 10% koncentraci, zaostřovací gel měl koncentraci 4 %. Dané koncentrace byly pro mé využití dostačující. Následující rozpisy jsou pro přípravu 1 mm gelů.

Rozpis na 20 ml 10% separačního gelu:

ddH ₂ O	7,87 ml
30% polyakrylamid	6,67 ml
1,5M Tris-HCl (pH=8,8)	5,07 ml
10% SDS	0,2 ml
10% APS	0,2 ml
TEMED	8 μl

Rozpis na 4 ml 4% zaostřovacího gelu:

ddH ₂ O	2,44 ml
30% polyakrylamid	532 μl
0,5M Tris-HCl (pH=6,8)	1 ml
10% SDS	40 μl
10% APS	20 μl
TEMED	4 μl

Po sestavení byla aparatura Mini-PROTEAN[®] naplněna 1x koncentrovaným elektrodovým pufrem. Vzorky byly před nanesením solubilizovány v 1D vzorkovém pufre v poměru 1:1 při 95°C po dobu 5 minut. V případě provádění 1-DE jako kontroly před 2-DE byly vzorky již solubilizované v 2D vzorkovém pufre, proto po naředění s 1D vzorkovým pufrem v poměru 1:1 nebyly již při 95°C solubilizovány. Do jedné jamky bylo naneseno maximálně 20 μl vzorku v požadované koncentraci. Samotná elektroforéza běžela přibližně 2 hodiny, nejprve se zdrojem nastaveným na 10 mA na

gel, po průchodu čela zaostřovacím gelem byl zdroj nastaven na 20 mA na gel. Po doběhnutí elektroforézy byla aparatura rozebrána a gel byl za stálého třepání fixován 45 minut ve fixačním roztoku. Poté byl přes noc třepán v barvicím roztoku koloidní CBB a následně byl odbarven promýváním ddH₂O.

3.2.6. Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Dvojrozměrná elektroforéza je vysoko-rozlišovací technika pro separaci proteinů. Je velmi vhodná pro charakterizaci komplexních směsí proteinů před jejich identifikací pomocí hmotnostní spektrometrie. Je proto jednou z významných proteomických metod. Umožňuje nám získat představu o složení proteomu za daných fyziologických podmínek. 2-DE spojuje isoelektrickou fokusaci (IEF) v prvním rozměru a polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v přítomnosti SDS v druhém rozměru. Během IEF dochází k rozdělení proteinů podle jejich isoelektrického bodu (pI) a během SDS-PAGE dochází k jejich rozdělení podle molekulové hmotnosti. Při práci byl dodržován protokol dle Bjellqvista (BJELLQVIST 1993).

3.2.6.1. Isoelektrická fokusace

Před samotnou 2-DE je nutné vzorek solubilizovat minimálně 1 hodinu ve vzorkovém pufru při pokojové teplotě. Pro IEF byly používány komerční IPG stripy (imobilizied pH gradient) o délce 18 cm a s lineárním pH gradientem v rozmezí 4-7 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES, USA). Rehydratace stripu se vzorkem probíhala ve speciální vaničce při pokojové teplotě přes noc. Pro zabránění vysychání byly stripy převrstveny minerálním olejem.

Po rehydrataci následovalo dělení v prvním rozměru, který probíhá horizontálně v zařízení Multiphor II Electrophoresis system. IEF probíhá při 20 °C a byl vybrán následující program na zdroji napětí, který vyhovoval našim požadavkům:

	Napětí	Proud	Energie	Výkon	Čas
Krok 1	150 V	1 mA	5 W	1 Vh	
Krok 2	150 V	1 mA	5 W	300 Vh	2 hod
Krok 3	300 V	1 mA	5 W	1 Vh	
Krok 4	300 V	1 mA	5 W	600 Vh	2 hod
Krok 5	3500 V	1 mA	5 W	10 kVh	5 hod
Krok 6	3500 V	1 mA	5 W	60 kVh	17,1 hod
TOTAL				70900 Vh	26,1 hod

Po ukončení IEF je možné stripy se vzorky uchovat při -20 °C po dobu několika týdnů (např. v Petriho miskách). Pokud se ihned pokračuje druhým rozměrem, stripy se opláchnou ddH₂O od minerálního oleje a dají se ekvilibrovat.

3.2.6.2. SDS polyakrylamidová elektroforéza

Před samotnou SDS-PAGE je nutné bílkoviny nejprve převést do pufrů vhodných pro SDS separaci. Tento proces se nazývá ekvilibrace a bílkoviny se převádí do redukčních (ekvilibračních) pufrů. Ekvilibrace probíhá nejprve v ekvilibračním pufru s DTT, který působí jako redukční činidlo (redukuje disulfidické můstky) a poté v pufru s IAA, který působí jako alkylační činidlo. Každý strip se ekvilibruje v 15 ml pufru po dobu 10 minut. Po ekvilibraci je strip přiložen na horní hranu deskového gelu pro druhý rozměr.

Byl používán separační deskový gel v konečné koncentraci 12,5 % podle následujícího rozpisu:

Rozpis na 420 ml 12,5% separačního gelu (6 gelů):

dH ₂ O	135 ml
30% polyakrylamid	174 ml
1,5M Tris-HCl (pH=8,8)	105 ml
10% SDS	4,2 ml
10% APS	1,05 ml
TEMED	210 μl

Pro nalévání gelů i průběh druhého rozměru bylo využíváno zařízení 2-D Casting and Running Systems InvestigatorTM (GENOMIC SOLUTIONSTM, USA). Strip zasunutý mezi skla s 2D gelem byl zalit 0,5% agarózou. Po ztuhnutí agarózy byly gely (5 ks) sestaveny do zařízení pro elektroforézu, k nim bylo nalito 10 litrů spodního elektrodového pufru (koncentrace 1x) a 3 litry vrchního elektrodového pufru (koncentrace 2x), který musí být předem vychlazený. Během celého procesu se aparatura chladí na 15 °C. Samotná elektroforéza běžela přibližně 4 - 4,5 hodiny. Elektrický zdroj pro elektroforézu je naprogramovaný na výkon 20 000 mW na gel, napětí se během elektroforézy postupně zvyšuje od 240 V až na maximálních 500 V.

Po doběhnutí elektroforézy byla aparatura rozebrána a gely byly za stálého třepání 45 minut fixovány ve fixačním roztoku. Poté byly přes noc třepány v barvicím roztoku koloidní CBB a následně odbarveny promýváním ddH₂O.

3.2.7. Digitalizace a počítačová analýza gelů

Vybrané jednorozměrné či dvojrozměrné gely byly naskenovány pomocí skeneru Expression 10000 XL (EPSON, USA). Pro hodnocení bylo nutné gely oskenovat v černobílém provedení. Gely bylo možné uložit ve formátu „tiff“, který je kompatibilní se softwarem pro výsledné hodnocení.

Pro hodnocení 1D gelů byl využíván program Quantity One[®] 4.6.9, díky kterému bylo možné snadno porovnat množství proteinů u nanášek jednotlivých vzorků. Pro hodnocení 2D gelů byl využíván program PDQuestTM 7.1.1, jehož pomocí lze

gelové obrazy kvantifikovat a porovnávat. V tomto programu byla provedena jak kvalitativní, tak kvantitativní analýza proteomů. Program zahrnuje i možnost statistického hodnocení, které umožňuje definované vyloučení odlehlých hodnot a odstranění větších rozdílů ve skupinách gelů.

4. VÝSLEDKY

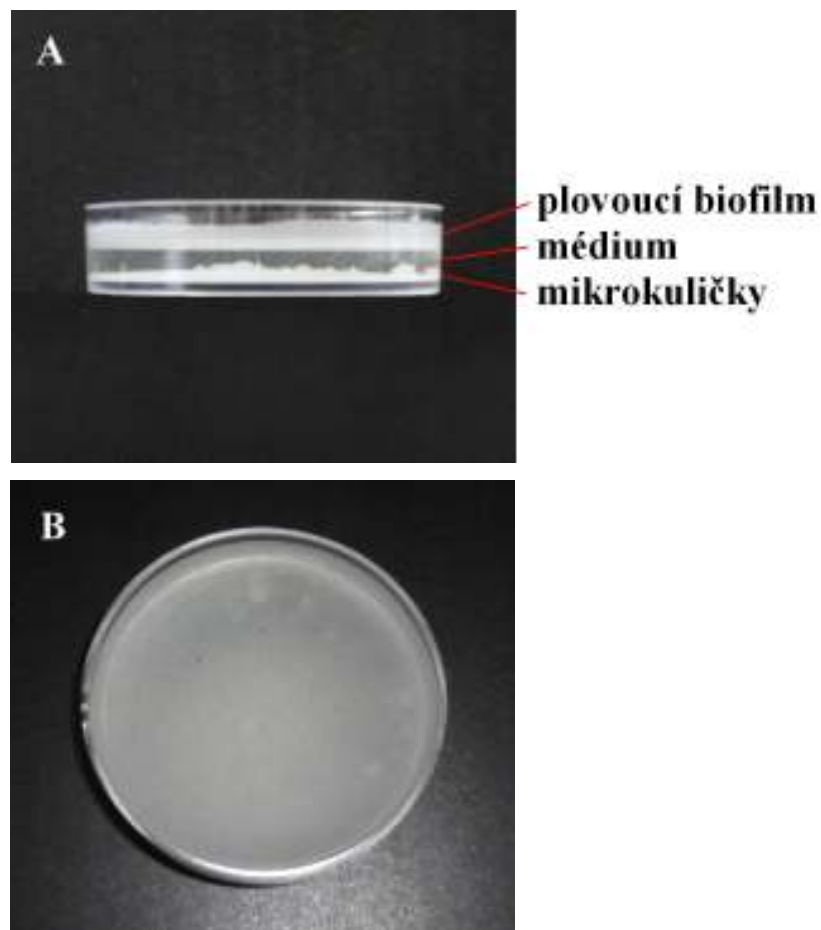
4.1. Morfologická analýza plovoucího biofilmu *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis je jeden z druhů mykobakterií, které ve svém přirozeném prostředí vytváří mnohobuněčné útvary zvané biofilmy. To, že je *M. smegmatis* schopna tvořit biofilm i v laboratorních podmínkách, ukázala ve své práci i B. Sitařová, která se v naší laboratoři věnovala biofilmům rostoucím na skleněných a zirkoniových kuličkách (SITAŘOVÁ 2011). Mimo jiné také poukázala na to, že *M. smegmatis* utváří plovoucí biofilm na hladině kultivačního média.

Prvním cílem mého studia plovoucího biofilmu *M. smegmatis* byla jeho morfologická analýza. Mým záměrem bylo zachytit a analyzovat především prvotní stádia tvorby biofilmu, tedy dobu, kdy dochází ke kohezi buněk mezi sebou a tvorbě souvislého jednovrstevného biofilmu a dále k rozvoji biofilmu až k vytvoření tlusté mnohobuněčné vrstvy. Na základě experimentů byly zvoleny odběrové časy pro studium biofilmu po 8, 18, 24 a 30 hodinách od počátku kultivace. Biofilm byl kultivován na Petriho miskách, staticky, ve vlhké komůrce, při kultivační teplotě 37 °C (viz. Kap. 3.2.1.2.).

Na Obr. 10 je znázorněn způsob kultivace plovoucího biofilmu. Kultivační systém je tvořen Petriho miskou, na jejímž dně jsou skleněné mikrokuličky. Kuličky jsou převrstveny kultivačním médiem, na jehož povrchu se tvoří pouhým okem viditelná vrstva plovoucího biofilmu.

Pro morfologickou analýzu byla využita metoda pozorování pod binokulární lupou National a pro studium detailní struktury skenovací elektronová mikroskopie (SEM).



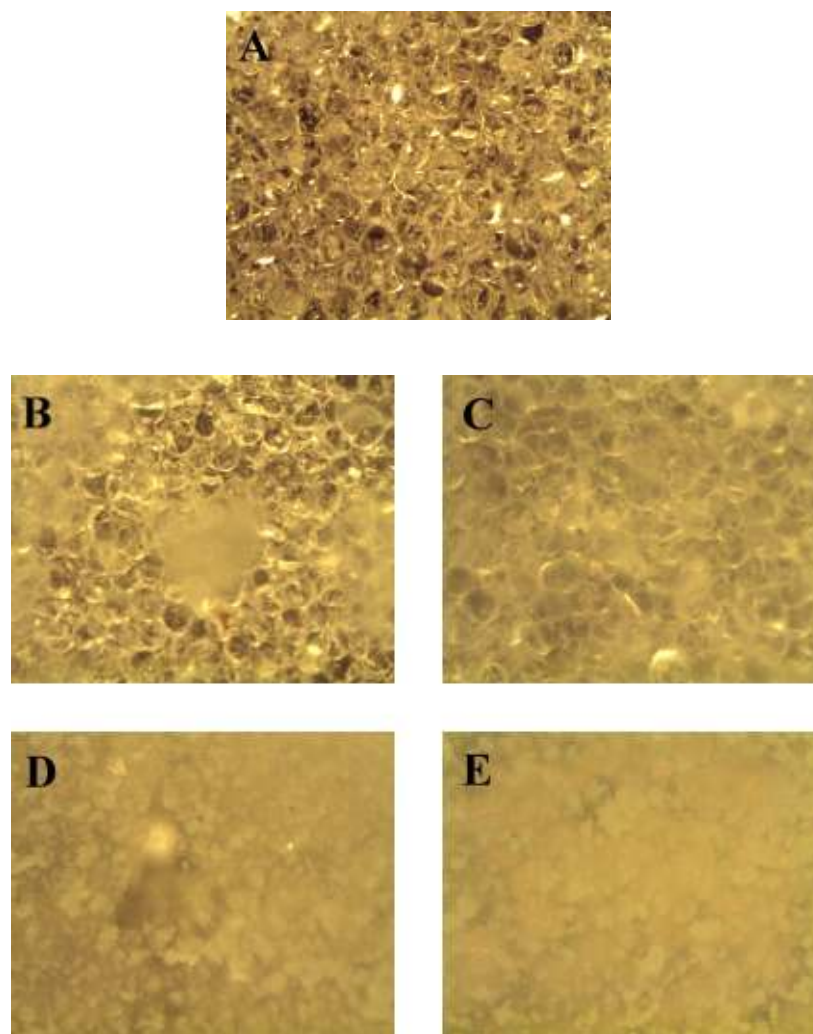
OBR. 10 - Kultivační systém plovoucího biofilmu. A - kultivace plovoucího biofilmu, pohled ze strany; B - kultivace plovoucího biofilmu, pohled ze shora.

4.1.1. Pozorování tvorby plovoucího biofilmu v čase pod binokulární lupou

Binokulární lupou bylo pozorováno, jakým způsobem se plovoucí biofilm na hladině média utváří. Biofilm byl prohlížen ve všech časech odběrů, nativní (viz Obr. 11) a posléze i obarvený methylenovou modří (data nejsou prezentována). Nejprve byl pozorován tak, jak byl kultivován, tedy na hladině (viz Obr. 11), poté bylo médium odsáto injekční stříkačkou a biofilm se nechal spadnout na kuličky (data nejsou prezentována).

Jak je vidět na Obr. 11, v 8. hodině se na hladině začínají utvářet jakási „nukleační centra“, tedy shluky buněk, které se postupně rozrůstají do prostoru. Z obrázků je patné, že tato centra zůstávají zachována i v pozdějších stádiích vývoje, v době, kdy je biofilm tvořen již silnější vrstvou buněk. Okolo 18. hodiny dochází

k postupnému splývání nukleačních center a ve 24. hodině je už vytvořena souvislá vrstva. Biofilm je v této fázi velmi stabilní a nesmáčivý. Jak je vidět na Obr. 11-D, při jeho mechanickém porušení nedochází k propadnutí buněk ke dnu, ale stále drží na hladině média. Zdá se, že od 24. hodiny již biofilm pouze zesiluje, ve 30. hodině je vytvořena velmi silná vrstva buněk.

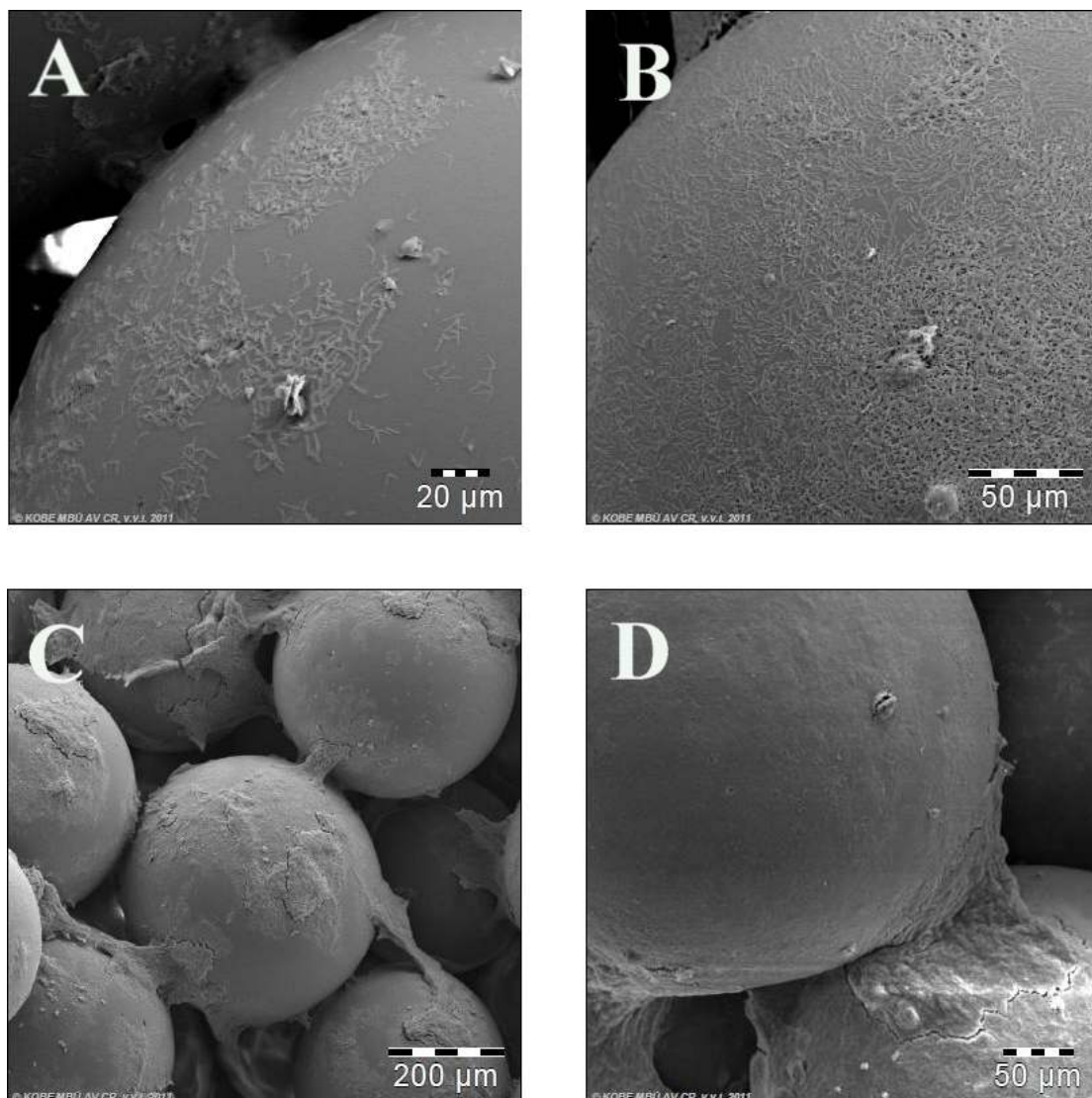


OBR. 11 - Plovoucí biofilm pod binokulární lupou. A - čisté skleněné mikrokuličky, B - biofilm po 8 h, C - biofilm po 18 h, D - biofilm po 24 h, uprostřed je biofilm mechanicky poškozený, E - biofilm po 30 h. Čisté kuličky jsou převrstveny kultivačním médiem, biofilm je pozorovaný na hladině média, nativní. Foceno digitální binokulární lupou National, zvětšení 30x.

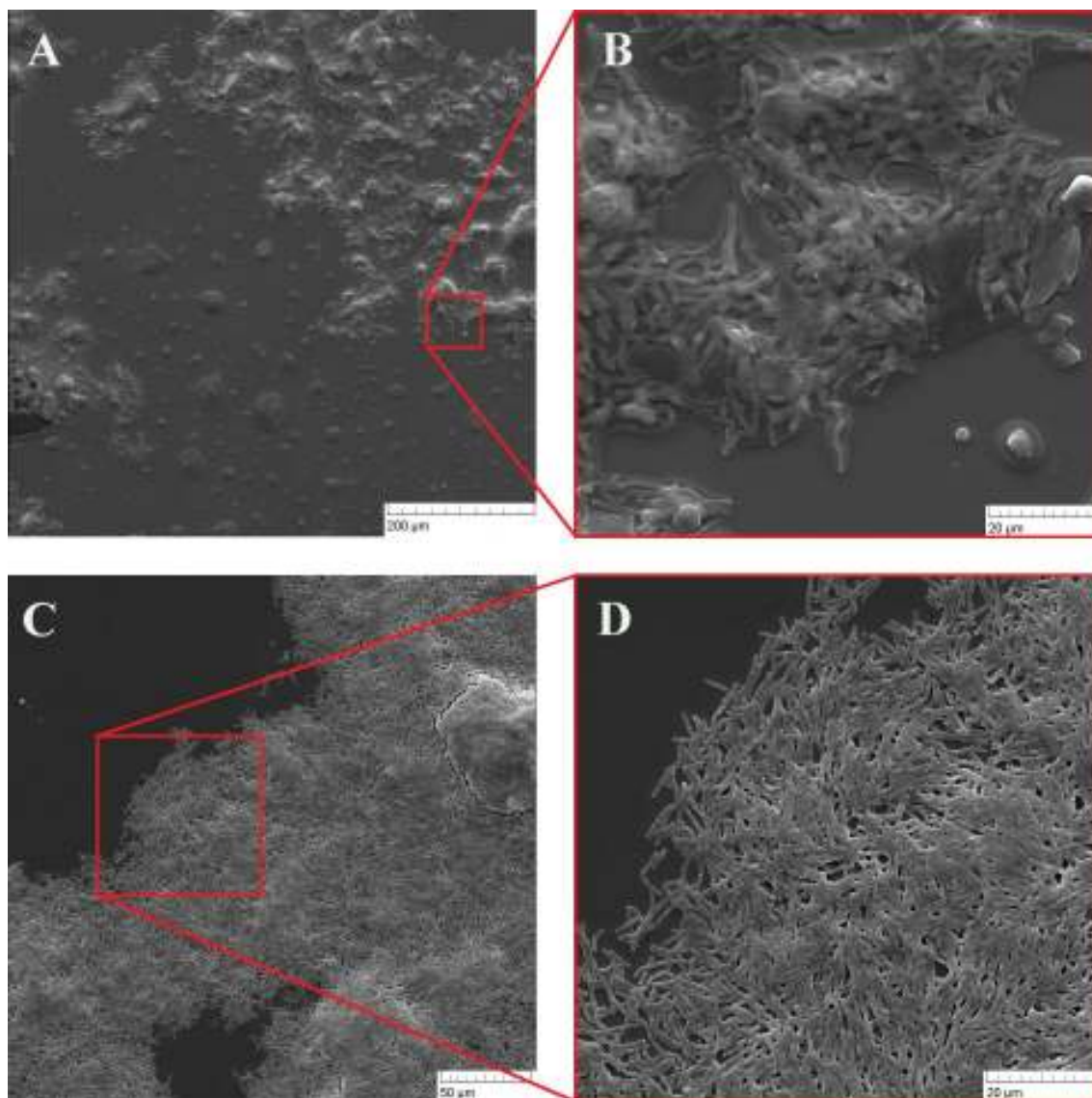
4.1.2. Morfologická analýza pomocí skenovací elektronové mikroskopie

Pro detailní analýzu morfologie plovoucího biofilmu byla využita SEM. Bylo připraveno několik druhů preparátů, aby bylo co nejlépe zachyceno, jakým způsobem se biofilm v čase tvoří. Nejprve byl pozorován plovoucí biofilm spadlý na kuličky díky odsátí kultivačního média ze systému. Obr. 12 potvrzuje fakt, že okolo 8. hodiny se začínají utvářet „nukleační centra“, která se postupně rozšiřují do okolí. V místech těchto shluků začíná biofilm okolo 18. hodiny sílit a ve 24. hodině je již tvořen více vrstvami. Ve 30. hodině se pak tvoří jednolitá vrstva buněk.

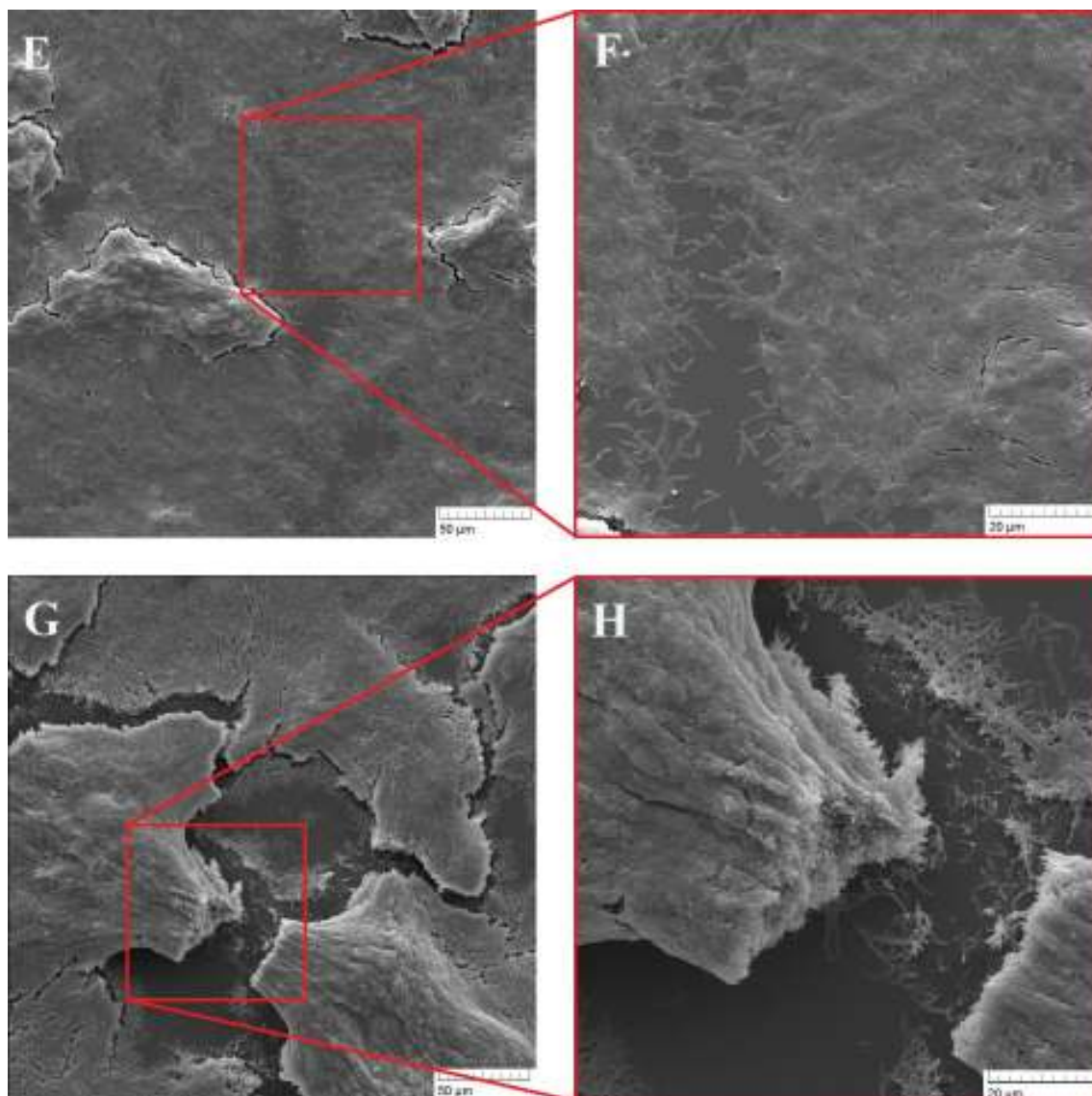
Druhým způsobem přípravy plovoucího biofilmu pro pozorování v elektronovém mikroskopu s vyšším rozlišením bylo využití speciálně připraveného tenkého sklíčka, kdy byla možnost se podívat jak na lícovou, tak i na rubovou stranu biofilmu. Preparáty byly připraveny postupem popsáným v Kap. 3.2.2.3. Na Obr. 13 a Obr. 14 jsou fotografie z pozorování lícové strany. Obr. 13 zachycuje utváření biofilmu v 8. a 18. hodině, Obr. 14 ve 24. a 30. hodině. Z obrázků jsou patrné výše zmíněné skutečnosti z vývoje biofilmu, tedy to, že v počátečních fázích vývoje biofilmu jsou viditelné jednotlivé shluky buněk, ze kterých postupně vzniká souvislá vrstva, která je ve 30. hodině velmi silná. Obrázky zachycují také to, že v počátečních fázích tvorby se buňky jeví spíše jako myceliální vlákna, zatímco biofilm po 30-ti hodinách kultivace je tvořen spíše jednotlivými buňkami. Detailněji je tato skutečnost vidět na Obr. 15 (rub), na kterém je zachyceno porovnání morfologie buněk v 8. a 30. hodině.



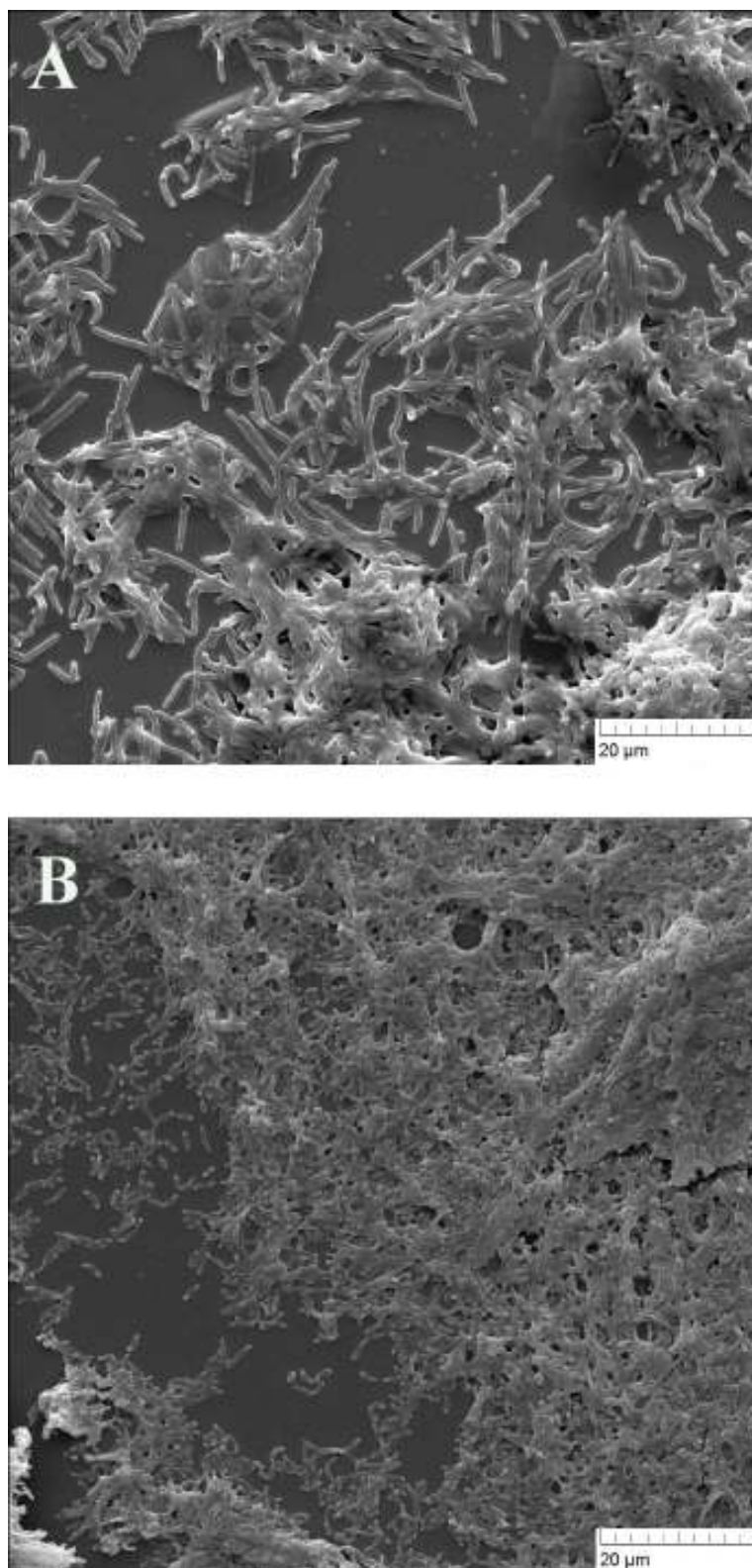
OBR. 12 - SEM plovoucího biofilmu spadlého na kuličky. A - biofilm po 8 h; B - biofilm po 18 h; C - biofilm po 24 h; D - biofilm po 30 h. Pozorováno ve skenovacím elektronovém mikroskopu Aquasem (TESCAN, Česká republika), po odsátí média z kultivačního systému.



OBR. 13 - SEM lícové strany plovoucího biofilmu (sklíčko). **A** - biofilm po 8 h, zvětšení 600x, **B** - biofilm po 8 h, zvětšení 4500x, **C** - biofilm po 18 h, zvětšení 1500x, **D** - biofilm po 18 h, zvětšení 4500x. Pozorováno ve skenovacím elektronovém mikroskopu Vega II LSU (TESCAN, Česká republika).



OBR. 14 - SEM lícové strany plovoucího biofilmu (sklíčko). E - biofilm po 24 h, zvětšení 1500x, F - biofilm po 24 h, zvětšení 4500x, G - biofilm po 30 h, zvětšení 1500x, H - biofilm po 30h, zvětšení 4500x. Pozorováno ve skenovacím elektronovém mikroskopu Vega II LSU (TESCAN, Česká republika).



OBR. 15 - SEM rubové strany plovoucího biofilmu (sklíčko). A - biofilm po 8 h; B - biofilm po 30 h. Pozorováno ve skenovacím elektronovém mikroskopu Vega II LSU (TESCAN, Česká republika) se zvětšením 4500x.

4.2. Proteomová analýza plovoucího biofilmu *Mycobacterium smegmatis*

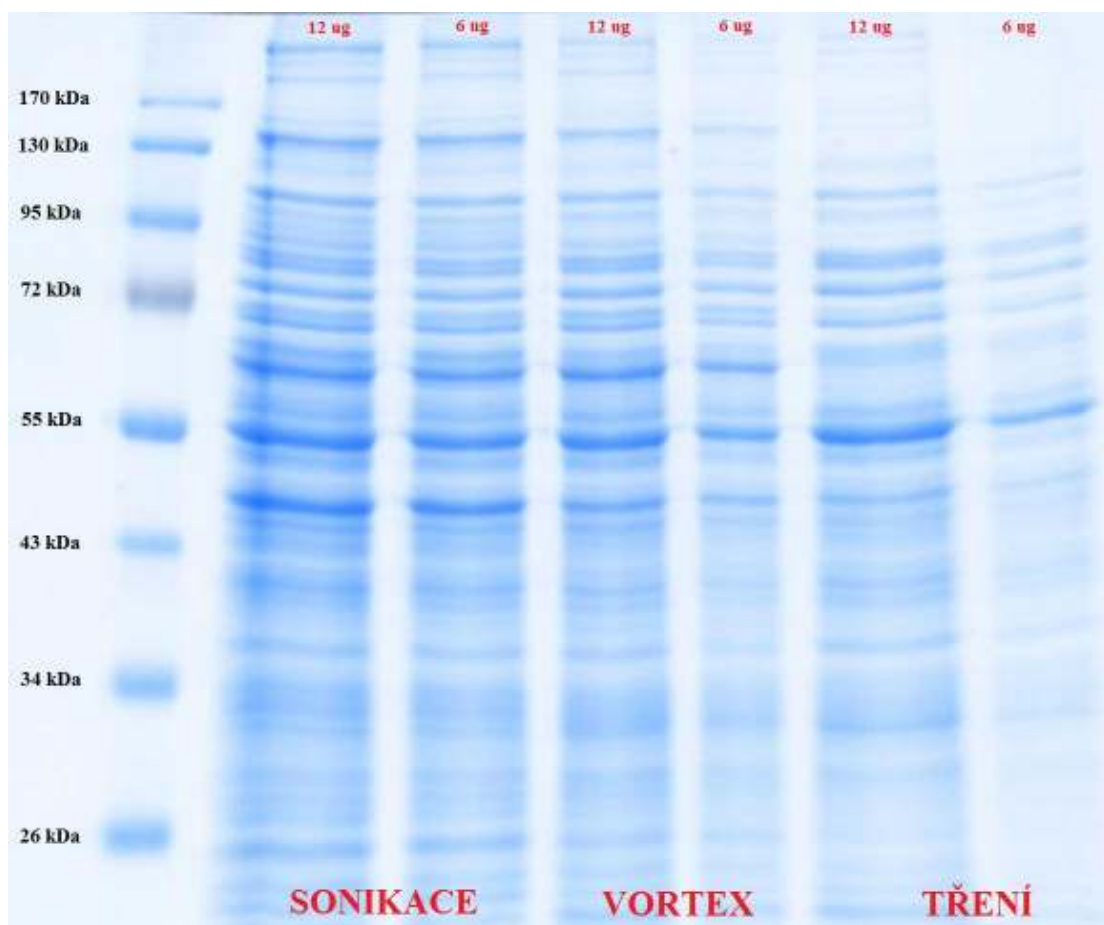
4.2.1. Porovnání metod izolace proteinů

Na morfologickou analýzu bylo navázáno analýzou proteomů, tedy souborů proteinů, které byly syntetizovány za daných fyziologických podmínek. Jako úvodní experiment bylo provedeno srovnání tří způsobů rozbíjení buněk, a to pomocí sonikace, třením v třecí misce se skleněnými mikrokuličkami a rozbíjením mikrokuličkami v tlustostěnné zkumavce na vortexu. Cílem bylo vybrat nejvhodnější a nejefektivnější způsob rozbíjení buněk použitelný pro izolaci proteinů z plovoucího biofilmu a jejich následné rozdělení pomocí 2D elektroforézy. Hlavním důvodem bylo to, že u biofilmu z 8. hodiny je k dispozici velice málo materiálu z jedné misky. Proto bylo třeba zvolit co nejefektivnější způsob izolace zajišťující co nejmenší ztráty. Pro experiment byl použit biofilm kultivovaný 24 hodin. Izolace proteinů byla provedena dle postupu popsaného v Kap. 3.2.3. Po izolaci byla změřena přibližná koncentrace proteinů komerčním Pierce[®] BCA Protein Assay Kitem. Samotné porovnání metod bylo provedeno pomocí 1D elektroforézy. Od každého vzorku bylo nanášeno 12 a 6 µg izolovaných proteinů (viz Obr. 16).

Jak je z gelu patrné, nejúčinnější metodou rozbíjení buněk je sonikace. Její použití je ovšem pro izolaci buněk z plovoucího biofilmu nevhodné díky skleněným mikrokuličkám v daném kultivačním systému. Pro tuto metodu je nutné biofilm z hladiny média sebrat kopíčkem, což není u raného biofilmu z 8. hodiny technicky možné. Navíc díky povrchovým vlastnostem biofilmu je obtížné biofilm efektivně převést do mikrozkuvky. Sonikace je tedy vhodnou metodou pro rozbíjení buněk například ze submerzní kultury či z kultivací bez mikrokuliček.

Jako druhou nejúčinnější metodou je izolace bílkovin vortexováním. Touto metodou lze izolovat proteiny z kultivačních systémů s mikrokuličkami, přičemž se právě kuliček využívá k lepšímu rozbití buněk. Metoda není technicky náročná a kvalita vzorku je srovnatelná se sonikací (viz Obr. 16). Rozbíjení buněk třením kultury s mikrokuličkami v třecí misce je nejméně vhodná. Metoda je náročná na čas a jak je vidět na gelu, v porovnání s dvěma výše zmíněnými metodami je výtěžek proteinů kvalitativně mnohem horší.

Pro následné proteomové experimenty byla použita metoda rozbíjení buněk mikrokuličkami pomocí vortexu.

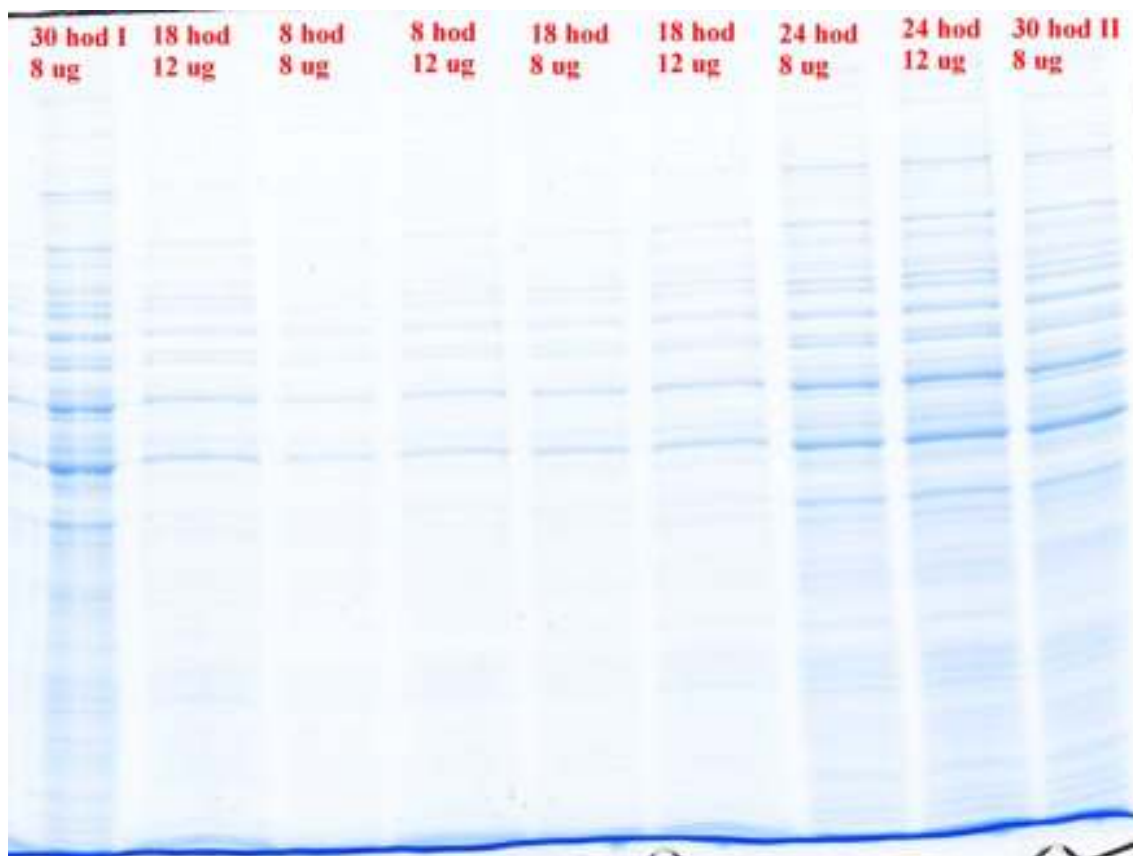


OBR. 16 - Srovnání metod rozbíjení buněk, znázornění na gelu z 1D elektroforézy. Gel je obarvený koloidní CBB. V levé části obrázku je znázorněn marker, v horní části je uvedeno nanesené množství proteinů (koncentrace proteinů změřená pomocí Pierce).

4.2.2. Stanovení koncentrace proteinů před 2D elektroforézou

Pro získání vypovídajících výsledků z 2D elektroforézy (2-DE) bylo nutné přesné stanovení koncentrace proteinů před nanáškou na 1. rozměr 2-DE. Na počátcích experimentů bylo provedeno stanovení koncentrace izolovaných proteinů pomocí Pierce[®] BCA Protein Assay Kitu. Vzorky bylo však nutné ještě před 2-DE pročistit použitím ReadyPrep[™] 2-D Cleanup Kitu, aby se odstranily nečistoty a případné interferující látky. Během pročištění ale docházelo ke ztrátám proteinů, tudíž vstupní koncentrace již neodpovídaly a nanášky na 2-DE tak byly nepřesné. Proto byla zavedena metoda stanovení koncentrace proteinů pomocí 2D Quant kitu, kdy jsou již proteiny úplně rozpuštěny ve vzorkovém pufru s močovinou a připraveny pro 2-DE. Tato běžně fungující metoda fungovala i u řady experimentů, kdy byla měřena koncentrace proteinů např. ze submerzní kultury či z nárůstů na plotnách (RAMANIUK, osobní sdělení). V případě plovoucího biofilmu ale tato metoda nepomohla a množství proteinů na 2D gelech se stále lišila. Proto byla využita k ověřování koncentrace proteinů před 2-DE jednorozměrná elektroforéza. Výsledný 1D gel byl poté hodnocen v programu Quantity One[®].

Jak je patrné z Obr. 17, s pomocí 2D Quant kitu nebylo možné měřit koncentrace proteinů přesně. Hlavně u vzorků z 8. a 18. hodiny došlo k výraznému nadhodnocení koncentrace oproti skutečnosti. Po srovnávací analýze intenzit bandů ve sloupcích na gelu pomocí programu Quantity One[®] byly přizpůsobeny jednotlivé nanášky na 2D elektroforézu. Ty se pohybovaly v rozmezí mezi 250 μg (30 hod) až 1200 μg proteinů (8 hod) podle výsledků změřené koncentrace bílkovin. Reálná nanáška podle korekce byla 200 μg na gel.



OBR. 17 - Kontrola koncentrace proteinů před 2D elektroforézou. Na obrázku je gel z 1D elektroforézy. Koncentrace proteinů byla změřena 2D Quant kitem, poté bylo nanášeno množství proteinů uvedené v horní části obrázku. Obarveno koloidní CBB.

4.2.3. Proteomová analýza vývoje plovoucího biofilmu v čase

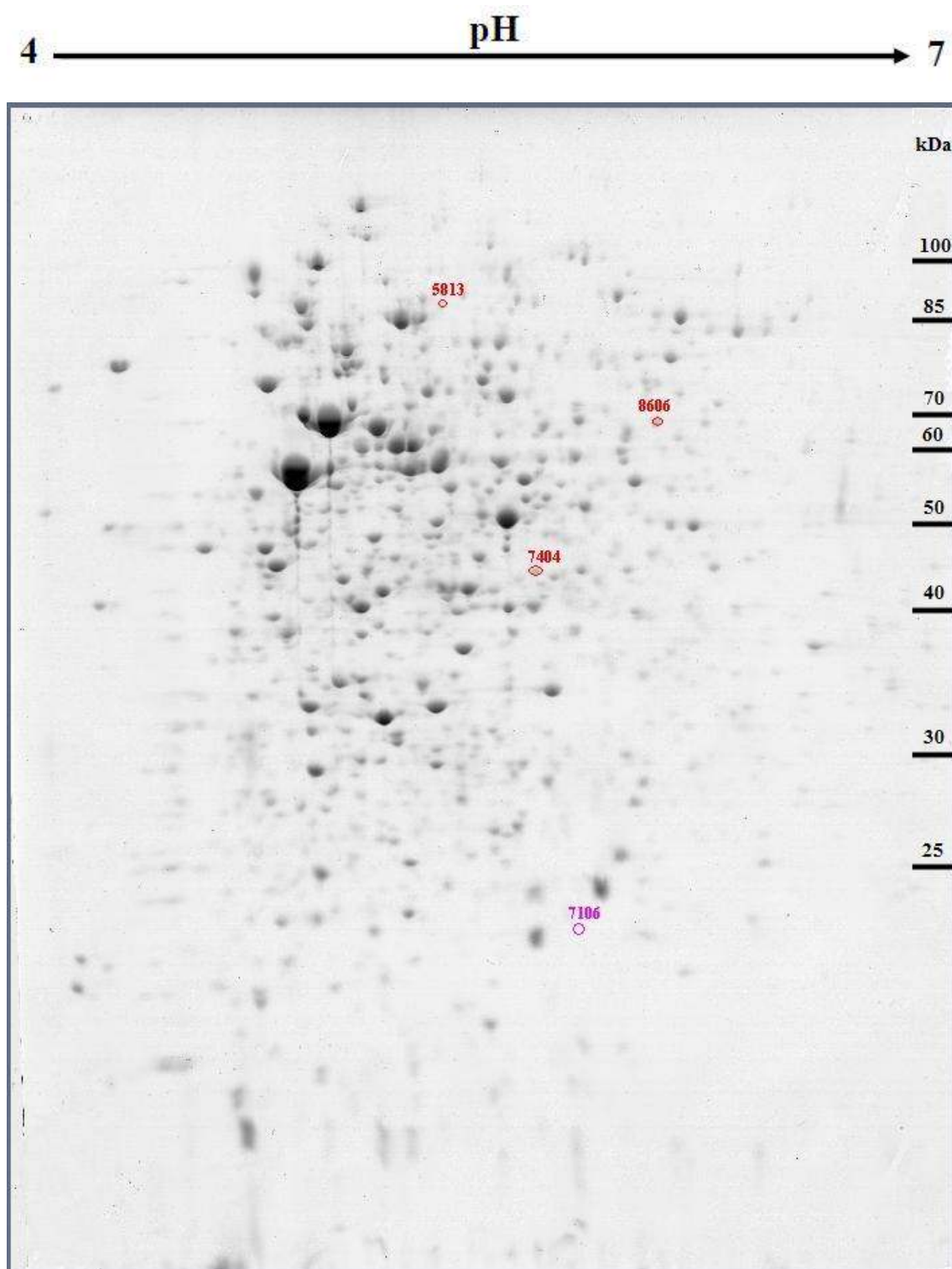
Proteomy biofilmů byly studovány ve stejných časech jako morfologie, tedy v 8., 18., 24. a 30. hodině. Cílem bylo provést kvalitativní a kvantitativní analýzu proteomických dat a vytvořit expresní profily u odlišných proteinů v průběhu tvorby biofilmu, aby na základě těchto informací mohly být vytipovány proteiny, které by mohly hrát významnou roli při utváření biofilmu. Separace proteinů byla provedena pomocí 2D elektroforézy a výsledné série gelů byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu PDQuestTM. Expresní profil proteinů byl získán srovnáním celkem 14 gelů ze dvou biologických pokusů. Finální intenzita každého spotu byla určena jako průměrná hodnota minimálně 2 technických pokusů pro každý časový bod.

4.2.3.1. Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýza spočívala v určení proteinů, které se v určitých fázích vývoje objevují, zatímco v jiných fázích nejsou exprimované vůbec. Výsledkem je soubor 4 proteinů (viz Tab. 1). Expres 3 z nich (označené červeně) byla pozorována až ve 30. hodině. Jejich syntéza tedy začíná mezi 24. a 30. hodinou. Oproti tomu 1 protein (označený fialově) byl syntetizovaný už od počátečních fází, ale jeho syntéza nebyla pozorována ve 30. hodině. Výsledné proteiny jsou znázorněny na elektroforetickém gelu na Obr. 18.

SSP	Intenzita 8 hod	SD intenzity 8 hod	Intenzita 18 hod	SD intenzity 18 hod	Intenzita 24 hod	SD intenzity 24 hod	Intenzita 30 hod	SD intenzity 30 hod
5813	X	X	X	X	X	X	209,1	78,0
7404	X	X	X	X	X	X	615,5	122,1
8606	X	X	X	X	X	X	312,4	95,3
7106	239,6	112,0	326,3	148,4	312,6	161,1	X	X

TAB. 1 - Unikátní proteiny plovoucího biofilmu *M. smegmatis*. SSP - číslo spotu; SD - směrodatná odchylka; experimentální hodnoty udávají průměrnou hodnotu intenzity daného spotu v bezrozměrných jednotkách A.U. („Arbitrary Units“, úměrné koncentraci proteinu na gelu). Červeně označené proteiny jsou unikátní ve 30. hodině, fialový protein je unikátní v 8., 18. a 24. hodině.

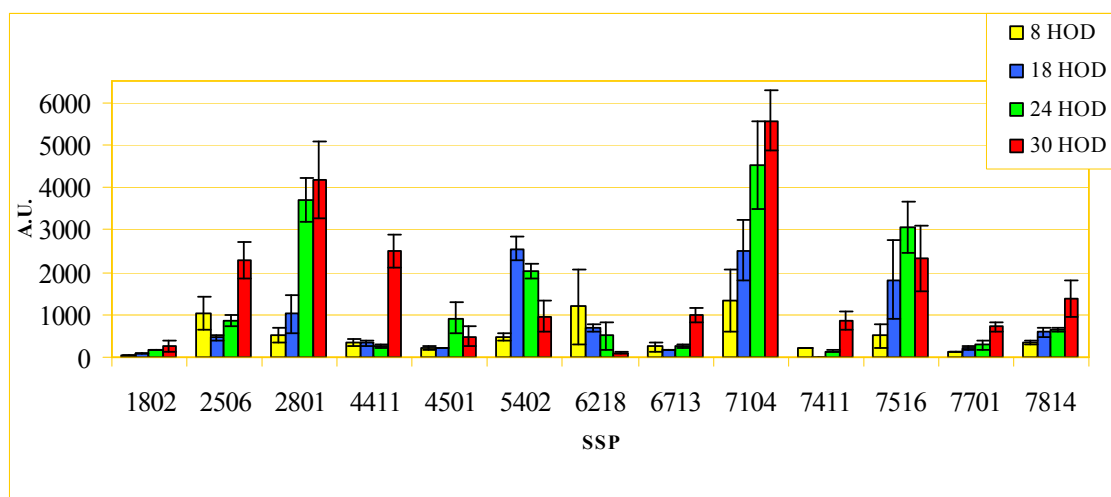


OBR. 18 - Elektroforetický 2D gel s vyznačenými unikátními spoty ve vývoji plovoucího biofilmu. 2D gel je ze série gelů plovoucího biofilmu ve 30. hodině kultivace. Červeně označené proteiny jsou unikátní ve 30. hodině, fialově označený protein je unikátní v 8., 18. a 24. hodině. V pravé části obrázku je vyznačen marker, v horní části obrázku pH gradient (4-7) a směr elektroforézy. Obarveno koloidní CBB, podle korekce nanášeno 200 μ g proteinů.

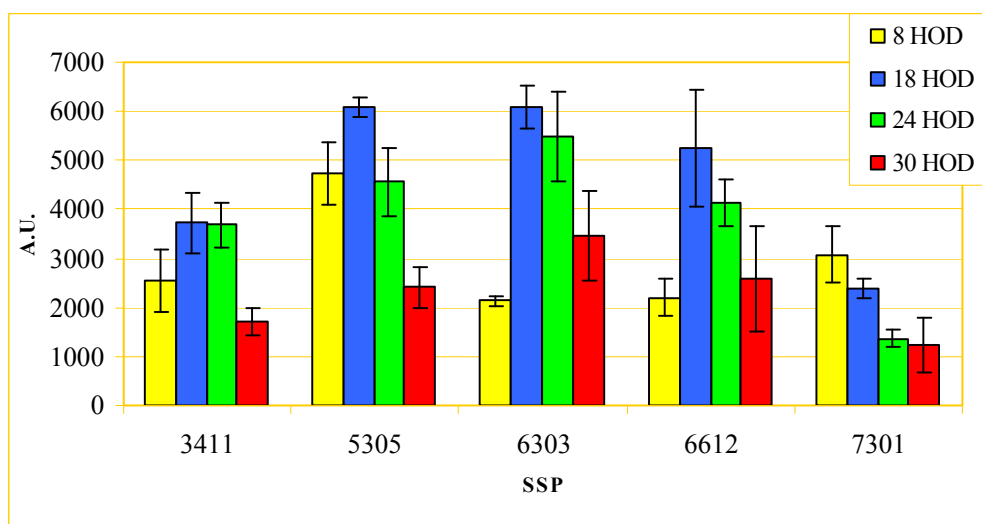
4.2.3.2. Kvantitativní analýza

Cílem kvantitativní analýzy bylo určení proteinů, jejichž míra syntézy se během vývoje biofilmu signifikantně mění. Změna exprese byla považována za signifikantní, pokud se intenzita exprese alespoň v jednom časovém bodě vývoje biofilmu lišila 4x oproti intenzitám v ostatních časových bodech (výrazná změna). Pro hodnocení menších expresních změn byl zvolen kritický faktor 2x.

Dvojnásobná změna exprese během 30 hodin vývoje byla pozorována celkem u 18 proteinů. Míra syntézy 13 z nich je považována za významnější, jelikož se jejich množství v čase liší minimálně 4x. Intenzita těchto bílkovin v čase je graficky znázorněna na Obr. 19. Expres zbylých 5 proteinů, znázorněných na Obr. 20, se liší minimálně dvojnásobně, ale ne více jak čtyřnásobně. Průměrné hodnoty intenzit proteinů obou skupin jsou shrnuty v Tab. 2. Pozice vybraných proteinů na elektroforetickém gelu jsou vyznačeny na Obr. 23.



OBR. 19 - Grafické znázornění kvantitativní analýzy proteinů plovoucího biofilmu v čase, faktor 4x. Na ose x jsou uvedeny jednotlivé SSP (číslo proteinu), na ose y jsou hodnoty kvantity proteinů (uvedeno v bezrozměrných jednotkách A.U.). Vybrané hodiny vývoje biofilmu jsou odlišeny barevně (viz legenda grafu). Vyznačeny jsou směrodatné odchylky intenzity spotů z paralel gelů.



OBR. 20 - Grafické znázornění kvantitativní analýzy proteinů plovoucího biofilmu v čase, míra exprese více než dvojnásobná, ale méně než čtyřnásobná. Na ose x jsou uvedeny jednotlivé SSP (označení proteinu), na ose y jsou hodnoty kvantity proteinů (uvedeno v bezrozměrných jednotkách A.U.). Vybrané hodiny vývoje biofilmu jsou odlišeny barevně (viz legenda grafu). Vyznačeny jsou směrodatné odchylky intenzity spotů z paralel gelů.

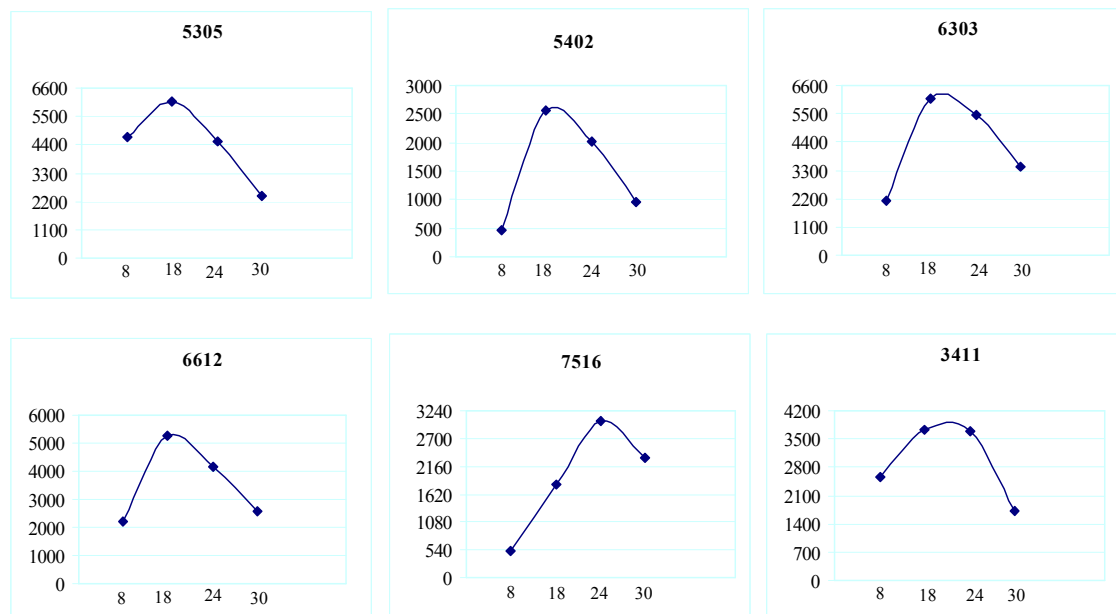
SSP	Intenzita 8 hod	SD intenzity 8 hod	Intenzita 18 hod	SD intenzity 18 hod	Intenzita 24 hod	SD intenzity 24 hod	Intenzita 30 hod	SD intenzity 30 hod
1802	60,2	0,0	82,0	0,0	177,3	12,5	251,5	115,4
2801	528,0	176,5	1018,2	442,8	3690,3	515,0	4160,7	897,4
7104	1336,4	718,9	2516,9	697,1	4521,7	1015,6	5571,8	695,9
7814	341,6	53,4	593,9	111,9	635,2	48,8	1382,5	443,8
7701	132,0	0,0	203,2	38,9	294,3	112,7	720,5	110,8
2506	1025,0	376,7	454,3	66,6	854,1	119,7	2277,7	436,7
4411	364,4	85,3	324,2	58,5	250,8	43,0	2506,7	397,3
6713	248,2	101,7	175,3	9,5	252,7	33,3	977,1	175,2
7411	198,9	0,0	nehodnoceno		145,8	18,7	857,8	212,4
4501	213,2	28,2	220,6	4,8	922,8	365,6	480,5	233,8
7516	502,3	271,9	1813,4	929,0	3045,5	606,6	2318,5	785,7
5402	467,9	100,0	2561,0	285,0	2020,3	182,8	960,4	371,7
6218	1187,7	890,5	700,4	86,7	501,4	326,8	100,9	19,3
7301	3078,1	566,5	2385,0	182,3	1361,4	171,9	1231,1	554,8
6303	2142,0	102,4	6075,0	437,8	5473,0	912,8	3447,8	912,7
6612	2204,1	389,9	5250,1	1204,0	4143,2	472,4	2602,3	1075,4
3411	2549,8	639,7	3729,4	617,1	3679,8	463,8	1711,9	295,7
5305	4730,0	646,0	6089,8	214,0	4559,9	691,6	2407,9	424,9

TAB. 2 - Souhrn průměrných hodnot intenzit vybraných proteinů. SSP - číslo spotu; SD - směrodatná odchylka; experimentální hodnoty udávají průměrnou hodnotu intenzity daného spotu v jednotkách A.U. Proteiny jsou barevně odlišeny na základě korelační analýzy (viz dále). Všechny proteiny jsou výsledkem analýzy s faktorem 2x, SSP modře podbarvené navíc vyhovují i faktoru 4x. Spot 7411 nebylo možné z technických důvodů hodnotit.

Syntéza 5 proteinů se s časem zvyšuje, zatímco pouze u 2 proteinů je tendence exprese klesající. U 2 proteinů je expresní minimum v 18. hodině, od které se pak syntéza v čase zvyšuje. Syntéza jiných 2 proteinů je během prvních 24 hodin relativně konstantní, ale ve 30. hodině se jejich exprese výrazně zvýší. Dalších 5 proteinů má naopak expresní maximum v 18. hodině, 1 protein má maximum ve 24. hodině a exprese 1 proteinu kulminuje mezi 18. a 24. hodinou. Přehledně jsou vývojové trendy jednotlivých proteinů v čase znázorněny na Obr. 21.I a Obr. 21.II.



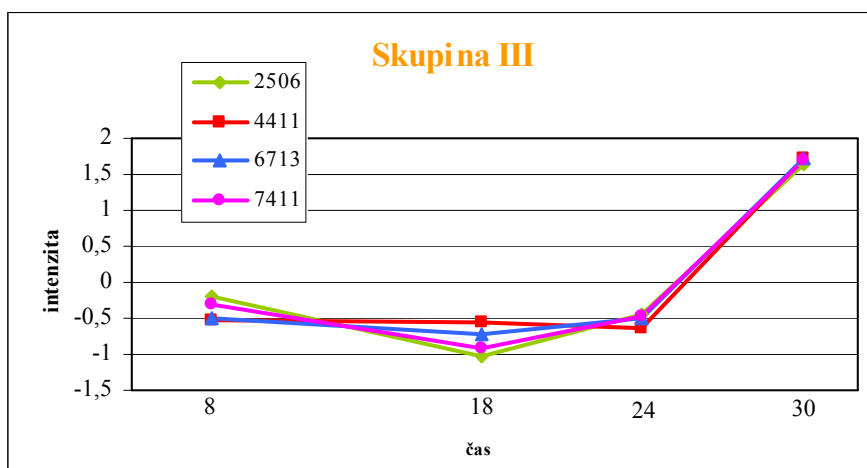
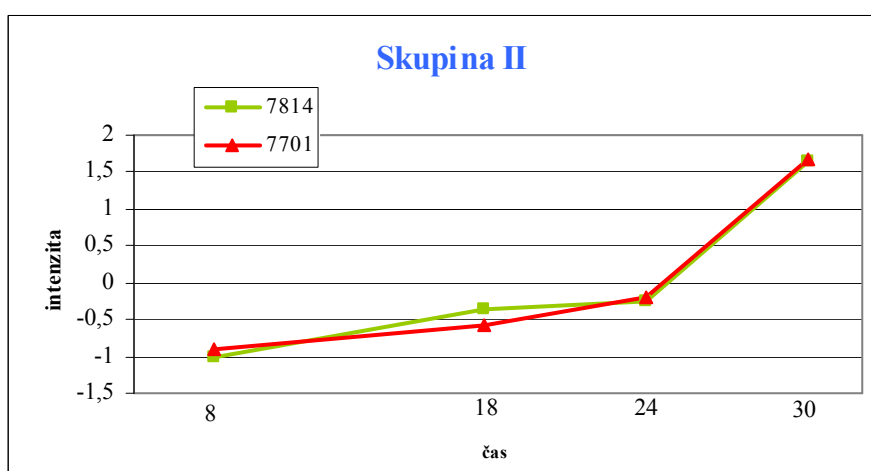
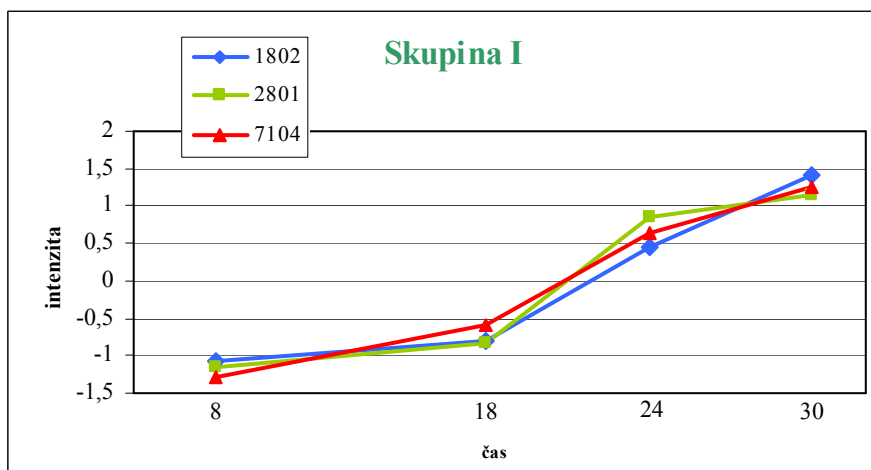
OBR. 21.1 - Grafické znázornění vývojových trendů vybraných proteinů. V názvu jednotlivých grafů je označení SSP dané bílkoviny. Na ose x jsou znázorněny jednotlivé časy odběrů během vývoje plovoucího biofilmu, na ose y je intenzita spotu (v jednotkách A.U.).



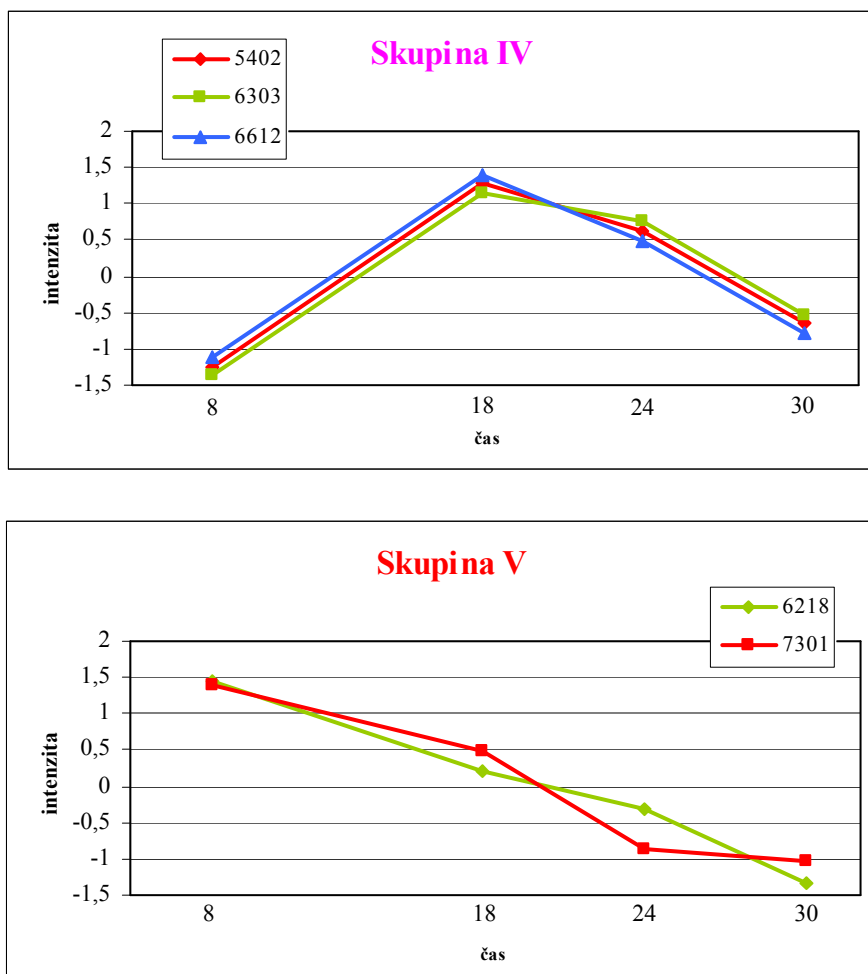
OBR. 21.II - Grafické znázornění vývojových trendů vybraných proteinů. V názvu jednotlivých grafů je označení SSP dané bílkoviny. Na ose x jsou znázorněny jednotlivé časy odběrů během vývoje plovoucího biofilmu, na ose y je intenzita spotu (v jednotkách A.U.).

Přestože se jedná o expresní profily tvořené pouze 4 časovými body, lze u proteinů pozorovat několik typických expresních průběhů. Sada 18-ti vybraných proteinů byla rozdělena do skupin na základě korelační analýzy jejich časových profilů (viz Obr. 22.I a Obr. 22.II). Proteiny v rámci skupiny jsou vzájemně korelované (podobně s hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu v intervalu 0,94-1 s tím, že každý protein je zařazen pouze do jedné skupiny).

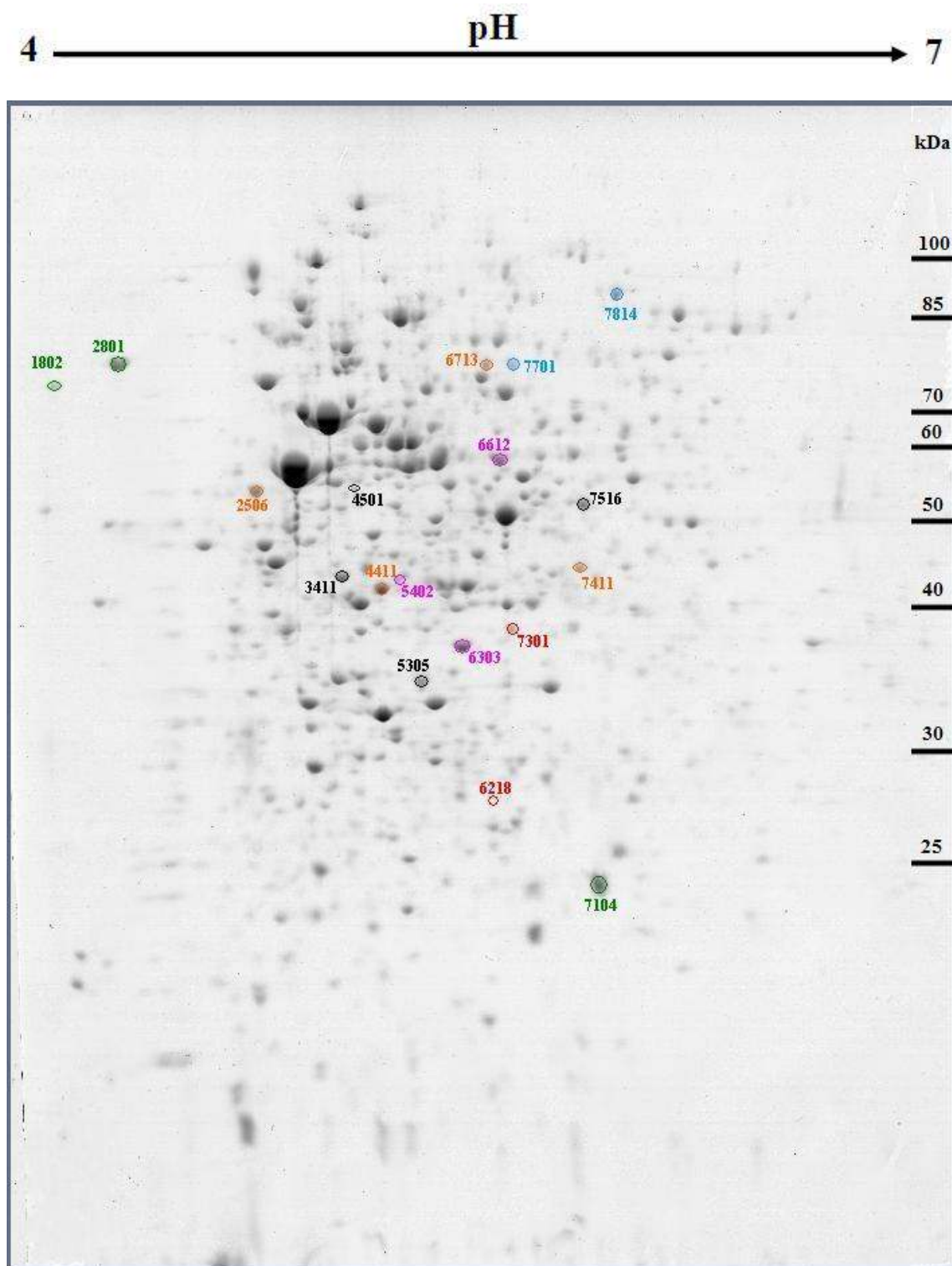
Skupina I je tvořena **3 proteiny** (SSP 1802, 2801, 7104), jejichž exprese s časem roste přibližně lineárně. Expese **2 proteinů** (SSP 7701, 7814) zařazených do skupiny II se s časem také zvyšuje, ale její průběh je nejprve pozvolný a až po 24 hodinách prudce narůstá. Skupina III zahrnuje **4 proteiny** (SSP 2506, 4411, 6713, 7411), jejichž exprese je během prvních 24 hodin relativně konstantní, ale poté dochází k jejímu výraznému zvýšení. Skupina IV zahrnuje **3 proteiny** (SSP 5402, 6303, 6612). Expese těchto proteinů do 18. hodiny, kde mají expresní maximum, prudce stoupá a poté se jejich syntéza opět snižuje. Do poslední skupiny V spadají **2 proteiny** (SSP 6218, 7301), jejichž exprese v čase jako u jediných klesá. **4 proteiny** (SSP 3411, 4501, 5305, 7516) nevyhovovaly zmiňovanému korelačnímu intervalu, proto nebyly zařazeny do žádné skupiny a jejich expresní vývoj je jedinečný.



OBR. 22.I - Grafické znázornění skupin proteinů hodnocených podle korelace. Na obrázku jsou znázorněny 3 skupiny proteinů rozdělených podle korelačního koeficientu. Na ose x jsou znázorněny jednotlivé časy odběrů vzorků během vývoje biofilmu, na ose y jsou normalizované hodnoty průměrných intenzit daných proteinů spočítané jako podíl rozdílu intenzity spotu v dané hodině a průměrné intenzity spotu v čase se směrodatnou odchylkou od průměru.



Obr. 22.II - Grafické znázornění skupin proteinů hodnocených podle korelace. Na obrázku jsou znázorněny 2 skupiny proteinů rozdělených podle korelačního koeficientu. Na ose x jsou znázorněny jednotlivé časy odběrů vzorků během vývoje biofilmu, na ose y jsou normalizované hodnoty průměrných intenzit daných proteinů spočítané jako podíl rozdílu intenzity spotu v dané hodině a průměrné intenzity spotu v čase se směrodatnou odchylkou od průměru.



OBR. 23 - Elektroforetický 2D gel s výslednými spoty z kvantitativní analýzy. 2D gel je ze série gelů plovoucího biofilmu ve 30. hodině kultivace. Vyznačené jsou výsledné spoty z kvantitativní analýzy, barevné rozlišení podle skupin korelace. V pravé části obrázku je vyznačen marker, v horní části pH gradient (4-7) a směr elektroforézy. Obarveno koloidní CBB, podle korekce naneseno 200 μg proteinů.

5. DISKUZE

Předkládaná diplomová práce je součástí projektu zabývajícího se studiem biofilmů u *Mycobacterium smegmatis* a volně navazuje na diplomovou práci B. Sitařové (SITAŘOVÁ 2011). Ta se věnovala tvorbě biofilmů *M. smegmatis* na skleněných a zirkoniových mikrokuličkách a během svého výzkumu mimo jiné potvrdila i skutečnost, že *M. smegmatis* je schopno tvořit plovoucí biofilm na hladině média. V návaznosti na její výsledky byl výzkum zaměřen na morfologickou a proteomickou analýzu plovoucího biofilmu v čase. Cílem mé práce bylo prostudovat prvotní fáze vývoje biofilmu, zachytit morfologii buněk v jednotlivých stádiích tvorby a udělat analýzu proteomů v daných fázích. Výsledky by pak mohly vést k identifikaci důležitých proteinů, které hrají významnou roli při utváření a vývoji biofilmu u bakterií, v adhezi buněk na povrch i kohezi k sobě samým či v mechanismech přežití bakterií za nepříznivých podmínek. Identifikace těchto proteinů u *M. smegmatis* by mohla být pak využita jako podklad pro výzkum patogenních bakterií tvořících biofilmy, které jsou nežádoucí anebo představují zdravotní rizika, zejména v nemocničních provozech, stravovacích zařízeních a potravinářském průmyslu.

Jako plovoucí biofilm označujeme biofilm vytvořený na rozhraní voda-vzduch. Tuto strukturu je možné najít kdekoliv v přírodě, není vodní plochy, kde by se plovoucí biofilm nevyskytoval. Efektem, který vykazuje rozhraní voda-vzduch, je především povrchové napětí tvořené vodíkovými můstky molekul vody. Díky tomuto napětí se organismy a jiné částice drží na hladině a mohou tak tvořit biofilmy (WOTTON a PRESTON 2005). Mezi výhody, které mikroorganismům přináší tvorba plovoucích biofilmů, patří například zvýšená možnost horizontálního přenosu genů, kterou popsal Król *et al.* v biofilmech *E. coli* (KROL *et al.* 2011). Výsledkem jejich práce bylo zjištění, že biofilmy na rozhraní voda-vzduch jsou ideálním prostředím pro přenos plazmidů. Dochází k tomu díky snažšímu přístupu buněk ke kyslíku, což vede ke zvýšené hustotě buněk a zvýšené frekvenci kolokalizace donorů a recipientů.

Druhů bakterií, které vytvářejí plovoucí biofilmy, je celá řada. Declerck *et al.* se například věnovali plovoucím biofilmům rodu *Legionella* (DECLERCK *et al.* 2007). Ve své práci zkoumali vliv jiných organismů na replikaci buněk v biofilmech. Pozitivní se ukázala být přítomnost *Acanthamoeba castellanii*, která zvyšuje koncentraci těchto

bakterií v biofilmu. Mezi bakterie schopné tvořit plovoucí biofilm patří i *M. smegmatis* (NGUYEN *et al.* 2010, SITAŘOVÁ 2011).

Cílem mé diplomové práce bylo provést morfoloickou a proteomovou analýzu plovoucího biofilmu *M. smegmatis* během prvních 30 hodin vývoje. Publikací věnujících se studiu prvotních fází tvorby plovoucího biofilmu jakýchkoliv bakterií je poskrovnu. Převážná většina prací se zabývá srovnávací analýzou přisedlého biofilmu a planktonicky rostoucích buněk, ať už se jedná o analýzy morfoloické, transkriptomické či proteomické (HEFFORD *et al.* 2005, RESCH *et al.* 2006, LO *et al.* 2009, VAN ALEN *et al.* 2010, MUKHERJEE *et al.* 2011).

Na základě předběžných morfoloických analýz byly pro experimenty zvoleny odběrové časy 8, 18, 24 a 30 hodin. Plovoucí biofilm byl kultivován na Petriho miskách, na jejichž dně byly skleněné mikrokuličky, které byly převrstveny kultivačním médiem. Na jeho povrchu se tvořil plovoucí biofilm. Tuto skutečnost je možné vysvětlit tím, že bakterie rodu *Mycobacterium* jsou aerobní, při statické kultivaci nedochází k okysličování média a bakterie na to reagují vytvořením biofilmu na jeho povrchu. Použití kuliček při kultivaci mělo několik důvodů. Práce je součástí většího projektu, kde bylo mikrokuliček využíváno (SITAŘOVÁ 2011), a proto z důvodu srovnání jednotlivých experimentů byly kuličky v experimentálním schématu ponechány, i když přímo na nich kultivace *M. smegmatis* neprobíhá. Dalším významným důvodem bylo jejich využití při přípravě vzorků pro pozorování biofilmu v elektronovém mikroskopu. Biofilm po odsátí média klesl na povrch kuliček. Tímto způsobem bylo možné přímé srovnání s biofilmem rostoucím přímo na kuličkách (SITAŘOVÁ 2011). Zároveň bylo možné využít mikrokuličky k rozbíjení buněk při izolaci proteinů a minimalizovat tak vnesení experimentálních chyb.

Na počátku práce byl pozorován plovoucí biofilm pod binokulární lupou. Výsledkem je soubor fotografií, na kterých je vidět, že v prvních hodinách kultivace dochází ke shlukování buněk a vytváření jakýchsi „nukleačních center“. Ostrůvky buněk se postupem času zvětšují, až dojde k jejich splynutí v souvislou vrstvu, která je patrná již okolo 24. hodiny. Od té chvíle už pravděpodobně dochází k zesilování a tvorbě více vrstev biofilmu. Zdá se, že nukleační centra zůstávají zachována i v pozdějších fázích vývoje.

Pro detailnější vizualizaci plovoucího biofilmu byla využita skenovací elektronová mikroskopie. Biofilm byl pozorován ve stejných fázích vývoje jako pod binokulární lupou (8, 18, 24 a 30 hodin), a to hned několika způsoby. Nejprve byl

pozorován plovoucí biofilm, který se nechal spadnout na kuličky na dně kultivačního systému. Snímky v podstatě potvrzují teorii získanou při pozorování lupou. Okolo 8. hodiny se tvoří shluky buněk, které se s časem rozšiřují, až dojde k vytvoření souvislého vícevrstevnatého biofilmu. Obdobným způsobem se vytvářely i biofilmy tvořené při kontinuální kultivaci *M. smegmatis* prováděné kolegy v laboratoři. Tyto biofilmy měly tvar kuliček velkých až 5 mm. Skenovací mikroskopická analýza těchto objektů ukázala, že jsou tvořeny z oddělených shluků buněk, které pak vytváří konečný hladký kulovitý tvar (PETRÁČKOVÁ, osobní sdělení).

Po těchto výsledcích byla využita možnost pozorovat biofilm v elektronovém mikroskopu, který dovolil pozorování i při větších zvětšeních. Z technických důvodů nebylo možné v tomto mikroskopu pozorovat biofilm spadlý na kuličky, proto bylo využito speciálně připraveného podložního sklíčka, což nám dovolilo studovat biofilm jak z lícové, tak rubové strany. Tato SEM analýza přinesla do studie další zajímavé skutečnosti. Z obrázků je patrné, že rozdíl mezi lícovou a rubovou stranou biofilmu není (viz Obr. 13 - 15). Na snímcích z prvních fází vývoje biofilmu (8 a 18 hodin) je vidět, že buňky na počátku tvoří vláknité struktury podobné vegetativnímu myceliu streptomycet (viz Obr. 13). Důvodem by mohlo být to, že vytvářením delších a větvených struktur biofilm lépe „drží“ na povrchu média, což je zapotřebí hlavně v prvotních fázích tvorby biofilmu, kdy buněk ještě není mnoho a je třeba vytvořit pevný základ pro vývoj biofilmu. K podobným výsledkům dospěli i Hall-Stoodley *et al.*, kteří studovali biofilm u *M. marinum* (HALL-STOODLEY *et al.* 2006). Charakterizovali vývoj biofilmu v čase na různých materiálech a mimo to provedli také vizualizaci pomocí konfokální laserové mikroskopie. Autoři pozorovali neobvyklou ultrastrukturu biofilmu v počátcích jeho vývoje. Mykobakteriální shluky byly uspořádané souběžně, čímž tvořily dlouhé tyčkovité tvary, ze kterých se postupem času stávaly vinoucí se provazce, tzv. „cords“. Tento fenotyp do té doby nebyl u *M. marinum* pozorován, přestože jde o dominantní strukturu v biofilmech tohoto mykobakteriálního druhu.

Ve 30. hodině vývoje plovoucího biofilmu bylo naopak pozorováno, že souvislá vrstva biofilmu je tvořena spíše menšími jednotlivými buňkami (viz Obr. 15-B). Je pravděpodobné, že v této době dochází ke změně v expresi genů, kdy bakterie začnou syntetizovat proteiny potřebné k dělení buněk. Tuto teorii by mohla potvrdit i identifikace unikátních proteinů, které jsou výsledkem kvalitativní analýzy proteomu (viz Kap. 4.2.3.1.).

Na morfologickou studii navázala analýza celkového proteomu mykobakterií v plovoucím biofilmu. Před samotnou 2D elektroforézou bylo zapotřebí optimalizovat fázi přípravy proteinových vzorků. Prvním úkolem byla volba nejvhodnějšího způsobu rozbíjení buněk při izolaci proteinů. B. Sitařová rozbíjela buňky třením kultury v třecí misce se skleněnými kuličkami (SITAŘOVÁ 2011). Tento způsob byl použit zejména proto, že byl sledován vývoj biofilmu na mikrokuličkách. Rozbíjení buněk třením je metoda s výhodou použitelná při izolaci proteinů ze starších biofilmů, kde je nárůst buněk značný a pro dostatečné množství proteinů stačí kultura z několika Petriho misek. V tomto případě, kdy bylo třeba izolovat proteiny z prvotních fází tvorby biofilmu, byl tento způsob dosti náročný a nevyhovující. Nárůst biofilmu je především okolo 8. hodiny velmi slabý, tvoří se pouze ostrůvky buněk a pro izolaci dostatečného množství proteinů bylo nutné kultivovat mykobakterie na řádově desítkách misek. Proto byly vyzkoušeny tři dostupné způsoby rozbíjení buněk a bylo provedeno jejich srovnání pomocí 1D elektroforézy. Do experimentu bylo zařazeno již zmíněné tření s mikrokuličkami, vortexování s mikrokuličkami a sonikace. Z výsledků vyplývá, že nejúčinnější metodou je sonikace, která ale není příliš vhodná pro využití při izolaci proteinů z plovoucího biofilmu díky přítomnosti skleněných mikrokuliček v kultivačním systému. Biofilm bylo nutné „sebrat“ z hladiny média, což především u biofilmu z 8. hodiny je technicky obtížné. Sonikace by tedy byla vhodnou metodou pro izolaci proteinů ze submerzních kultur nebo u kultivací bez mikrokuliček. Účinnost vortexování kultury v tlustostěnné skleněné zkumavce byla dle 1D gelu kvalitativně srovnatelná se sonikací, navíc se jedná o metodu velmi jednoduchou a přijatelnou pro kultivační systém s plovoucím biofilmem. Výhodou je také přímé využití mikrokuliček z kultivačního systému. Ostatně i Benov *et al.* publikovali vortexování s kuličkami jako nejvhodnější metodu pro izolaci proteinů z *E. coli*, účinností srovnatelnou se sonikací a s metodou „French press“ a také šetrnou k méně stabilním enzymům (BENOV a AL-IBRAHEEM 2002). Rozbíjení buněk třením je ve srovnání s ostatními dvěma metodami nejméně vhodné. Metoda je náročná na čas a kvalita výtěžku je podstatně horší.

Aby byly získány z proteomové studie vypovídající výsledky, bylo zapotřebí pro 2D elektroforézu vycházet ze stejných množství nanesených proteinů. Koncentrace izolovaných proteinů byla měřena pomocí Pierce[®] BCA Protein Assay Kitu. Po provedení 2D elektroforézy byly ale získány u jednotlivých vzorků gely s různou intenzitou spotů. Gely z 8. hodiny vývoje biofilmu byly nejslabší, oproti tomu

z 24. a 30. hodiny byly co do intenzity spotů relativně srovnatelné. Proto byla zavedena alternativní metoda stanovení proteinů pomocí 2D Quant kitu. Metoda je vhodná pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích již rozpuštěných ve 2D vzorkovém pufru s močovinou, tedy v okamžiku kdy už je vzorek zbaven případných nečistot a interferujících látek a je připraven přímo pro použití v 2-DE. Tato poměrně nákladná metoda běžně fungovala pro stanovení koncentrace proteinů ze submerzních kultur či z kultur na agarech (RAMANIUK, osobní sdělení). V mém případě studia plovoucího biofilmu se ale tato metoda ukázala jako nevhodná. Gely získané z takto měřených izolací byly nesrovnatelné, opět docházelo k tomu, že při nanesení stejného množství proteinů byly gely z 8. hodiny oproti 30. hodině velmi slabé. Proto byla vybrána poměrně rychlá, přesná a časově méně náročná metoda pro ověření množství bílkovin ve vzorku - jednorozměrná elektroforéza. Ověřením jednorozměrnou elektroforézou se výsledky potvrdily. Tento problém si vysvětluji tím, že na počátku vývoje biofilmu dochází k intenzivní produkci mezibuněčné hmoty, díky čemuž buňky lépe adherují a vytváří biofilm. V případě mykobakterií jsou její hlavní složkou lipidy (ZAMBRANO a KOLTER 2005), které pravděpodobně interferují se složkami 2D Quant kitu a dochází tak k nepřesnému stanovení koncentrace proteinů. Na základě těchto výsledků byla používána k ověřování koncentrace 1D elektroforéza. 1D gely byly vyhodnoceny v počítačovém programu Quantity One[®] a byla provedena korekce mezi intenzitou proteinových proužků s naměřenou koncentrací proteinů. Na vlastní 2-DE bylo nanášeno již upravené množství bílkovin, které odpovídalo přibližně 200 µg na 2D gel. Tato metoda fungovala a jejím použitím byla získána série kvantitativně dobře srovnatelných gelů.

Cílem proteomové analýzy bylo kvalitativní a kvantitativní hodnocení proteomických dat a vytvoření expresních profilů proteinů, které jsou unikátní v průběhu tvorby plovoucího biofilmu.

Kvalitativní analýza byla zaměřena na hledání proteinů, které jsou jedinečné pro daný časový bod tvorby biofilmu. Jelikož kultivace probíhala nepřetržitě za stejných podmínek a jednalo se stále o stejnou kulturu, bylo očekáváno, že takovýchto proteinů nebude mnoho. Jinak by tomu mohlo být při porovnání daných časových bodů například s planktonicky rostoucí kulturou nebo s jiným typem biofilmu, kde by se kvalitativní rozdíly daly očekávat vyšší. To však nebylo předmětem této práce.

V případě kvalitativní analýzy plovoucího biofilmu v čase byla detekována exprese 4 unikátních proteinů. Exprese jednoho z nich byla pozorována od počátku vývoje, zatímco ve 30. hodině už syntetizován nebyl. Když vezmeme v potaz morfologickou analýzu, tento protein by mohl hrát roli v růstu buněk, jelikož právě v prvních třech časových bodech se při SEM buňky zdají být spíše podlouhlé, podobné myceliu. Zbývající 3 proteiny byly naproti tomu syntetizovány až ve 30. hodině, jejich exprese nebyla během počátečních fází pozorována. Jak již bylo zmíněno výše, tyto proteiny by mohly mít funkci při spouštění dělení buněk, protože ve 30. hodině byl při SEM pozorován biofilm tvořený spíše menšími jednotlivými buňkami a nikoliv větvenými vícebuněčnými vlákny. Více informací o vybraných proteinech a jejich funkcích by přinesla až identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry), o kterou budou výsledky této práce v dohledné době rozšířeny.

Cílem kvantitativní analýzy bylo určit proteiny, u nichž dochází během vývoje plovoucího biofilmu v čase k signifikantní změně. Jako statisticky významný byl považován čtyřnásobný rozdíl exprese proteinu mezi jednotlivými vzorky na časové ose (8-30 hodin). Pro hodnocení menších expresních změn byl ještě zvolen faktor 2x. Výsledkem byl soubor 18 proteinů, z nichž 13 vyhovuje analýze s faktorem 4x. Míra exprese zbylých 5 se v čase liší více jak dvojnásobně, ale méně než čtyřnásobně. U všech proteinů lze pozorovat několik typických průběhů míry exprese. Na základě korelační analýzy časových profilů byly proteiny rozděleny do 5 skupin, expresní vývoj 4 nezařazených proteinů byl zcela jedinečný.

Proteomová analýza plovoucího biofilmu mykobakterií dosud nebyla v literatuře popsána. Uvažovat o možných funkcích jednotlivých proteinů však můžeme na základě publikací věnovaných srovnávací analýze proteomů jiných bakterií rostoucích v biofilmu a planktonické formě. Resch *et al.* provedli proteomické srovnání *Staphylococcus aureus* rostoucího planktonicky a v biofilmu (RESCH *et al.* 2006). V mladém biofilmu identifikovali zvýšeně exprimované proteiny asociované s adhezí buněk či syntézou peptidoglykanu, ve 48 hodin starém biofilmu pozorovali zvýšenou syntézu formát dehydrogenázy, což naznačuje, že buňky v biofilmu mají vysoce aktivní pyruvátový metabolismus a glykolytickou dráhu. Tyto proteomické výsledky potvrdili také transkriptomickou analýzou. Van Alen *et al.* provedli podobnou analýzu u *Neisseria meningitidis* (VAN ALEN *et al.* 2010). Zvýšenou syntézu v biofilmu zaznamenali u 2 proteinů, které hrají roli při oxidativním stresu, ostatní zvýšeně exprimované byly součástí metabolismu aminokyselin. Mezi proteiny se sníženou

expresí v biofilmu zařadili například protein buněčného dělení FtsZ. Z výsledků usuzují, že se bakterie v biofilmech vyrovnávají se zvýšeným oxidativním stresem. Navíc buňky ve spodních částech biofilmu čelí limitaci živinami, což může mít za následek právě snížení exprese proteinů buněčného dělení, transkripce či translace. S podobnými výsledky a úvahami přišli také Mukherjee *et al.*, kteří se zabývali biofilmy u *E. coli* (MUKHERJEE *et al.* 2011). Ve zvýšeném množství byl nalezen prekurzor proteinu OmpA. Autoři předpokládají, že by mohl hrát roli v transportu složek EPS při tvorbě biofilmu. Zvýšená exprese byla pozorována i u 2 enzymů glykolytické dráhy. Mezi proteiny se sníženou expresí zařadili například některé heat-shock proteiny (Hsp). Oproti práci van Alena *et al.* identifikovali jako snížené také proteiny oxidativního stresu či rezistence.

Celkový počet námi zjištěných změn v proteinovém profilu *M. smegmatis* ve vývoji plovoucího biofilmu je 22 s tím, že 4 z nich jsou unikátní v kvalitativní analýze a exprese 18 z nich se významně mění v čase. Když vezmeme v úvahu, že se jedná o porovnání jedné kultury během „pouhých“ 30 hodin, je výsledek poměrně zajímavý. Samozřejmě identifikace jednotlivých proteinů pomocí MS by vnesla do studie nový pohled a mohli bychom lépe diskutovat o možném vlivu jednotlivých proteinů na morfologii, fyziologii či biochemii mykobakterií v plovoucím biofilmu.

Tato diplomová práce je součástí projektu, který se zabývá studiem proteomu biofilmů *M. smegmatis* rostoucích na nejrůznějších povrchích. Analyzovány jsou biofilmy za různých kultivačních podmínek a v různých vývojových stádiích. Studium plovoucích biofilmů je jedním z nich. Cílem dílčích projektů je identifikace zajímavých proteinů pomocí MS. Věříme, že spojení všech výsledků nám přinese nejen nový pohled na biofilmy obecně, ale hlavně na biofilmy rodu *Mycobacterium*.

Přestože tato proteomová analýza plovoucího biofilmu *M. smegmatis* neobsahuje identifikace vybraných bílkovin pomocí MS, což přesahuje rámec této práce, lze konstatovat, že cíle diplomové práce byly splněny.

6. SOUHRN

1. Za využití binokulární lupy a skenovací elektronové mikroskopie byla provedena morfologická analýza plovoucího biofilmu *Mycobacterium smegmatis* vytvořeného na hladině kultivačního média v Petriho miskách. Byly pozorovány především prvotní fáze vývoje biofilmu. Pro experimenty byly zvoleny odběrové časy 8, 18, 24 a 30 hodin. V 8. hodině byly na hladině média pozorována „nukleační centra“, ze kterých dochází k rozrůstání biofilmu do okolí a postupnému vytvoření souvislé vrstvy biofilmu, která je pozorovatelná již okolo 24. hodiny. Ve 30. hodině byl pozorován již vícevrstevnatý biofilm.

2. Byla provedena optimalizace přípravy proteinového vzorku před vlastní analýzou 2D elektroforézou. Pomocí snadnější a rychlejší 1D elektroforézy byla stanovena nejvhodnější metoda pro rozbíjení buněk při izolaci proteinů - vortexování se skleněnými mikrokuličkami. Dále byl optimalizován způsob stanovení koncentrace proteinů pro nanášky na 2D elektroforézu.

3. Pomocí 2D elektroforézy byla provedena analýza proteomů *M. smegmatis* v daných časech vývoje plovoucího biofilmu. Na základě dat byly určeny kvalitativní a kvantitativní změny v proteomu. Celkem bylo vybráno 22 proteinů, které budou v dohledné době identifikovány hmotnostní spektrometrií a výsledky budou porovnány s výsledky z ostatních proteomových analýz, které jsou součástí projektu zabývajícím se studiem biofilmů u *M. smegmatis*. Z této skupiny proteinů jsou 4 unikátní pro určitou vývojovou fázi a exprese zbylých 18 se v čase signifikantně mění. U těchto proteinů byly popsány expresní profily v čase a pomocí korelační analýzy byly určeny skupiny se stejným expresním profilem a tedy se stejnou nebo podobnou regulací exprese.

7. SEZNAM LITERATURY

Ahmed, Z. (2001): Production of natural and rare pentoses using microorganisms and their enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology* 4: 103-111.

Alavi, M.R., Shukla, H.D., Whitaker, B., Arnold, J. a Shahamat, M. (2007): Attachment and biofilm formation of *Mycobacterium marinum* on a hydrophobic surface at the air interface. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 93-101.

Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. a Tolker-Nielsen, T. (2006): A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59: 1114-1128.

Alsteens, D., Verbelen, C., Dague, E., Raze, D., Baulard, A.R. a Dufrene, Y.F. (2008): Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. *Pflugers Arch* 456: 117-125.

Aparna, M.S. a Yadav, S. (2008): Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis* 12: 526-530.

Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P. a Hoiby, N. (2004): *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1175-1187.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A. a Vávra, J. (1996): *Lékařská mikrobiologie*. Marvil, Praha.

Benov, L. a Al-Ibraheem, J. (2002): Disrupting *Escherichia coli*: a comparison of methods. *J Biochem Mol Biol* 35: 428-431.

Bernhardt, T.G. a de Boer, P.A. (2005): SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell* 18: 555-564.

Besra, G.S. a Brennan, P.J. (1997): The mycobacterial cell envelope: a target for novel drugs against tuberculosis. *J Pharm Pharmacol* 49: 25-30.

Best, C.A. a Best, T.J. (2009): *Mycobacterium smegmatis* infection of the hand. *Hand* 4: 165-166.

Bi, E.F. a Lutkenhaus, J. (1991): FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354: 161-164.

Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.C. a Hochstrasser, D. (1993): A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 14: 1357-1365.

- Boles, B.R. a Horswill, A.R. (2008): *Agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog 4: e1000052.
- Boyd, A. a Chakrabarty, A.M. (1994): Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 60: 2355-2359.
- Camilli, A. a Bassler, B.L. (2006): Bacterial small-molecule signaling pathways. Science 311: 1113-1116.
- Campoccia, D., Montanaro, L. a Arciola, C.R. (2006): The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. Biomaterials 27: 2331-2339.
- Cook, G.M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R.A., Danilchanka, O. a Niederweis, M. (2009): Physiology of mycobacteria. Advances in Microbial Physiology 55: 81-184.
- Cotter, P.A. a Stibitz, S. (2007): c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. Curr Opin Microbiol 10: 17-23.
- Daffe, M., Brennan, P.J. a McNeil, M. (1990): Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography mass spectrometry and by H-1 and C-13 NMR analyses. J Biol Chem 265: 6734-6743.
- Daniel, R.A. a Errington, J. (2003): Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. Cell 113: 767-776.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V. a Ollevier, F. (2007): Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. Curr Microbiol 55: 435-440.
- Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P. a Winzer, K. (2006): The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol 8: 1095-1104.
- Donelli, G., Francolini, I., Romoli, D., Guaglianone, E., Piozzi, A., Ragnath, C. a Kaplan, J.B. (2007): Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. Antimicrob Agents Chemother 51: 2733-2740.
- Dubey, G.P. a Ben-Yehuda, S. (2011): Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. Cell 144: 590-600.
- Flardh, K. (2010): Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*. Curr Opin Microbiol 13: 758-765.
- Flemming, H.C. a Wingender, J. (2010): The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 8: 623-633.

- Francolini, I. a Donelli, G. (2010): Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 227-238.
- Fuqua, C., Parsek, M.R. a Greenberg, E.P. (2001): Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35: 439-468.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. a Stoodley, P. (2005): Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13: 34-40.
- Gerstel, U. a Romling, U. (2003): The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* 154: 659-667.
- Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M., Islam, N.M., Sarkar, S.N., Dasgupta, S. a Kirsebom, L.A. (2009): Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10781-10786.
- Gordon, R.E. a Smith, M.M. (1953): Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J Bacteriol* 66: 41-48.
- Gotz, F. (2002): Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 43: 1367-1378.
- Guenin-Mace, L., Simeone, R. a Demangel, C. (2009): Lipids of pathogenic mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound Emerg Dis* 56: 255-268.
- Hall-Stoodley, L., Brun, O.S., Polshyna, G. a Barker, L.P. (2006): *Mycobacterium marinum* biofilm formation reveals cording morphology. *FEMS Microbiol Lett* 257: 43-49.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. a Stoodley, P. (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108.
- Harrison, J.J., Turner, R.J., Marques, L.L.R. a Ceri, H. (2005): Biofilms: A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. *Am Scientist* 93: 508-515.
- Harry, E.J. (2001): Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol* 40: 795-803.
- He, Z. a De Buck, J. (2010): Cell wall proteome analysis of *Mycobacterium smegmatis* strain MC2 155. *BMC Microbiol* 10: 121.
- Hefford, M.A., D'Aoust, S., Cyr, T.D., Austin, J.W., Sanders, G., Kheradpir, E. a Kalmokoff, M.L. (2005): Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. *Can J Microbiol* 51: 197-208.

- Hempel, A.M., Wang, S.B., Letek, M., Gil, J.A. a Flardh, K. (2008): Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 190: 7579-7583.
- Hengge, R. (2009): Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7: 263-273.
- Henke, J.M. a Bassler, B.L. (2004): Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol* 14: 648-656.
- Hermon-Taylor, J. a El-Zaatari, F.A.K. (2004): The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. IWA Publishing, London, 74-94.
- Hett, E.C. a Rubin, E.J. (2008): Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 126-156, table of contents.
- Chatterjee, D. (1997): The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol* 1: 579-588.
- Chen, J.M., German, G.J., Alexander, D.C., Ren, H., Tan, T. a Liu, J. (2006): Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 188: 633-641.
- Ishida, S., Arai, M., Niikawa, H. a Kobayashi, M. (2011): Inhibitory effect of cyclic trihydroxamate siderophore, desferrioxamine E, on the biofilm formation of *Mycobacterium* species. *Biol Pharm Bull* 34: 917-920.
- Kang, C.M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C. a Husson, R.N. (2005): The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev* 19: 1692-1704.
- Karatan, E. a Watnick, P. (2009): Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 310-347.
- Kofroňová, O., Nguyen, L.D., Weiser, J. a Benada, O. (2002): *Streptomyces* cultured on glass beads: sample preparation for SEM. *Microscopy Research and Technique* 58: 111-113.
- Krol, J.E., Nguyen, H.D., Rogers, L.M., Beyenal, H., Krone, S.M. a Top, E.M. (2011): Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air-liquid interface. *Appl Environ Microbiol* 77: 5079-5088.
- Kruh, N.A., Troudt, J., Izzo, A., Prenni, J. a Dobos, K.M. (2010): Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome *in vivo*. *PLoS One* 5: e13938.
- Kulka, K., Hatfull, G. a Ojha, A.K. (2012): Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms. *J Vis Exp* 60: e3820.

- Kumar, M. a Chatterji, D. (2008): Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 154: 2942-2955.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamont, E.A., Bannantine, J.P., Armien, A., Ariyakumar, D.S. a Sreevatsan, S. (2012): Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS One* 7: e30648.
- Lasa, I. a Penades, J.R. (2006): Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157: 99-107.
- Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar, C. a Kolter, R. (2008): Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 1-16.
- Levin, B.R. a Rozen, D.E. (2006): Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 4: 556-562.
- Lewis, K. (2001): Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 999-1007.
- Lewis, K. (2007): Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5: 48-56.
- Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J. a Nizet, V. (2005): *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* 202: 209-215.
- Lo, A.W., Seers, C.A., Boyce, J.D., Dashper, S.G., Slakeski, N., Lissel, J.P. a Reynolds, E.C. (2009): Comparative transcriptomic analysis of *Porphyromonas gingivalis* biofilm and planktonic cells. *BMC Microbiol* 9: 18.
- Lopez, D., Vlamakis, H. a Kolter, R. (2010): Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000398.
- Lynch, D.J., Fountain, T.L., Mazurkiewicz, J.E. a Banas, J.A. (2007): Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett* 268: 158-165.
- Mukherjee, J., Ow, S.Y., Noirel, J. a Biggs, C.A. (2011): Quantitative protein expression and cell surface characteristics of *Escherichia coli* MG1655 biofilms. *Proteomics* 11: 339-351.
- Mukherjee, P., Sureka, K., Datta, P., Hossain, T., Barik, S., Das, K.P., Kundu, M. a Basu, J. (2009): Novel role of Wag31 in protection of mycobacteria under oxidative stress. *Mol Microbiol* 73: 103-119.

- Nadell, C.D., Xavier, J.B. a Foster, K.R. (2009): The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 33: 206-224.
- Nazarova, E.V., Shleeva, M.O., Morozova, N.S., Kudykina, Y.K., Vostroknutova, G.N., Ruzhitsky, A.O., Selishcheva, A.A., Sorokoumova, G.M., Shvets, V.I. a Kaprelyants, A.S. (2011): Role of lipid components in formation and reactivation of *Mycobacterium smegmatis* "nonculturable" cells. *Biochemistry (Mosc)* 76: 636-644.
- Nguyen, K.T., Piastro, K., Gray, T.A. a Derbyshire, K.M. (2010): Mycobacterial biofilms facilitate horizontal DNA transfer between strains of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 192: 5134-5142.
- Nguyen, L., Scherr, N., Gatfield, J., Walburger, A., Pieters, J. a Thompson, C.J. (2007): Antigen 84, an effector of pleiomorphism in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 189: 7896-7910.
- Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., Jr. a Hatfull, G.F. (2005): GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* 123: 861-873.
- Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., Jr. a Hatfull, G.F. (2008): Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* 69: 164-174.
- Ojha, A.K., Trivelli, X., Guerardel, Y., Kremer, L. a Hatfull, G.F. (2010): Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. *J Biol Chem* 285: 17380-17389.
- Otzen, D. a Nielsen, P.H. (2008): We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol Life Sci* 65: 910-927.
- Pang, J.M., Layre, E., Sweet, L., Sherrid, A., Moody, D.B., Ojha, A. a Sherman, D.R. (2012): The polyketide Pks1 contributes to biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 194: 715-721.
- Parsek, M.R. a Greenberg, E.P. (2005): Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13: 27-33.
- Pennekamp, A., Pfyffer, G.E., Wuest, J., George, C.A. a Ruef, C. (1997): *Mycobacterium smegmatis* infection in a healthy woman following a facelift: case report and review of the literature. *Ann Plast Surg* 39: 80-83.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. a Lejeune, P. (1999): Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 5993-6002.
- Recht, J., Martinez, A., Torello, S. a Kolter, R. (2000): Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 182: 4348-4351.

- Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pasztor, L., Jakob, A., Gotz, F. a Nordheim, A. (2006): Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* 6: 1867-1877.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F. a Dow, J.M. (2006): Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J Bacteriol* 188: 8327-8334.
- Ryder, C., Byrd, M. a Wozniak, D.J. (2007): Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 10: 644-648.
- Salina, E.G., Zhogina, Y.A., Shleeva, M.O., Sorokoumova, G.M., Selishcheva, A.A. a Kaprelyants, A.S. (2010): Biochemical and morphological changes in dormant ("Nonculturable") *Mycobacterium smegmatis* cells. *Biochemistry (Mosc)* 75: 72-80.
- Shi, T., Fu, T. a Xie, J. (2011): Polyphosphate deficiency affects the sliding motility and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *Curr Microbiol* 63: 470-476.
- Shleeva, M., Mukamolova, G.V., Young, M., Williams, H.D. a Kaprelyants, A.S. (2004): Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology* 150: 1687-1697.
- Sitařová, B. (2011): Tvorba biofilmu *Mycobacterium smegmatis* na povrchu skleněných a zirkoniových mikrokuliček - proteomová studie. Diplomová práce.
- Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T. a Jacobs, W.R. Jr. (1990): Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 4:1911-1919.
- Spargo, B.J., Crowe, L.M., Ionedá, T., Beaman, B.L. a Crowe, J.H. (1991): Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 737-740.
- Stewart, G.C. (2005): Taking shape: control of bacterial cell wall biosynthesis. *Mol Microbiol* 57: 1177-1181.
- Stewart, P.S. a Costerton, J.W. (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
- Sturme, M.H., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A.D., Vaughn, E.E. a de Vos, W.M. (2002): Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 233-243.
- Thanky, N.R., Young, D.B. a Robertson, B.D. (2007): Unusual features of the cell cycle in mycobacteria: polar-restricted growth and the snapping-model of cell division. *Tuberculosis (Edinb)* 87: 231-236.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F. a Jaeger, K.E. (2005): *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151: 1313-1323.

Traag, B.A., Driks, A., Stragier, P., Bitter, W., Broussard, G., Hatfull, G., Chu, F., Adams, K.N., Ramakrishnan, L. a Losick, R. (2010): Do mycobacteria produce endospores? *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 878-881.

Uzoigwe, J.C., Khaita, M.L. a Gibbs, P.S. (2007): Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect* 135: 1057-1068.

Van Alen, T., Claus, H., Zahedi, R.P., Groh, J., Blazyca, H., Lappann, M., Sickmann, A. a Vogel, U. (2010): Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Neisseria meningitidis*. *Proteomics* 10: 4512-4521.

Van Houdt, R. a Michiels, C.V. (2005): Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology* 156: 626-633.

Vijay, S., Anand, D. a Ajitkumar, P. (2012): Unveiling unusual features of formation of septal partition and constriction in mycobacteria - an ultrastructural study. *J Bacteriol* 194: 702-707.

Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. a Humphery-Smith, I. (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16: 1090-1094.

Wolfe, L.M., Mahaffey, S.B., Kruh, N.A. a Dobos, K.M. (2010): Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res* 9: 5816-5826.

Wotton, R.S. a Preston T.M. (2005): Surface films: areas of water bodies that are often overlooked. *BioScience* 55: 137-145.

Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M. a Tolker-Nielsen, T. (2007): Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153: 1318-1328.

Yildiz, F.H., Liu, X.S., Heydorn, A. a Schoolnik, G.K. (2004): Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol Microbiol* 53: 497-515.

Zambrano, M.M. a Kolter, R. (2005): Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together. *Cell* 123: 762-764.