

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Kateřina Skalická

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Regulace tvorby biofilmu

Kateřina Skalická

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Skalická**
Osobní číslo: **C14223**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Regulace tvorby biofilmu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma, velice stručně popište jednotlivé kroky tvorby biofilmu.
2. Zpracujte přehled faktorů, které se uplatňují při tvorbě biofilmu.
3. Z publikovaných odborných prací uveďte konkrétní příklady ovlivnění tvorby biofilmu (mikroorganismy, vybrané faktory, vliv na tvorbu biofilmu).
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí Upa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petra Mořková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 10. 2017

Kateřina Skalická

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala především vedoucí bakalářské práce Ing. Petře Motřkové, Ph.D., za její nesmírnou trpělivost, odborné rady a vstřícný přístup během zpracování celé této práce.

Velké poděkování náleží také celé mé rodině za podporu, trpělivost a povzbuzování po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zaměřuje na regulaci tvorby biofilmu u vybraných mikroorganismů. Věnuje pozornost jednotlivým krokům tvorby biofilmu a látkám, které se v daných krocích uplatňují.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biofilm, tvorba biofilmu, regulace, mikroorganismy.

ANNOTATION

Bachelor's thesis deals with the regulation of biofilm formation by chosen microorganisms. The thesis is focused on stages of biofilm creation and compounds which are involved in every stage of biofilm formation.

KEYWORDS

Biofilm, biofilm formation, regulation, microorganisms.

Obsah

Seznam ilustrací	10
Seznam zkratk a značek	11
Úvod	13
1. Biofilm	14
2. Tvorba biofilmu	15
2.1 Proces tvorby	15
3. Regulace tvorby biofilmu u rodů <i>Pseudomonas</i> a <i>Burkholderia</i>	17
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.1.1 Regulace tvorby biofilmu u <i>P. aeruginosa</i> pomocí c-di-GMP	17
3.1.2 Role QS systému při tvorbě biofilmu u <i>P. aeruginosa</i>	19
3.1.3 Regulace tvorby biofilmu pomocí sRNA	19
3.1.4 Další faktory	20
3.2 <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
3.2.1 Regulace tvorby biofilmu pomocí c-di-GMP	20
3.2.2 Role QS systému při tvorbě biofilmu	21
3.2.3 Ovlivnění tvorby biofilmu pomocí sRNA	21
3.2.4 Přídavné faktory	22
3.3 <i>Burkholderia cenocepacia</i>	22
3.3.1. Regulace tvorby biofilmu pomocí signální c-di-GMP	22
3.3.2 Role QS systému při tvorbě biofilmu	22
3.3.3 sRNA	23
3.3.4 Přídavné faktory	23
4. Regulace tvorby biofilmu u <i>Escherichia coli</i>	25
4.1 Uchycení na povrch	25
4.2 Stacionární fáze	26
4.3 Regulace dalších komponent biofilmové matrix	26
4.4 Regulace bičíkové kaskády	27
5. Regulace tvorby biofilmu u <i>Staphylococcus aureus</i>	28
5.1 Přilnutí buněk k povrchu	28
5.2 Tvorba mikrokolonií	29
5.3 Agregace	29
5.4 Zrání biofilmu	29
5.5 Disperze	29
6. Regulace tvorby biofilmu u <i>Staphylococcus epidermidis</i>	31

7. Tvorba biofilmu u <i>Listeria monocytogenes</i>	33
8. Regulace tvorby biofilmu u <i>Streptococcus pneumoniae</i>	34
9. Regulace tvorby biofilmu u <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
10. Regulace tvorby biofilmu u <i>Clostridium difficile</i>	36
11. Regulace tvorby biofilmu u <i>Candida albicans</i>	37
12. Regulace tvorby biofilmu u <i>Exophiala dermatitidis</i>	38
Závěr	39
Citovaná literatura	40
Přílohy	48

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Stádia tvorby biofilmu (upraveno dle Moormeier and Bayles., 2017).....	16
Obrázek 2: Regulace tvorby biofilmu u <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (upraveno dle Fazli <i>et al.</i> ; 2014).....	20
Obrázek 3: Regulace tvorby biofilmu u <i>Pseudomonas putida</i> a <i>Pseudomonas fluorescens</i> (upraveno dle Fazli <i>et al.</i> ; 2014).	22
Obrázek 4: Regulace tvorby biofilmu u <i>Burkholderia cenocepacia</i> (upraveno dle Fazli <i>et al.</i> ; 2014).....	24

Seznam zkratek a značek

Agr	doplňkový genový regulátor (accessory gene regulator)
AgrC	doplňkový genový regulátor proteinu C
AgrD	doplňkový genový regulátor proteinu D
AHL	<i>N</i> -acyl-homoserin lakton
AtsR	ester sulfátu vázající protein
BcsA	katalytické podjednotky celulózové syntázy (cellulose synthase catalytic subunit)
BDSF	<i>Burkholderia</i> difúzní signální faktor (<i>Burkholderia</i> diffusible signal factor)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CciIR	regulační protein regulující genovou expresi
CepIR	regulátor sloužící ke kontrole aktivit proteáz, lipáz a pohyblivosti bakterií <i>Burkholderia cenocepacia</i>
C-di-GMP	cyklický diguanosin-5'-monofosfát
CdrA	extracelulární bílkovinný adhezín regulovaný cyklickým di-GMP
Crl	DNA vázající transkripční regulátor
CsgBAC	operon transkripční regulační protein
csgD	gen pro DNA-vázající transkripční regulátor
CsgD	DNA-vázající transkripční regulátor
Csr	regulační systém pro ukládání uhlíku
CsrA	regulátor ukládání uhlíku A
CsrB	RNA nekódujících regulátor B ukládání uhlíku
CsrC	RNA nekódujících regulátor C ukládání uhlíku
DegU	regulátor odpovědi na vazbu s DNA
DGC	diguanylátová cykláza
Dlt	D-alanin-poly(fosforbitol) ligáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPS	extracelulární polymerní látky
FleQ	transkripční regulátor
FlhD	flagelární transkripční regulátor
FlhDC	DNA vázající duální transkripční regulátor
<i>fliA</i>	flagelární biosyntetický sigma faktor
<i>fliZ</i>	flagelární biosyntetický protein

GacA	regulátor odezvy (response regulator)
GacS	senzorický protein (sensor protein)
h2cR	posttranskripční regulátor RNA
HHL	<i>N</i> -hexanoyl-homoserin lakton
LadS	senzor ztracené přilnavosti (lost adherence sensor)
LapA	velký přilnavý protein (Large adhesive protein)
LapD	cyklický dimerní GMP vázající protein
LapF	domnělá cystinová proteáza (Putative cystine protease)
LapG	periplazmatický protein
las QS	QS systém podílející se na tvorbě biofilmu u divokých typů bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LecA	lektin A
LecB	lektin B
<i>Lux</i>	geny kódující enzymy a další látky luminiscenčního systému
<i>luxS</i>	geny kódující S-ribosylhomocysteinázu
McaS	nekódující RNA
MlrA	DNA-vázající transkripční regulátor
mtvR	sRNA molekula, podílející se na regulaci hybnosti, tvorbě biofilmu, reakci na stres a virulenci u <i>Burkholderia cenocepacia</i>
NanA	neuraminidáza A
Pel	extracelulární polysacharid <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PGA	poly- β -1,6- <i>N</i> -acetylglukosamin
PilZ	vláknitý protein vázající c-di-GMP
Psl	extracelulární polysacharid <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PSM	modulin (toxický protein) rozpustný ve fenolu (phenole-soluble modulin)
OHL	<i>N</i> -oktanoyl-homoserin lakton
QS	Quorum sensing
Rcs	transkripční regulační protein
RNA	ribonukleová kyselina
sRNA	malá RNA (small RNA)

Úvod

Biofilmy mikroorganismů jsou v dnešní době jedním z nejhojnějších témat klinické mikrobiologie. Hlavním problémem je osídlování různých kloubních náhrad a katétrů patogenními mikroorganismy, které nejen že způsobují pacientům velké zdravotní potíže, ale také jsou v podobě biofilmu velmi těžko odstranitelné a léčitelné, neboť jsou buňky v tomto uspořádání odolnější k antibiotické léčbě či ke zhoršeným vnějším fyzikálním podmínkám (teplota, pH, atd.). Proto se vynakládá tolik úsilí k tomu, aby se upřesnil mechanismus tvorby biofilmu u jednotlivých mikroorganismů. Objasněním jednotlivých kroků tvorby biofilmu a všech látek, které se na daném ději podílejí, se může zvolit nový způsob léčby tak, aby byl dostatečně efektivní.

Tématem procesu tvorby biofilmu se zabývá nespočet autorů jednotlivých publikací a článků. Tato práce obsahuje přehledný souhrn základních dosavadních poznatků, jež se v těchto člancích na dané téma nacházejí.

Na začátku této práce je vysvětleno, co to biofilm je, k čemu jednotlivým mikroorganismům slouží a v jakých krocích probíhá jeho tvorba. Hlavním tématem je popis konkrétních mechanismů u jednotlivých mikroorganismů, které jsou zahrnuty v tvorbě biofilmu.

1. Biofilm

Většina bakterií se v přirozených podmínkách nevyskytuje v podobě jednotlivých izolovaných buněk, ale v podobě biofilmu, tedy v určitých strukturovaných společenstvech uložených v mezibuněčné hmotě, která je chrání před nepříznivými podmínkami prostředí. Tyto bakterie mají změněný fenotyp. To znamená, že bakterie tvořící biofilm jsou schopny lépe odolávat vysychání, lépe se chránit při napadení jinými mikroorganismy (fágy, améby živící se bakteriemi, apod.) a lépe odolávat toxickým látkám či dezinfekcím (Schindler, 2014; Votava, 2005).

Pokud se biofilm vytvoří, je velice odolný a velmi těžko odstranitelný. Některé bakteriální biofilmy jsou pro člověka prospěšné a jsou součástí jeho vlastní mikroflóry. Avšak mohou vznikat i takové biofilmy, které jsou pro tělo škodlivé. Biofilm se může vytvořit i na chirurgických implantátech, katetrech či kontaktních čočkách, čímž umožní vstup bakterií do lidského organismu (Renner and Weibel, 2011; Schindler, 2014).

V podobě biofilmu jsou bakterie schopné přežít v prostředí hostitele, kde jsou podrobeny velkému stresu. Jedná se tedy o velmi odolné formy života bakterií, které jsou problémem především v medicíně, kvůli jejich schopnosti odolávat imunitnímu systému hostitele i následné léčbě (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013).

Tato společenství jsou pro mikroorganismy velice výhodná, a proto je tvoří až několik desítek druhů mikroorganismů. Společně se podílejí na tvorbě biofilmu, který má lepší schopnost adherovat k živým i neživým povrchům a odolávat vnějším podmínkám (Votava, 2005; Schindler, 2014).

2. Tvorba biofilmu

2.1 Proces tvorby

Přeměna z planktonické formy do biofilmu probíhá v závislosti na podmínkách prostředí a jejich změnách, které spustí regulační mechanismy tvorby biofilmu. Jakmile planktonické buňky zaznamenají nějaký stresový signál, dojde k jejich připojení k povrchu, což vede k tvorbě biofilmu, který jim umožní ustát tyto změny podmínek. Když už se biofilm vytvoří, některé buňky se ze společenství uvolní, aby mohly kolonizovat jiné místo, na kterém by založily růst nového biofilmu (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013).

Proces tvorby biofilmu rozdělujeme do pěti stupňů (Obr. 1).

Prvním stupněm charakterizujeme stav, kdy se buňky reversibilně připojí k povrchu. V tomto kroku bakterie využívají mnoho extracelulárních organel a proteinů obecně označovaných jako adheziny (např. bičíky, fimbrie a vnější membránové proteiny).

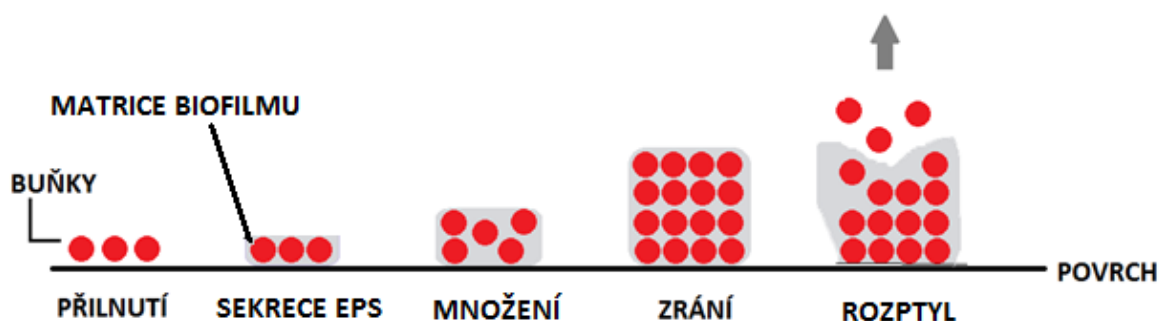
Ve druhém stupni dojde k ireversibilní vazbě k povrchu. Buňky produkují a sekretují extracelulární polymerní látky (EPS), které obsahují DNA, proteiny, lipidy a lipopolysacharidy. Tyto látky usnadní přilnutí bakterií k povrchu a jejich následné množení.

Třetí stupeň tvorby biofilmu je charakteristický množením a vznikem mikrokolonií. Tyto bakterie produkují EPS a zapouzdřují se ve vrstvě hydrogelu, který tvoří fyzickou bariéru mezi společenstvím mikroorganismů a extracelulárním prostředím. Složení EPS se liší podle druhu bakterie a vnějších podmínek. Produkce EPS se řídí pomocí komunikace mezi jednotlivými bakteriemi. Mikrobiální komunikaci obstarává quorum sensing (QS) systém, jakožto hlavní mechanismus k získání informací o vnějším prostředí (Renner and Weibel, 2011; Schindler, 2014). Jednotlivé buňky produkují a vypouštějí malé QS signální molekuly a zároveň jsou schopné detekovat signál z okolí. Nejznámějšími typy QS systému zahrnují u Gram negativních bakterií N-acyl-homoserin lakton (AHL) a 4-quinolonový systém, zatímco u Gram pozitivních bakterií nacházíme doplňkový genový regulátor proteinu D – AgrD (Gene, 2015). U obou kategorií jsou přítomny signální molekuly - autoinduktory 2 (AI-2) a geny kódující enzymy a další látky luminiscenčního systému (luxs). QS systém hraje velkou roli při zrání biofilmu (Chen and Wen, 2011). Řídí spousty bakteriálních funkcí zahrnujících patogenezí, získávání živin, konjugaci, pohyb a produkci sekundárních

metabolitů (Renner and Weibel, 2011; Schindler, 2014). Porucha komunikace mezi buňkami vede k tomu, že bakterie zůstanou v planktonním stavu (Chen and Wen, 2011).

Ve čtvrtém stupni společenstvo bakterií roste ve 3D struktuře a uzrává až do podoby biofilmu. Buňky biofilmu jsou k sobě připojeny pomocí EPS, což jim umožňuje odolávat mechanickému stresu a odloučení od povrchu substrátu.

Během posledního tedy pátého stupně tvorby biofilmu se některé buňky z biofilmu uvolní, přejdou do planktonního stavu a putují extracelulární tekutinou na jiné místo, kde založí tvorbu nového biofilmu. Tento poslední krok je velmi důležitý pro rozmnožování a obnovování bakteriálních kolonií (Renner and Weibel, 2011; Schindler, 2014).



Obrázek 1: Stádia tvorby biofilmu (upraveno dle Moormeier and Bayles, 2017).

3. Regulace tvorby biofilmu u rodů *Pseudomonas* a *Burkholderia*

V této kapitole jsou porovnány mechanismy regulací tvorby biofilmů u bakterií *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cenocepacia*.

Tvorba biofilmu je u těchto bakterií regulována pomocí cyklického diguanosin-5'-monofosfátu (c-di-GMP), sRNA a QS systému. C-di-GMP reguluje produkci exopolysacharidů a povrchových proteinů, jejichž funkce se v extracelulární matrix liší podle druhu bakterie. Systémy, které využívají sRNA, regulují produkci exopolysacharidů. U pseudomonád QS systém reguluje produkci extracelulární DNA, lektinů a biosurfaktantů, které ovlivňují tvorbu biofilmu. U bakterií *Burkholderia cenocepacia* QS systém reguluje expresi velkých povrchových proteinů, lektinů a extracelulární DNA, které jsou součástí matrix biofilmu. Ačkoliv všechny tři systémy regulují produkci faktorů nutných pro tvorbu biofilmu, molekulární mechanismus je odlišný v závislosti na druhu bakterie. Exopolysacharidy se jeví jako nejdůležitější součást matrice biofilmu pro *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco pro *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* a *Burkholderia cenocepacia* jsou nejdůležitější velké povrchové proteiny A a F (lapA a lapF) (Fazli *et al.*, 2014).

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

3.1.1 Regulace tvorby biofilmu u *P. aeruginosa* pomocí c-di-GMP

Hlavní látkou pro tvorbu biofilmu u *Pseudomonas aeruginosa* je cyklický diguanosin-5'-monofosfát (c-di-GMP), neboť jeho vysoká hladina v intercelulární tekutině vyvolá produkci adhezínů a extracelulárních složek, které umožní tvorbu biofilmu. Nízký obsah c-di-GMP zamezí produkci adhezínů a extracelulárních složek a buňky zůstávají v planktonním stavu (Fazli *et al.*, 2014).

U *Pseudomonas aeruginosa* c-di-GMP stimuluje především syntézu tří odlišných extracelulárních polysacharidů – Pel, Psl a alginátu. Dále podporuje tvorbu extracelulárního bílkovinného adhezínu CdrA (Irie *et al.*, 2012; Borlee *et al.*, 2010).

Polysacharid Psl je bohatý na manózu a galaktózu a je zapojen především do počátečního uchycení biofilmu k povrchu. Psl je produkován během planktonního růstu, kde zprostředkovává spojení s povrchy, a tím přispívá k tvorbě mikrokolonií (Ghafoor *et al.*,

2011). Psl vytváří signál pro stimulaci dvou diguanosylcykláz – SiaD a SadC, aby produkovaly intracelulární druhé posly c-di-GMP. Zvýšená intracelulární koncentrace c-di-GMP vede ke zvýšení produkce Psl a dalších komponent biofilmu. Mechanismus tvorby c-di-GMP a Psl je tedy cyklus řízený pozitivní zpětnou vazbou, což vede k nárůstu a rozšíření biofilmu (Irie *et al.*, 2012).

Pel je polymer podobný celulóze. Jeho složení je bohaté na glukózu. Pel je nezbytný pro tvorbu peletu (drobných částec) na rozhraní vzduch-kapalina. Zvýšená produkce Pel se může projevit fenotypově v podobě zvrásněných kolonií. Pel hraje roli v interakcích mezi buňkami v biofilmech *Pseudomonas aeruginosa*, které vytvářejí strukturální kostru v časně fázi tvorby biofilmu (Ghafoor *et al.*, 2011).

Algináty jsou soli kyseliny alginové. Kyselina alginová je směsný polymer složený zejména ze zbytku 1,4-D-mannurové kyseliny a 1,4-L-glukoronové kyseliny. (Ghafoor *et al.*, 2011; Sand *et al.*, 2011). Slouží k ochraně bakterií před nepříznivými účinky ve svém okolí a také zvyšuje přilnavost k pevným povrchům. Transkripce biosyntetických genů alginátu je indukována po připojení k substrátu, což vede k jeho zvýšené produkci (Boyd *et al.*, 1995). Nadprodukce alginátu vede k mukóznímu fenotypu, který je často pozorovaný u bakteriálních kmenů izolovaných z plic pacientů trpících chronickou fibrózou (Fazli *et al.*, 2014).

FleQ je dalším z exopolysacharidů tvořených za podpory c-di-GMP. Jeho hlavní činností je biosyntéza bičíků u *Pseudomonas aeruginosa*. Spolu s c-di-GMP mohou regulovat transkripci genů, kódovat syntézy a transport extracelulárních bílkovinných adhezínů (CdrA) z vnější membrány. Vazba c-diGMP na FleQ potlačuje expresi bičíkovitých biosyntetických genů.

Syntéza a degradace c-di-GMP je řízena opačnou aktivitou fosfodiesterázy a diguanylátové cyklázy (DGC). Jednou z potřebných látek pro DGC je dvousložková odpověď řídící regulátor WspR. Po přilnutí bakterií k povrchu dojde k aktivaci chemoreceptorů. Ty fosforylují WspR, který v této podobě stimuluje syntézu c-di-GMP. Oligoizomerace WspR zvyšuje aktivitu jím produkované cyklázy, což má za následek zvýšení syntézy c-di-GMP a tedy i tvorby biofilmu (Fazli *et al.*, 2014).

3.1.2 Role QS systému při tvorbě biofilmu u *P. aeruginosa*

P. aeruginosa tvoří dva hlavní QS systémy - *las* a *rhl*, které řídí produkci signálních molekul N-(3-oxododekanoyl)-L-homoserin laktonů a N-butanoyl-L-homoserin laktonů (Obr.2).

Systém *las* se podílí na tvorbě a zrání biofilmu u divokých typů bakterií.

Rhl systém zasahuje do procesu tvorby biofilmu obohacením Pel polysacharidů při jejich biosyntéze. *Rhl* systém kontroluje produkci rhamnolipidů, které jsou potřebné k tvorbě mikrokolonií. Udržují otevřené kanálové struktury, které zabraňují kolonizaci nežádoucích bakterií tím, že narušují vzájemné interakce buněk s buňkami na povrchu. Dále usnadňují tvorbu trojrozměrných houbovitých struktur biofilmu a pomáhají buněčné disperzi a tedy rozšiřování biofilmu. *Rhl* také reguluje expresi lektinů LecA a LecB, což jsou cytotoxické faktory virulence, které přispívají k vývoji biofilmu u *Pseudomonas aeruginosa*.

Třetí QS systém je založen na chinolonových signálech, které interagují s N-acyl-homoserin laktony (AHL).

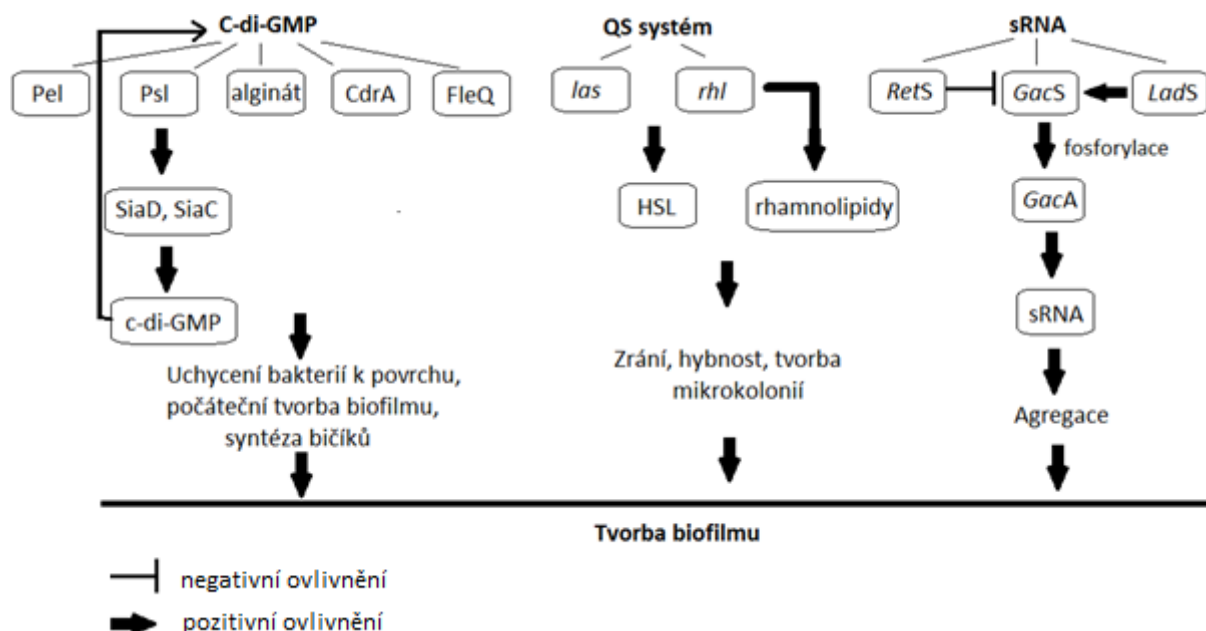
QS systém plní další důležitou roli při tvorbě biofilmu, a to takovou, že kontroluje rotační pohyby a záškuby, které jsou důležité pro prvotní tvorbu biofilmu. Rotační pohyby závisí na množství bičíků a kontaktu buněk mezi sebou. Škubavé pohyby jsou řízeny *rhl* systémem a jsou nezbytné pro shromáždění buněk *Pseudomonas aeruginosa* do jedné vrstvy tvořící mikrokolonie (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

3.1.3 Regulace tvorby biofilmu pomocí sRNA

U *Pseudomonas aeruginosa* hraje také velkou roli při tvorbě biofilmu sRNA (Fazli *et al.*, 2014). Při nízké hladině kyslíku aktivuje translaci quorum sensing systému, čímž podpoří vznik biofilmu (Gimpel *et al.*, 2017). Gen *retS* (regulátor sekrece exopolysacharidů typu III) je důležitý pro agregaci a tvorbu biofilmu. Kóduje senzorkou kynázu, která je součástí regulačního systému. Tento systém zahrnuje také senzorké kynázy GacS a senzorký protein ztráty přilnavosti LadS. GacS fosforyluje regulátor odezvy GacA, čímž dojde k jeho aktivaci. Aktivovaný GacA se poté pozitivně podílí na transkripci sRNA. Fosforylace GacA je stimulována pomocí LadS, proti kterému antagonisticky působí *retS* (Fazli *et al.*, 2014).

3.1.4 Další faktory

Dalším faktorem pro tvorbu biofilmu jsou mastné kyseliny. Jejich role spočívá především v rozptýlení biofilmu (Fazli *et al.*, 2014).



Obrázek 2: Regulace tvorby biofilmu u *Pseudomonas aeruginosa*

(upraveno dle Fazli *et al.*; 2014).

3.2 *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*

3.2.1 Regulace tvorby biofilmu pomocí c-di-GMP

Stejně jako u *Pseudomonas aeruginosa* je c-di-GMP hlavním klíčem pro tvorbu biofilmu také u *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas fluorescens* (Obr. 3).

U *Pseudomonas fluorescens* se liší tvorba biofilmu dle morfortypu, avšak všechny principy vedou k nadprodukci acetylovaného exopolysacharidu z celulózy, který je kódován skupinou genů pro rozšíření zvrásněných kolonií. Na tvorbě tohoto exopolysacharidu se podílí i c-di-GMP. *Pseudomonas putida* produkuje navíc kromě celulózy tři další exopolysacharidy – alginát, exopolysacharid A a exopolysacharid B.

C-di-GMP reguluje přítomnost proteinu pro přilnavost na povrchu buněk jak u *Pseudomonas putida*, tak i u *Pseudomonas fluorescens*. Přítomnost velkého přilnavého proteinu LapA na povrchu buněk je regulována periplazmatickou proteázou LapG, která štěpí N-konec LapA, čímž dojde k uvolnění LapA z buněčného povrchu. Aktivita LapG je řízena vnitřním membránovým proteinem LapD. Prostřednictvím periplazmatické domény LapD zabraňuje působení LapG na LapA. LapD je navázáno na c-di-GMP jednou ze svých domén, čímž je umožněna interakce mezi LapD a LapG. Snížení hladiny c-di-GMP vede k rozptýlení vybudovaného biofilmu. To znamená, že snížením hladiny c-di-GMP dojde k odpojení LapG z vazby s LapD. LapG poté působí na LapA, čímž umožní LapA, aby se uvolnil z vnější membrány, a to vede ke zhroucení struktury a integrity biofilmu.

LapA pomáhá účinné kolonizaci spolu s druhým velkým povrchovým adhezinem LapF, který se vyskytuje pouze u *Pseudomonas putida* (Fazli *et al.*, 2014; Jiménez-Fernández *et al.*, 2015; Martínez-Gila *et al.*, 2013; Rybtke *et al.*, 2015).

3.2.2 Role QS systému při tvorbě biofilmu

Stejně jako u *Pseudomonas aeruginosa* je quorum sensing systém založen na produkci AHL.

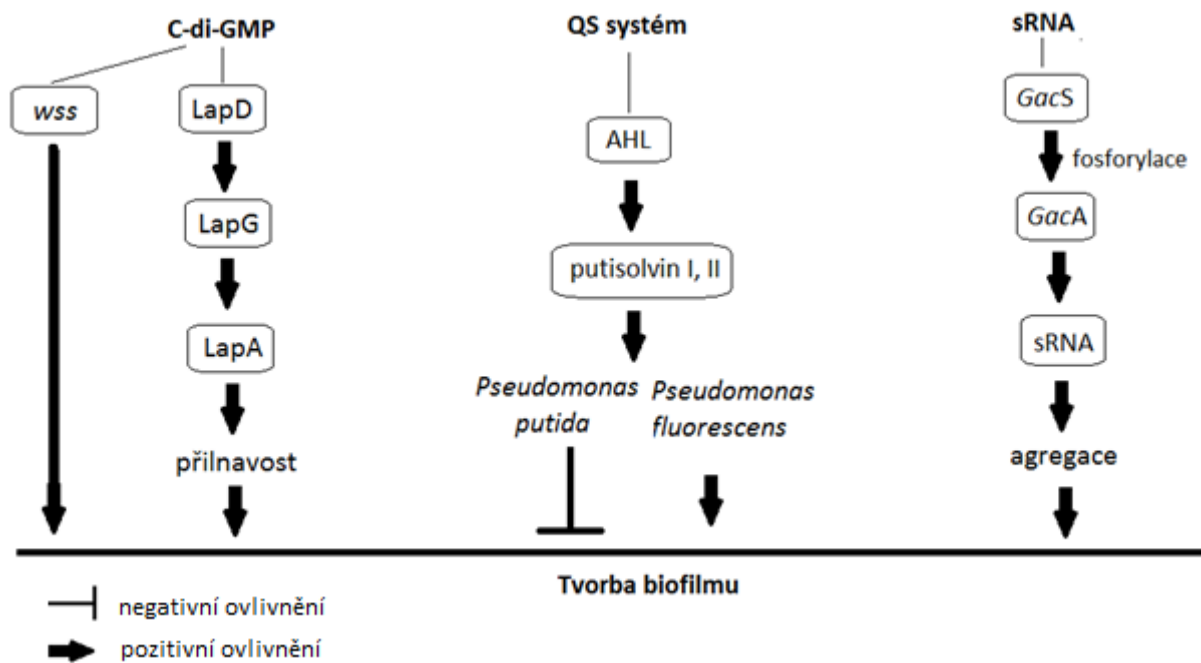
U mutantních kmenů *Pseudomonas putida* s nedostatečným QS systémem se tvoří vysoce strukturální proteiny v porovnání s nediferenciovanými biofilmy divokých typů bakterií. QS systém u *Pseudomonas putida* také reguluje tvorbu cyklických lipopeptidů – putisolvin I a II. Tyto lipopeptidy fungují jako biosurfaktanty, které snižují povrchové napětí a pozitivně ovlivňují hybnost bakterií (Cárcamo-Oyarce *et al.*, 2015; Fazli *et al.*, 2014). Většina genů pro tvorbu biofilmu u *Pseudomonas putida* je negativně ovlivněna QS systémem, zatímco u *Pseudomonas fluorescens* je toto ovlivnění pozitivní (Fazli *et al.*, 2014).

3.2.3 Ovlivnění tvorby biofilmu pomocí sRNA

Stejně jako u *Pseudomonas aeruginosa* se na tvorbě biofilmu podílí systém senzorických kynáz GacA a GacS. GacS se pozitivně podílí na expresi genů, které jsou zahrnuty při syntéze exopolysacharidů, cyklických lipopeptidů a c-di-GMP (Fazli *et al.*, 2014).

3.2.4 Přídavné faktory

U *Pseudomonas putida* má pozitivní efekt na tvorbu biofilmu FleQ. U *Pseudomonas fluorescens* se FleQ podílí na adhezi k povrchům a na tvorbě bičků. Je také hlavním regulátorem hybnosti a produkce exopolysacharidů (Fazli *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Regulace tvorby biofilmu u *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas fluorescens* (upraveno dle Fazli *et al.*; 2014).

3.3 *Burkholderia cenocepacia*

3.3.1. Regulace tvorby biofilmu pomocí signální c-di-GMP

Zvýšená hladina c-di-GMP v intracelulárním prostoru vede ke tvorbě zvrásněných kolonií a jejich morfologie úzce souvisí se zvýšenou schopností tvořit biofilm. Signální molekula c-di-GMP je ovlivňována pomocí AHL a BDSF (*Burkholderia* difúzní signální faktor) QS systémem. BDSF negativně ovlivňuje intracelulární množství c-di-GMP pomocí receptoru RpfR. BDSF stimuluje receptory RpfR, čímž dojde ke snížení hladiny intracelulární molekuly c-di-GMP (Fazli *et al.*, 2014).

3.3.2 Role QS systému při tvorbě biofilmu

QS systém u *Burkholderia cenocepacia* se skládá ze dvou AHL syntáz a tří regulačních proteinů, které regulují genovou expresi (Obr. 4). CepIR systém je přítomen

u všech bakterií rodu *Burkholderia*, zatímco CciIR systém nacházíme pouze u *Burkholderia cenocepacia*. Oba tyto hlavní regulátory slouží ke kontrole aktivit proteáz, lipáz, kontrole pohyblivosti bakterií, tvorbě biofilmu a jeho zrání. CepIR je primárně zodpovědný za syntézu N-oktanoyl-L-homoserin laktonu (OHL) a malého množství N-hexanoyl-L-homoserin laktonu (HHL). CepIR má největší afinitu k OHL a může fungovat jak pozitivně, tak negativně jako regulátor genů. CciIR primárně syntetizuje HHL s malým množstvím OHL. (O'Grady *et al.*, 2012)

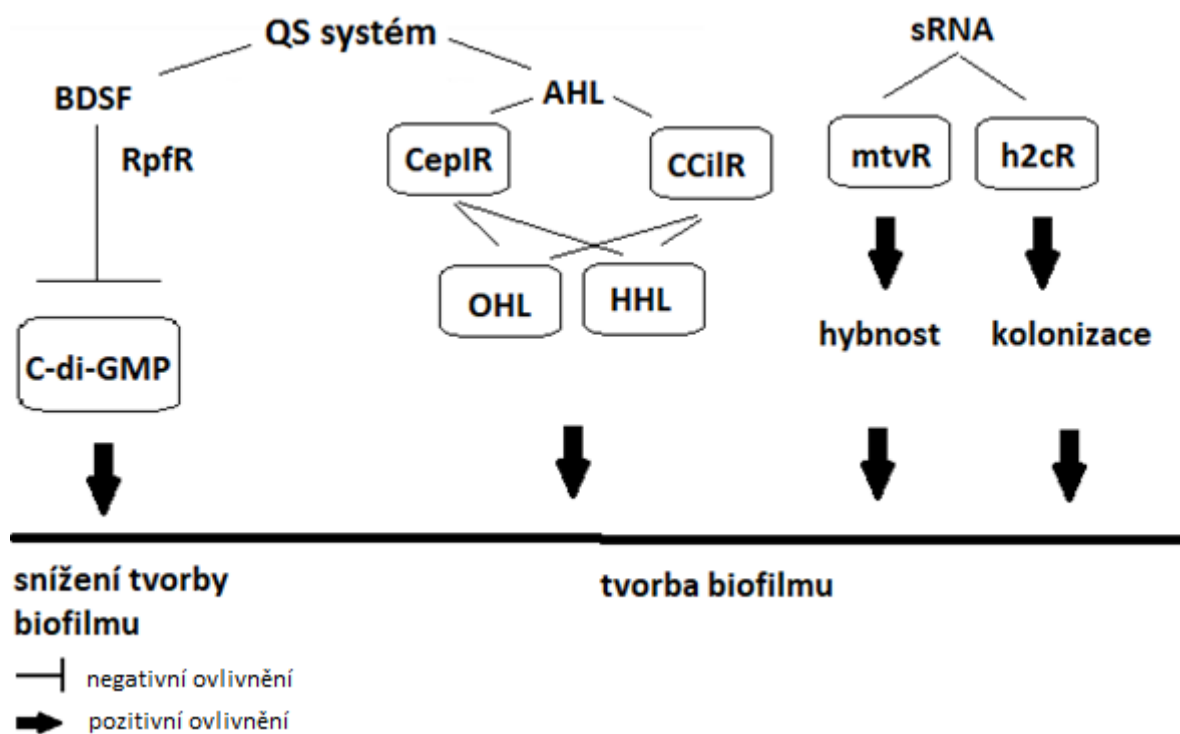
CepIR a CciIR se navzájem ovlivňují. CepIR pozitivně reguluje transkripci CciIR. CciIR reguluje CepIR negativní zpětnou vazbou. Vysoký obsah HHL inhibuje aktivitu CepIR (Fazli *et al.*, 2014; Schmid *et al.*, 2012).

3.3.3 sRNA

U druhu *Burkholderia* je sRNA velmi důležitá molekula pro přežití bakterií v lidském hostiteli. Jsou zde přítomny dvě hlavní sRNA molekuly, a to molekula mtvR a h2cR. MtvR se u *Burkholderia cenocepacia* podílí na regulaci hybnosti, tvorbě biofilmu, reakci na stres a virulenci. H2cR hraje roli v kolonizaci bakterií (Fazli *et al.*, 2014).

3.3.4 Přídavné faktory

Hybridní senzorká kynáza AtsR negativně reguluje QS systém založený na produkci AHL. Ovlivňuje expresi CepIR a CciIR, tedy i tvorbu biofilmu (Fazli *et al.*, 2014).



Obrázek 4: Regulace tvorby biofilmu u *Burkholderia cenocepacia*

(upraveno dle Fazli *et al.*; 2014).

4. Regulace tvorby biofilmu u *Escherichia coli*

Tvorba biofilmu u *Escherichia coli* a dalších enterobakterií zahrnuje regulaci syntézy bičíků a komponent biofilmové matrice, jako jsou amyloidní vlákna, celulóza, kyselina kolanová a poly- β -1,6-*N*-acetylglukosamin (PGA). Růst biofilmu je řízen několika faktory, které soutěží o RNA polymerázu, transkripční faktory, nukleotidní messengery zahrnující i c-di-GMP. Motilitu a tvorbu biofilmu ve velkém ovlivňuje sRNA (Boehm *et al.*, 2009; Mika *et al.*, 2013).

U *Escherichia coli* se matrice biofilmu skládá z bílkovinných komponent, včetně různých adhezínů, vláken typu kudrlinky, které mohou být propletené s celulóзовými exopolysacharidy, PGA a kyselinou kolanovou. Tyto složky tvoří kolem bakterií 3D strukturu, která je obklopuje a chrání před vysycháním, antibiotiky či imunitním systémem hostitele. Složení biofilmu závisí na teplotě, růstových podmínkách a genetické predispozici stejně jako u předchozích bakterií (Mika *et al.*, 2013, Prüß *et al.*, 2010).

4.1 Uchycení na povrch

K uchycení bakterií na povrch využívá *Escherichia coli*, která roste při teplotě 37 °C, fimbrie, zkadeřená vlákna, adheziny, a PGA, jenž stabilizuje permanentní uchycení. Zatímco při teplotě menší než 30 °C využívá k uchycení bičíky, zkadeřená vlákna, celulózu a kyselinu kolanovou.

Změna z planktonního růstu na tvorbu biofilmu je obstarávána dvěma kaskádami. Jedna je řízena pomocí DNA vázajícího duálního regulátoru – flhDC (bičíková) a druhá je řízena transkripčním regulátorem vázajícím DNA - MlrA/CsgD. Tyto kaskády se aktivují ve stacionární fázi života buňky, mají-li k tomu dostatečné podmínky, co se týče živin a teploty. Konečnou tvorbu bičíků a složek biofilmové matrix obstarává flagelární transkripční regulátor fliZ a opačný regulátor c-di-GMP (Mika *et al.*, 2013).

FlhDC, aktivátor bičíkové regulační kaskády třídy I, je řízen v pozdějším post-exponenciálním růstu, kdy se planktonní buňky začnou pohybovat. FlhDC ovlivňuje σ^F sigma faktor, který je kódován genem II. třídy *fliA* a který spolupracuje s geny III. třídy. Společně se podílí na tvorbě bičíků. Vyvolá se faktor stacionární fáze (σ^S), zatímco formace obsahující RNAP holoenzym zůstává neefektivní až do té doby, než se nahromadí doplňkové faktory Crl a Rsd. Exprese mnoha σ^S dependentních genů je inhibována faktory, které se uplatňují

v bičkové kaskádě. Buď se regulátor II. třídy FlhZ naváže na prvek se specifitou k σ^S dependentním genům, nebo se využije molekuly c-di-GMP. C-di-GMP se uplatňuje při tvorbě bičků, biofilmu a regulace virulence. Aktivuje transkripci *csgD* genu, což vede ke kódování regulátoru celulózy CsgD. Sigma F dependentní diguanylát fosfodiesteráza (YhjH) způsobuje degradaci c-di-GMP. Udržování nízké hladiny c-di-GMP pomocí YhjH způsobí, že bičková kaskáda pracuje proti inhibici motorické funkce systému za pomoci proteinu účastnícího se flagelace (YcgR), vláknitého proteinu vázajícího c-di-GMP (PilZ), který je aktivován pomocí c-di-GMP (Mika *et al.*, 2013).

4.2 Stacionární fáze

Když dostupnost živin dále klesá, buňky vstupují do stacionární fáze, kde σ^S přebírá jadrový enzym RNA polymeráza (RNAP) na úkor σ^{70} , σ^F a dalších sigma podjednotek. Výsledkem je, že přepis genu *flhDC* končí a díky proteolytické degradaci FlhDC a σ^F dojde k ukončení flagelární kaskády, včetně exprese genu fosfodiesterázy *yhjH*. σ^S přispívá k zastavení činnosti bičků tím, že řídí expresi dvou diguanylát cykláz (DGC) – YegE a YedQ, které generují c-di-GMP, jenž aktivuje YcgR, aby došlo ke zpomalení flagelární rotace. Dále σ^S aktivuje expresi transkripčního faktoru MlrA, který společně se σ^S -RNAP aktivuje při teplotách pod 30°C transkripci na promotor *csgD*. Tento proces je dále modulován pomocí OmpR a několika dalších transkripčních faktorů. CsgD řídí syntézu biofilmu matricové komponenty zkadeřených vláken a celulózy. Produkce zkadeřených vláken je přímo aktivována vazbou transkripčního faktoru CsgD na promotor *csgBAC* operonu, který kóduje hlavní podjednotku CsgA, nukleární protein CsgB a periplasmatický pomocný protein. Regulace syntézy celulózy podléhá další kontrole c-di-GMP prostřednictvím CsgD-dependentní DGC YaiC (AdiA), pomocí celulóзовé syntézy BcsA, která přímo váže c-di-GMP na jeho PilZ doménu.

4.3 Regulace dalších komponent biofilmové matrix

Další komponenty biofilmové matrix, jako je kyselina kolanová či PGA nejsou ovlivněny kaskádou zkadeřených vláken nebo celulózy, ale patří k regulačním látkám transkripčních faktorů spojených s biofilmem. Výroba kyseliny kolanové závisí na dvousložkovém systému RcsC/RcsB, který může v buňkách rozpoznat poruchy a souvisí se zráním biofilmu. Částečně spolupracuje s různými dalšími transkripčními faktory. Fosforylovaný regulátor odezvy RcsB neaktivuje pouze geny, které se podílejí na kyselině kolanové, ale také stimuluje expresi sRNA, část nekódující DNA (RprA) a další cílové geny.

Navíc RcsB inhibuje expresi genu *flhDC*, čímž má negativní vliv na motilitu. σ^S moduluje Rcs systém pomocí kontroly exprese malého proteinu YmgB, který stimuluje aktivitu Rcs systému. Celkově se zdá, že Rcs systém reguluje expresi bičíků a pozdní funkce biofilmu. Syntéza PGA je potlačovaná vysokou koncentrací NaCl a vysokou teplotou, což umožňuje bakteriím měnit složení biofilmu na základě měnících se vnějších podmínek (Mika *et al.*, 2013). *Pga* geny jsou uspořádány v *pgaABCD* operonu. Ten je regulován na principu negativní vazby pomocí RNA vázacího proteinu CsrA. (Boehm *et al.*, 2009). Regulační systém pro ukládání uhlíku (Csr) řídí změnu *Escherichia coli* z kolonizačního stavu na trvalý. Csr systém u *Escherichia coli* je složen z aminokyselin, CsrA proteinu pro regulaci ukládání uhlíku a dvou malých RNA nekódujících regulátorů CsrB a CsrC (Mitra *et al.*, 2013). Hladiny CsrA jsou vysoké, dokud zdroje uhlíku nelimitují růst a přispívají k expresi bičíků, přičemž současně potlačují složku biofilmu PGA. CsrA také reguluje geny pro dvě diguanylát cyklázy YcdT a YdeH, které podporují syntézu PGA. CsrA je antagonisticky řízeno pomocí dvou sRNA – CsrB a CsrC (Mika *et al.*, 2013).

4.4 Regulace bičíkové kaskády

FlhDC operon kóduje hlavní regulátor exprese bičíků u *Escherichia coli*. McaS (multi-buněčná adhezivní sRNA) přímo aktivuje *flhDC* mRNA vazbou na dvě oblasti *flhD*. McaS je součástí regulátoru CRP, který řídí metabolismus uhlíku. *FlhD* se skládá do dlouhé inhibiční kmenové smyčky. McaS otevírá tuto strukturu za účelem zvýšení dostupnosti pro ribozomy. Druhá sRNA je realizátorem nestability mRNA (MicA). Její nadměrná exprese zvyšuje pohyb v agarových miskách. MicA reguluje některé poriny vnější membrány (Mika *et al.*, 2013).

5. Regulace tvorby biofilmu u *Staphylococcus aureus*

Změna z planktonního růstu do podoby biofilmu je řízena několika faktory, jako jsou vnější podmínky a řídicí mechanismy mezi buňkami.

Přítomnost operonu – intracelulárního adhezinu ADBC je velmi důležitá pro přichycení bakterií k povrchu a tvorbu biofilmu. Tento operon kóduje enzymy, které zapřičiňují produkci polysacharidového intracelulárního adhezinu - polymeru β -1,6-*N*-acetylglukosaminu na povrchu *Staphylococcus aureus*. Exprese operonu - intracelulárního adhezinu a tedy i tvorby biofilmu úzce souvisí s teplotou, osmolaritou, výživností substrátu a koncentrací inhibitorů (například antibiotik). Dalšími povrchovými proteiny, které se podílejí na přilnutí bakterií k povrchu a tvorbě biofilmu jsou proteiny A a B vázající fibronetkin, proteiny vázající kolagen a shlukovací faktory A a B (Boles *et al.*, 2010; Fereshteh and Taraneh., 2011; Lin *et al.*, 2012; Moormeier and Bayles, 2017).

Biofilmy tvořené bakteriemi *Staphylococcus aureus* procházejí pěti stádii - přilnutí buněk k povrchu, tvorba mikrokolonií, agregace, zrání biofilmu a disperze (Moormeier and Bayles, 2017).

5.1 Přilnutí buněk k povrchu

V první fázi zrání biofilmu dochází k uchycení bakterií na povrch, tak jako v předchozích případech. Využívány jsou k tomu různé proteiny zakotvené v buněčné stěně, jejichž specifita záleží na matricových substrátech hostitele. Patří sem například povrchové proteiny, které rozpoznávají adhezivní matrixové molekuly. Některé z nich mají společné povrchové znaky, ale liší se ve druhu připojení na komponenty hostitelské matrice. Některé využívají fibronetkin, jiné fibrinogen, kolagen či cytokeratin. Dříve se mělo za to, že velkou roli při přichycení biofilmu k neživým povrchům mají extracelulární proteiny. Avšak ukázalo se, že více se uplatňují elektrostatické a hydrofobní interakce mezi molekulami (Kim *et al.*, 2014; Moormeier and Bayles, 2017).

Další důležitou látkou pro adhezi buněk je pouzderý polysacharidový adhezin bohatý na galaktózu či glukózu. Skládá se z polymeru o vysoké molekulové hmotnosti - β -1,6-*N*-acetylglukosaminu s fosfátovou skupinou a se sukcinátovými nebo acetátovými substituenty aminoskupin. Díky němu má bakteriální pouzdro hydrofobní charakter. Další funkcí tohoto

adhezinu je ochrana proti nepřátelským buňkám imunitního systému hostitele (Lavery *et al.*, 2013).

5.2 Tvorba mikrokolonií

Zmnožení biofilmu nastává po přisednutí bakterií *Staphylococcus aureus* k povrchu. Buňky se začnou dělit a jejich počet začne narůstat. Nicméně tyto buňky jsou samostatně velmi zranitelné dokud se nevytvoří matrice biofilmu, do které se vkládají nově vytvořené dceřiné buňky. K udržení stability tohoto doposud nezralého biofilmu vytváří *Staphylococcus aureus* faktory, jež pomáhají stabilizovat dělení buněk a nárůst jejich počtu. Vytváří extracelulární proteiny, které tyto úkony usnadňují. Jsou to proteiny ukotvení buněčné stěny spadající do kategorie mikrobiálních povrchových složek rozpoznávajících přilnavé molekuly matrice, jako například fibronectin vázající protein, agregační faktor f, protein C obsahující opakující se sekvenci serin-aspartát, protein A, povrchový antigen a povrchový protein spojený s biofilmem. Dále se zde uplatňuje intracelulární polysacharidový adhezín, jehož koncentrace závisí na podmínkách prostředí (Moormeier and Bayles, 2017).

5.3 Agregace

Následující fází je agregace, při které dochází ke spojování mikrokolonií, což vede k přestavbě struktury biofilmu. Hlavním mechanismem je degradace extracelulární DNA pomocí DNAázy. Molekula extracelulární DNA je důležitá pro celkovou celistvost biofilmu. Regulátor tohoto mechanismu je doplňkový genový regulátor quorum sensing systému (*agr*-QS), který se mimo jiné podílí i na připojení buněk k povrchu (Lavery *et al.*, 2013; Moormeier and Bayles, 2017).

5.4 Zrání biofilmu

Zrání biofilmu pokračuje u mikrokolonií z odlišných ohnisek buněk, které byly připojeny během agregační fáze. Tato fáze se vyznačuje buňkami, které tvoří robustní agregáty složené z proteinů (např. modulin rozpustný ve fenolu - PSM) a z extracelulární DNA. Na shluknutí buněk a následné zrání biofilmu se podílí slizový adhezín (Lavery *et al.*, 2013; Moormeier and Bayles, 2017).

5.5 Disperze

Rozptýlení biofilmu u *Staphylococcus aureus* je pod kontrolou *agr*-QS. Jako jiné quorum sensing systémy je i *agr*-QS závislý na hustotě signálních molekul tzv. autoinduktorů.

Autoindukční peptid se akumuluje v kultivačním médiu a po dosažení prahové koncentrace se naváže na histidinkinázu AgrC, čímž ji aktivuje. Poté dojde k fosforylaci regulátoru odezvy AgrA, který iniciuje transkripci z promotoru P3, jenž reguluje expresi faktorů virulence a jiných genů podporujících tvorbu biofilmu. PSM fungují jako aktivní látky narušující molekulární interakce uvnitř biofilmu, čímž dojde k jeho rozptýlení. Avšak agregace PSM do nerozpustných amyloidních vláken přispívá k udržení struktury biofilmu. Přítomnost extracelulární DNA podporuje tvorbu těchto amyloidních látek. Je tedy důležitá pro správný vývoj biofilmu (Lavery *et al.*, 2013; Moormeier and Bayles, 2017).

6. Regulace tvorby biofilmu u *Staphylococcus epidermidis*

Pro uchycení k libovolnému povrchu má *Staphylococcus epidermidis* na svém povrchu proteiny, které zprostředkovávají interakci s extracelulární matricí hostitele. Mají schopnost navázat se na kolagen, vitronektin, fibronektin a fibrinogen. Mezi tyto povrchové proteiny patří například kolagen vázající extracelulární lipáza a velký fibrinogen vázající protein (Büttner *et al.*, 2015).

Pouzderný polysacharidový adhezin a další proteiny zahrnující i autoliziny se podílejí na přilnutí k povrchu. Zvětšování počtu buněk a jejich hromadění se děje díky produkci intracelulárního polysacharidového adhezinu β -1,6-*N*-acetylglukosaminu. Ten navíc uděluje hydrofobní charakter bakteriálnímu pouzdru. β -1,6-*N*-acetylglukosamin je kódován pomocí operonu – intracelulárního adhezinu, jehož mechanismus je stimulován v závislosti na vnějších podmínkách (Büttner *et al.*, 2015; Fredheim *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016).

Dalším faktorem pomáhajícím s přichycení k povrchu je buněčný protein AtlE, který se váže k plasmatickým proteinům, jako například k vitronektinu přítomnému v podmiňující vrstvě vytvořené na implantovaných biomateriálech.

Kyselina teichoová se také uplatňuje ve schopnosti buněk přilnout k povrchu. Vytváří na povrchu buněk negativní náboj. Produkce kyseliny teichoové je řízena genem pro tvorbu kyseliny teichoové (*tag*). Elektrostatické odpuzivé síly indukované zvýšenou buněčnou negativitou vedou k prevenci adheze bakterií na polystyren a sklo. Míra negativního náboje na povrchu buněk je regulována pomocí tvorby D-alaninu, který se začlení do kyseliny teichoové (Lavery *et al.*, 2013).

Nahromadění buněčného agregátu je řízeno především operonem intracelulárního adhezinu *ADBC*. Vytváří intracelulární adhezin a pouzderný polysacharidový adhezin, díky kterým dochází k seskupení buněk na povrchu. Polysacharidový intracelulární adhezin se může skládat z polysacharidového intracelulárního adhezinu I nebo II.

Deacylovaný *N*-acetylglukosamin tvoří 15-20 % polysacharidového intracelulárního adhezinu a je nezbytný pro jeho funkci. Napomáhá schopnosti kolonizovat, tvořit biofilmy a odolávat fagocytóze hostitelských buněk imunitního systému.

K rozptýlení biofilmu dochází stejně jako u *Staphylococcus aureus* za pomoci *agr*-QS fungujícího za pomoci autoinduktorů (Laverty *et al.*, 2013).

7. Tvorba biofilmu u *Listeria monocytogenes*

Na intenzitu počátečního uchycení biofilmu kmene *Listeria monocytogenes* k povrchu má vliv množství bičků. U mutantního kmene *Listeria monocytogenes* bez bičků byla zjištěna nižší intenzita uchycení biofilmu na povrch (Nguyen *et al.*, 2014). Pro tvorbu bičků je důležitý regulátor odpovědi na vazbu s DNA (DegU). ABC transportní permeáza ovlivňuje expresi několika genů, včetně povrchového proteinu D-alanin-poly(fosforbitol)ligázy, kotvící povrchový protein sortáza A a transkripční regulátor (Wassinger *et al.*, 2013).

Ireversibilní přichycení zajišťují extracelulární polymerní substance (EPS), které jsou stejně jako u *Pseudomonas aeruginosa* aktivovány přes quorum sensing systém. U *Listeria monocytogenes* jsou EPS složeny především z proteinů a nukleových kyselin (extracelulární DNA) (Nguyen *et al.*, 2014).

Listeria monocytogenes produkuje autoinduktory typu 2 a *luxS* geny, které ovlivňují regulaci biofilmu. Geny *luxS* kódují S-ribosylhomocysteinázu, která katalyzuje hydrolyzu S-ribosylhomocysteinu na homocystein a 4,5-dihydroxy-2,3-pentadion (Bonsaglia *et al.*, 2013).

Genový regulátor QS systému na bázi peptidu Agr zpracovává odpovědi na povrchu buněk. Při nedostatku regulátoru odpovědi AgrA a prekursorového peptidu AgrD dochází k poklesu počátečního připojení a tvorby biofilmu. Po úspěšném přichycení se tvoří malé mikrokolonie, které následně dozrávají v plnohodnotný biofilm. Poté nastává poslední fáze, kterou je rozptýlení buněk z již vytvořeného biofilmu (Nguyen *et al.*, 2014). AgrD-QS hraje roli v expresi genů, které jsou zahrnuty v tvorbě biofilmu. (Wassinger *et al.*, 2013).

8. Regulace tvorby biofilmu u *Streptococcus pneumoniae*

Matrice biofilmu u *Streptococcus pneumoniae* se skládá z proteinů, polysacharidů a DNA. Přítomnost DNAázy I, trypsinu a proteázy K zabraňuje brzké tvorbě biofilmu. Pro tvorbu biofilmu je vyžadován protein vázající cholin. Dalšími důležitými složkami jsou pneumokokové proteiny bohaté na serin (PsrP) a NanA neuraminidáza. Základní doména PsrP proteinu je uložena mezi 273-341 aminokyselinami a je nezbytná pro připojení streptokoka ke keratinu 10, jenž je přítomen na plicním epitelu.

Pneumolyzin slouží v počáteční fázi k připojení biofilmu. Jeho hladina je zvyšována pomocí *LuxS* systému.

Hlavním faktorem, který zajišťuje expresi povrchových adhezivních molekul je tvorba bakteriálních pouzder. Pouzdra se tvoří už při prvním styku se substrátem. Následně zablokuje sekundární adheziny, které se objevují hned po primárním přichycení buněk.

Komunikačními molekulami jsou zde autoinduktory druhé třídy AI-2. Jsou to bílkovinné mediátory, které jsou využity pomocí QS systému. AI-2 syntéza je zprostředkována S-ribosylhomoserincystein lyázou, enzymem kódovaným genem *luxS*. Mutantní kmeny, které mají málo *luxS* genů se do krve hostitele dostávají s menší aktivitou, než kmeny s normální hladinou *luxS* genů.

Při tvorbě biofilmu se také uplatňuje QS-kompetentní stimulující peptid (CSP), který se podílí na tvorbě populací, které jsou schopny genetické transformace bakterií. Tyto populace mají hydrolytické enzymy, které jsou schopny uvolnit DNA z nekompetentních bakterií. Tato DNA je následně určena k integraci do chromozomů kompetentních bakterií. Navíc mutace, které narušují dvousložkový systém, jenž je zodpovědný za přenos CSP signálu do genetického zařízení buňky, vede ke zvýšení kolonizace. Produkce biofilmu je také řízena QS komplementním systémem, který je regulován vyloučeným CSP. Tento systém je důležitý pro pozdní stádium tvorby biofilmu.

Dalším mediátorem, který působí jako hlavní aktivátor pro následné faktory podílející se na regulaci tvorby biofilmu je *N*-acetyl-neuraminová kyselina. *Streptococcus pneumoniae* vytváří tři neuraminidázy, přičemž tou nejaktivnější je neuraminidáza A. Její exprese se zvyšuje v podmínkách tvorby biofilmu (Chao *et al.*, 2015; Mayanskyi *et al.*, 2015).

9. Regulace tvorby biofilmu u *Klebsiella pneumoniae*

Pro přisednutí bakterií na povrch jsou využívány adheziny, které hrají roli i při pozdější tvorbě biofilmu. *Klebsiella pneumoniae* tvoří dva typy fimbriálních adhezínů – fimbrie typu 1 a typu 3. Fimbrie typu 1 se nacházejí u většiny enterobakterií. Zprostředkovávají adhezi ke strukturám obsahujícím manosu. Fimbrie typu 3 jsou přítomny prakticky u všech bakterií *Klebsiella pneumoniae* (Schroll *et al.*, 2010).

Biofilm je tvořen pomocí hemaglutininů nebo manóza rezistentními *Klebsiella* podobnými proteiny (Mrk). Ty vytvářejí fimbrie typu 3. Jsou to povrchové struktury, které se mohou vyvinout v dlouhá vlákna o délce větší než 2 μm . Fimbrie typu 3 jsou syntetizovány pomocí tří složek – hlavní pilinovou podjednotkou polymerizovanou tak, aby vytvářela fimbriální průvodič, který skládá pilinovou subjednotku do periplazmy, aby byla připravena na tvorbu fimbrie a dále transmembránový β -barel vnější membrány, který polymerizuje pilinovou podjednotku v rostoucích fimbriích. Hlavní fimbriální podjednotkou je MrkA. MrkB a MrkC mají sekvenční funkci pro reprezentaci periplasmatické průvodící translokázy. Adheze typu MrkD je vyžadována pro připojení extracelulárních proteinů, jako je kolagen typu V. Dalším faktorem pro připojení buněk k povrchu a tvorbě biofilmu je přítomnost polysacharidového pouzdra, které obklopuje buňky (Wilksch *et al.*, 2011).

Bakteriální biofilm je složen z buněk *Klebsiella pneumoniae* obklopenými exopolysacharidovou maticí. Protein zahrnutý v tvorbě biofilmu a zároveň ve tvorbě pouzder. Geny pro tvorbu pouzder jsou důležité v první fázi tvorby biofilmu (Wu *et al.*, 2011).

Poly- β -N-acetylglucosamin (PNAG) je součástí povrchových složek. Jeho funkce je vazba bakterií na povrch, proto se uplatňuje při první fázi tvorby biofilmu. Produkce PNAG závisí na přítomnosti intracelulárního adhezinu ADBC (Chen *et al.*, 2014).

10. Regulace tvorby biofilmu u *Clostridium difficile*

Buňky *Clostridium difficile* mají na svém povrchu proteiny, které fungují jako hlavní adheziny pro přichycení na povrch hostitelských buněk, čímž mohou začít kolonizaci. Také je zde přítomen polysacharid II, což je běžný antigen u *Clostridium difficile* (Pantaléon *et al.*, 2015).

Hlavní složkou biofilmu je opět extracelulární polymerní látka, která tvoří základ pro matici biofilmu. Ta se skládá z polysacharidů, nukleových kyselin, lipidů a proteinů, které jsou vylučovány bakterií *Clostridium difficile* do prostředí. Matrice biofilmu obsahuje kromě výše zmíněných složek i pili typu IV a toxiny, čímž zvyšuje virulenci vytvořeného biofilmu (Dawson *et al.*, 2012; Pantaléon *et al.*, 2014).

V matici také nacházíme sedm enzymů, které se podílejí na metabolismu buněk - formát-tetrahydrofolát ligáza, acetyl-CoA, acetyltransferáza, 2-hydroxyisokaproát, CoA-transferáza, NAD-specifická glutamát dehydrogenáza, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenáza, fruktosa-bifosfát aldoláza a formát-tetrahydrofolát ligáza. Přítomnost těchto enzymů poukazuje na probíhající metabolismus uvnitř biofilmu.

V počátečním stádiu tvorby biofilmu je nutná hybnost bakterií. Ta je ovšem inhibována u zralých biofilmů (Pantaléon *et al.*, 2014).

Clostridium difficile vytváří spóry pomocí hlavního sporulujícího regulátoru Spo0A. Inaktivace genu *spo0A* snižuje tvorbu biofilmu (Dawson *et al.*, 2012).

Při tvorbě biofilmu se také uplatňuje QS systém. Ten je řízen autoinduktorem 2, jehož syntézu reguluje LuxS. Druhým poslem je opět c-di-GMP, jenž se uplatňuje především při změně fenotypu z planktonického typu bakterie na bakterii žijící uvnitř biofilmu (Pantaléon *et al.*, 2014).

11. Regulace tvorby biofilmu u *Candida albicans*

Kvasinka typu *Candida albicans* je jednou z nejběžnějších lidských patogenů. Snadno osazuje jakékoliv povrchy chirurgických nástrojů, implantátů a kloubních náhrad. Způsobuje invazivní infekce především u jedinců s nedostatečnou imunitou, které vedou k vysoké úmrtnosti (Zhao *et al.*, 2013). Biofilm kvasinky *Candida albicans* se skládá z polysacharidové matrice obsahující mikrokolonie kvasinek a hyf uspořádaných do vrstev, extracelulární DNA, karbohydráty, proteiny, hexosaminy, fosfor a kyselinu uronovou (De Sordi and Mühlschlegel, 2016 Martins *et al.*, 2016). Důležitou součástí biofilmu jsou povrchové proteiny, které se podílejí na jeho přichycení (De Sordi and Mühlschlegel, 2016).

Kvasinky tvořící biofilmu opět prochází přes určité fáze jako přilnutí k povrchu, bujení, tvorbu filament a zrání vyúsťující ve vytvoření komplexní sítě kvasinek a hyf. Zrání biofilmu probíhá do 24 hodin. Na pevném povrchu vytváří zakalený potah, který může být spatřen i pouhým okem. Poslední fází je rozptyl buněk do okolí (Gulati *et al.*, 2016).

Komunikaci mezi buňkami opět zajišťuje QS systém. Tentokrát se neskládá z AHL, jako u bakterií, ale ze dvou signálních molekul – *E,E*-farnesolu a tyrosolu.

E,E-farnesol potlačuje tvorbu filament a vratně zamezuje růstu biofilmu. Avšak nedochází k ovlivnění již existujících hyf, které se dále prodlužují. Zároveň je hlavní složkou, která přispívá k rezistenci kvasinky na antibiotika či na jiné nepříznivé podmínky (např. oxidativní stres apod.). Pro zprostředkování účinků *E,E*-farnesolu je důležitá histidin kináza a transkripční represor. Transkripční represor negativně ovlivňuje přeměnu z kvasinek na hyfy.

Tyrosol je aromatický alkohol, jenž je schopen specificky zkrátit lag fázi růstu kultury s nízkou hustotou tak, aby nedocházelo k ovlivňování jejího exponencionálního růstu. Navíc stimuluje tvorbu zárodků buněk kvasinky a hyf v brzkém stádiu tvorby biofilmu.

Některé pochody kontrolované molekulou cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) jsou ovlivněny *E,E*-farnesolem a tyrosolem. Obě tyto sloučeniny regulují aktivitu specifických domén, což vede ke změně morfologie kvasinek (De Sordi and Mühlschlegel, 2016).

12. Regulace tvorby biofilmu u *Exophiala dermatitidis*

Exophiala dermatitidis patří mezi vláknité mikroskopické houby (mikromycety), které mají schopnost kolonizovat povrchy a tvořit biofilm. Nemoci, které takto zformované houby vytvoří, jsou v hledáčku vědců a lékařů pro jejich resistenci na současnou léčbu (Kirchhoff *et al.*, 2017).

Mikromycety v podobě biofilmu jsou příčinou ucpávání trubek vodovodních distribučních systémů a způsobují kontaminaci pitné vody. Stejně jako u jiných mikroorganismů tvorba biofilmu závisí na mnoha vnějších i vnitřních podmínkách. V případě tvorby biofilmu ve vodovodním potrubí jsou důležitými kritérii pro stavbu a mikrobiální složení biofilmu např. materiály, z kterých je potrubí vytvořeno, teplota, průtok vody a samozřejmě mikrobiální složení vody a interakce mezi danými mikroorganismy (Siqueira *et al.*, 2013).

Exophiala dermatitidis je houba, která osídluje dýchací cesty především u pacientů s cystickou fibrózou. Jedná se o oportunní patogen, který (pokud se nevyskytuje v lidském těle) obývá především teplá místa (např. sauny, myčky na nádobí, vodovodní potrubí, atd.). *Exophiala dermatitidis* je sama osobě velmi odolná houba, kterou před vnějším prostředím chrání její silná buněčná stěna. Hlavním faktorem virulence a zároveň podmínkou pro možnost tvorby biofilm je její schopnost změny morfologie z jednotlivých buněk na hyfy (Kirchhoff *et al.*, 2017).

Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje jednotlivé mechanismy tvorby biofilmu u daných mikroorganismů.

Kromě biologických predispozic hrají v tvorbě biofilmu důležitou roli také podmínky prostředí, kterými jsou např. teplo, světlo, pH množství živin a druh povrchu, na kterém se biofilm tvoří.

I přes veškeré poznatky o biofilmu a jeho tvorbě je pro nás stále mnoho mechanismů neznámých a proto je toto téma podrobováno dalšímu zkoumání. Klade se důraz na porozumění jednotlivým dějům a na následné využití těchto poznatků například ve zdravotnictví, kde je tvorba biofilmu bakterií nežádoucí. Díky těmto znalostem je možné podniknout takové kroky, aby k dané tvorbě nedocházelo, popřípadě abychom ji uměli zastavit.

Citovaná literatura

Fredheim, E. G. A., H. N. Granslo, T. Flaegstad, Y. Figenschau, H. Rohde, I. Sadovskaya, T. E. Mollnes and C. Klingenberg. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. FEMS Immunology [online]. 2011, 63(2), 269-280 [cit. 2017-06-23]. DOI: ISSN 09288244. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2011.00854.x>>

Boehm, A., S. Steiner, F. Zaehring, A. Casanova, F. Hamburger, D. Ritz, W. Keck, M. Ackermann, T. Schirmer, U. Jenal. *Second messenger signalling governs Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. Molecular Microbiology [online]. 2009, 72(6), 1500-1516 [cit. 2017-06-06]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06739.x. ISSN 0950382x. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2009.06739.x>>

Boles, B. R., M. Thoendel, A. J. Roth, A. R. Horswill and A. J. Ratner. *Identification of genes involved in polysaccharide-independent Staphylococcus aureus* biofilm formation. PLOS ONE [online]. 2010-4-14, 5(4), e10146- [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0010146. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010146>>

Bonsaglia, E. C. R., N. C. C. Silva, A. Fernandes Júnior, J. P. Araújo Júnior, M. H. Tsunemi and V. L. M. Rall. *Production of biofilm by Listeria monocytogenes in different materials and temperatures* [online]. 2013 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.07.023. ISBN 10.1016/j.foodcont.2013.07.023. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513003708>>

Borlee, B. R., A. D. Goldman, K. Murakami, R. Samudrala, D. J. Wozniak and M. R. Parsek. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. Molecular Microbiology [online]. 2010, 75(4), 827-842 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x. ISSN 0950382x. Dostupné z: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x>>

Boyd, A. and A. M. Chakrabarty. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide. Journal of Industrial Microbiology. [online]. 1995, s. 162-8 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8519473#>>

Büttner, H., D. Mack and H. Rohde. *Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: Mechanisms and molecular interactions*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [online]. 2015, 5, - [cit. 2017-06-22]. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00014. ISSN 2235-2988.

Dostupné z: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcimb.2015.00014/abstract>>

Cárcamo-oyarce, G., P. Lumjiaktase, R. Kümmerli and L. Eberl. *Quorum sensing triggers the stochastic escape of individual cells from Pseudomonas putida biofilms*. Nature Communications [online]. 2015, 6, 5945- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1038/ncomms6945. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms6945>>

Dawson, L. F., E. Valiente, A. Faulds-Pain, E. H. Donahue, B. W. Wren and M. R. Popoff. *Characterisation of Clostridium difficile biofilm formation, a role for Spo0A*. PLOS ONE [online]. 2012-12-7, 7(12), e50527- [cit. 2017-06-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0050527. ISSN 1932-6203.

Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0050527>>

De La Fuente-Núñez, C., F. Reffuveille, L. Fernández and R. E. Hancock. *Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies*. Current Opinion in Microbiology. 2013, 16(5), 580-589. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.013. ISSN 13695274.

Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413000891>>

De Sordi, L. and F. A. Mühlschlegel. *Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in Candida albicans: A communicative network regulating microbial coexistence and virulence*. FEMS Yeast Research [online]. 2009, 9(7), 990-999 [cit. 2017-06-12]. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00573.x. ISSN 15671356.

Dostupné z: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00573.x>>

Fazli, M., H. Almblad, M. L. Rybtke, M. Givskov, L. Eberl and T. Tolker-Nielsen. *Regulation of biofilm formation in Pseudomonas and Burkholderia species*. Environmental Microbiology [online]. 2014, 16(7), 1961-1981 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1111/1462-2920.12448. ISSN 14622912. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12448>>

Fereshteh, E. and D. Taraneh. *Biofilm formation and detection of icaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences [online]. Mashhad, 2011, **14**(2), 132-136 [cit. 2017-06-22]. ISSN 2008-3866. Dostupné z: <http://ijbms.mums.ac.ir/article_4978_721.html>

Fredheim, E. G. A., H. N. Granslo, T. Flaegstad, Y. Figenschau, H. Rohde, I. Sadovskaya, T. E. Mollnes and C. Klingenberg. *Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin activates complement*. FEMS Immunology [online]. 2011, 63(2), 269-280 [cit. 2017-06-23]. DOI: ISSN 09288244. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2011.00854.x>>

Gene. NCBI [online]. Bethesda MD: U.S. National Library of Medicine, 2015 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16737349>>

Ghafoor, A., I. D. Hay and B. H. A. Rehm. *Role of exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and architecture*. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2011, 77(15), 5238-5246 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1128/AEM.00637-11. ISSN 0099-2240.

Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147449/>>

Gimpel, M., S. Brantl, C. Molina-Santiago, P. M. Tribelli, J. L. Ramos and S. Molin. *Dual-function small regulatory RNAs in bacteria*. Molecular Microbiology [online]. 2017, 103(3), 387-397 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1111/mmi.13558. ISSN 0950382x.

Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mmi.13558>>

Gulati, M. and C. J. Nobile. *Candida albicans biofilms: Development, regulation, and molecular mechanisms*. Microbes and Infection [online]. 2016, 18(5), 310-321 [cit. 2017-06-12]. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.01.002. ISSN 12864579.

Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457916000095>>

Chao, Y., L. R. Marks, M. M. Pettigrew and A. P. Hakansson. *Streptococcus pneumoniae biofilm formation and dispersion during colonization and disease*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [online]. 2015, 4, - [cit. 2017-06-10]. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00194. ISSN 2235-2988.

Dostupné z: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00194/abstract>>

Chen, K. M., M. K. Chiang, M. Wang, H. Ch. Ho, M. Ch. Lu, Y. Ch. Lai. *The role of pgaC in Klebsiella pneumoniae virulence and biofilm formation*. Microbial Pathogenesis [online]. 2014, 77(8), 89-99 [cit. 2017-06-16]. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.11.005. ISBN 10.1371/journal.pone.0023500. ISSN 08824010.

Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401014001697>>

Chen, L. and Y. Wen. *The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies*. International Journal of Oral Science. 2011, 3(2), 66-73. DOI: 10.4248/IJOS11022. ISSN 1674-2818.

Dostupné z: <<http://www.nature.com/ijos/journal/v3/n2/abs/ijos201111a.html>>

Irie, Y., B. R. Borlee, J. R. O'Connor, P. J. Hill, C. S. Harwood, D. J. Wozniak and M. R. Parsek. *Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in Pseudomonas Aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, no. 50 (2012): 20632-0636.

Dostupné z: <<http://www.jstor.org/stable/41830577>>

Jiménez-Fernández, A., A. López-Sánchez, P. Calero and F. Govantes. *The c-di-GMP phosphodiesterase BifA regulates biofilm development in Pseudomonas putida*. Environmental Microbiology Reports [online]. 2015, 7(1), 78-84 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1111/1758-2229.12153. ISSN 17582229.

Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12153>>

Kim, M. K., K. Drescher, O. S. Pak, B. L. Bassle and H. A. Stone. *Filaments in curved streamlines: rapid formation of Staphylococcus aureus biofilm streamers*. New Journal of Physics [online]. 2014, 16(6), 065024- [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1088/1367-2630/16/6/065024. ISSN 1367-2630. Dostupné z: <<http://stacks.iop.org/1367-2630/16/i=6/a=065024?key=crossref.9f1999a53acb365ce0146078c1041a1a>>

Kirchhoff, L. , M. Olsowski, K. Zilmans, S. Dittmer, G. Haase, L. Sedlacek, E. Steinman, J. Buer, P. M. Rath and J. Steinmann. *Biofilm formation of the black yeast-like fungus Exophiala dermatitidis and its susceptibility to antiinfective agents*. Scientific Reports [online]. 2017, 7(11), 42886- [cit. 2017-11-15]. DOI: 10.1038/srep42886. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <<http://www.nature.com/articles/srep42886>>

Lavery, G., S. P. Gorman and B. F. Gilmore. *Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation*. Future Microbiology [online]. Mashhad, 2013, 8(4), 509-524 [cit. 2017-06-22]. DOI: 10.2217/fmb.13.7. ISSN 1746-0913.

Dostupné z: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.13.7>>

Lin, M. H., J. Ch. Shu, H. Y. Huang, Y. Ch. Cheng and J. R. Fitzgerald. *Involvement of iron in biofilm formation by Staphylococcus aureus*. Directory of Open Access Journals [online]. 2012, 7(3) [cit. 2017-06-04]. DOI: 10.1371/journal.pone.0034388. ISBN 10.1371/journal.pone.0034388. ISSN 1932-6203.

Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034388>>

Martínez-Gila, M., J. M. Quesada, M. I. Ramos-González, M. I. Soriano, R. E. De Cristóbal and M. Espinosa-Urgela. *Interplay between extracellular matrix components of Pseudomonas putida biofilms*. Research in Microbiology [online]. 2013, 164(5), 382–389 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.021>>

Martins, C. H. G., R. H. Pires, A. O. Cunha, C. A. M. Pereira, J. L. Singulani, F. Abrão, T. de Moraes and M. J. S. Mendes-Giannini. *Candida biofilms: First description of dual-species Candida albicans/Candida rugosa biofilm*. Fungal Biology [online]. 2016, 120(4), 530-537 [cit. 2017-06-12]. DOI: 10.1016/j.funbio.2016.01.013. ISSN 18786146.

Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614616000258>>

Mayanskiy, A. N., I. V. Chebotar, A. V. Lazareva and N. A. Mayanskiy. *Biofilm formation by Streptococcus pneumoniae*. Molecular Genetics, Microbiology and Virology [online]. 2015, 30(3), 124-131 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.3103/S0891416815030040. ISSN 0891-4168. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.3103/S0891416815030040>>

Mika, F. and R. Hengge. *Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in E. coli and Salmonella*. International Journal of Molecular Sciences [online]. 2013, 14(3), 4560-4579 [cit. 2017-06-04]. DOI: 10.3390/ijms14034560. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/14/3/4560/>>

Mitra, A., S. Palaniyandi, Ch. D. Herren, X. Zhu, S. Mukhopadhyay. *Pleiotropic roles of uvrY on biofilm formation, motility and virulence in uropathogenic Escherichia coli CFT073*. PLOS ONE [online]. 2013-2-1, 8(2), e55492- [cit. 2017-06-06]. DOI: 10.1371/journal.pone.0055492. ISSN 1932-6203.

Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055492>>

Moormeier, D. E. and K. W. Bayles. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology* [online]. 2017, 104(3), 365-376 [cit. 2017-06-04]. DOI: 10.1111/mmi.13634. ISSN 0950382x.

Dostupné z: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/mmi.13634>>

Nguyen, U. T. and L. L. Burrows. *DNase I and proteinase K impair Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms: a complex developmental organism. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2014, 187(3), 26-32 [cit. 2017-06-04]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025. ISSN 01681605.

Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514003122>>

O'Grady, E. P., D. F. Viteri, P. A. Sokol and J. Vadivelu. *A unique regulator contributes to Quorum Sensing and virulence in Burkholderia cenocepacia*. *PLOS ONE* [online]. 2012, 7(5), e37611- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1371/journal.pone.0037611. ISSN 1932-6203.

Dostupné z: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037611>>

Pantaléon, V., A. P. Soavelomandroso, S. Bouttier, R. Briandet, B. Roxas, M. A. Collignon, C. Janoir, G. Vedantam, T. Candela. *The Clostridium difficile protease Cwp84 modulates both biofilm formation and cell-surface properties*. *PLOS ONE* [online]. 2015-4-29, 10(4), e0124971- [cit. 2017-06-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0124971. ISSN 1932-6203.

Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124971>>

Pantaléon, V., S. Bouttier, A. P. Soavelomandroso, C. Janior and T. Candela. *Biofilms of Clostridium species*. *Anaerobe* [online]. 2014, 30(1), 193-198 [cit. 2017-06-23]. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.010. ISSN 10759964.

Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996414001322>>

Prüß, B. M., K. Verma, P. Samanta, P. Sule, S. Kumar, J. Wu, D. Christianson, S. M. Horne, S. J. Stafslien, A. J. Wolf and A. Denton. *Environmental and genetic factors that contribute to Escherichia coli K-12 biofilm formation*. *Archives of Microbiology* [online]. 2010, 192(9), 715-728 [cit. 2017-06-06]. DOI: 10.1007/s00203-010-0599-z. ISSN 0302-8933.

Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s00203-010-0599-z>>

Rasamiravaka, T., Q. Labtani, P. Duez and M. El Jaziri. *The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A review of the natural and synthetic compounds interfering with*

control mechanisms. BioMed Research International [online]. 2015, 2015, 1-17 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1155/2015/759348. ISSN 2314-6133.

Dostupné z: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/759348/>>

Renner, D. L. and D. B. Weibel. *Physicochemical regulation of biofilm formation*. MRS bulletin. 2011, 36(05), 347 - 355. DOI: 10.1557/mrs.2011.65. ISSN 0883-7694.

Dostupné z: <<https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>>

Rybtke, M., J. Berthelsen, L. Yang, N. Høiby, M. Givskov and T. Tolker-Nielsen. *The LapG protein plays a role in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by controlling the presence of the CdrA adhesin on the cell surface*. MicrobiologyOpen [online]. 2015, 4(6), 917-930 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/mbo3.301. ISSN 20458827.

Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mbo3.301>>

Sand, A., M. Yadav, D. K. Mishra a K. Behari. *Alginic acid-g-poly(N-vinylformamide) graft copolymer: Synthesis, characterization, swelling, and flocculation property*. Journal of Applied Polymer Science [online]. 2011, 121(3), 1400-1407 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/app.33540. ISSN 00218995. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/app.33540>>

Schindler, J. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing,a.s., 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.

Schmid, N., G. Pessi, Y. Deng, et al. *The AHL and BDSF-dependent Quorum sensing systems control specific and overlapping sets of genes in Burkholderia cenocepacia H111*. PLoS ONE [online]. 2012, 7(11), cit. 2017-05-12]. DOI: 10.1371/journal.pone.0049966. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0049966>>

Schroll, C., K. B. Barken, K. A. Kroghelt and C. Struve. *Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation*. BMC Microbiology [online]. 2010, 10(1), 179- [cit. 2017-06-16]. DOI: 10.1186/1471-2180-10-179. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-10-179>>

Siqueira, V. M., H. M. B. Oliveira, C. Santos, R. R. M. Paterson, N. B. Gusmão and N. Lima. *Biofilms from a Brazilian water distribution system include filamentous fungi*. Canadian Journal of Microbiology [online]. 2013, 59(3), 183-188 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1139/cjm-2012-0529. ISSN 0008-4166.

Dostupné z: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2012-0529>>

Votava, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Druhé přepracované vydání. Brno: NEPTUN, 2005. ISBN 80-86850-00-5.

Wassinger, A., L. Zhang, E. Tracy, R. S. Munson, S. Kathariou, H. H. Wang and Ch. Forestier. *Role of a gntR-family response regulator LbrA in Listeria monocytogenes biofilm formation: A complex developmental organism*. PLoS ONE [online]. 2013, 8(7), e70448- [cit. 2017-06-04]. DOI: 10.1371/journal.pone.0070448. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070448>>

Wilksch, J. J., J. Yang, A. Clements, J. L. Gabbe, K. R. Short, H. Cao, R. Cavaliere, C. E. James, C. B. Whitchurch, M. A. Schembri, M. L. C. Chuah, Z. X. Liang, O. L. Wijburg, A. W. Jenney, T. Lithgow and R. A. Strungnell. *MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls Klebsiella pneumoniae biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression*. PLOS Pathogens [online]. 2011-8-25, 7(8), e1002204- [cit. 2017-06-16]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002204. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002204>>

Wu, M. Ch., T. L. Lin, P. F. Hsieh, H. Ch. Yang and J. T. Wang. *Isolation of genes involved in biofilm formation of a Klebsiella pneumoniae strain causing pyogenic liver abscess*. PLOS Pathogens [online]. 2011-8-25, 7(8), e1002204- [cit. 2017-06-16]. DOI: 10.1371/journal.pone.0023500. ISBN 10.1371/journal.pone.0023500. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023500>>

Yang, Y., X. Zhang, W. Huang, Y. Yin and J. P. O'Gara. *SCCmec-associated psm-mec mRNA promotes Staphylococcus epidermidis biofilm formation: Mechanisms and molecular interactions*. Journal of Hospital Infection [online]. 2016, 52(3), 212-218 [cit. 2017-06-22]. DOI: 10.1007/s10482-016-0741-2. ISBN 10.1007/s10482-016-0741-2. ISSN 01956701. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s10482-016-0741-2>>

Zhao, L. X., D. D. Li, D. D. Hu, G. H. Hu, L. Yan, Y. Wang, Y. Y. Jiang and T. Coenye. *Effect of tetradrine against Candida albicans biofilms*. PLOS ONE [online]. 2013, 8(11), e79671- [cit. 2017-11-15]. DOI: 10.1371/journal.pone.0079671. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0079671>>

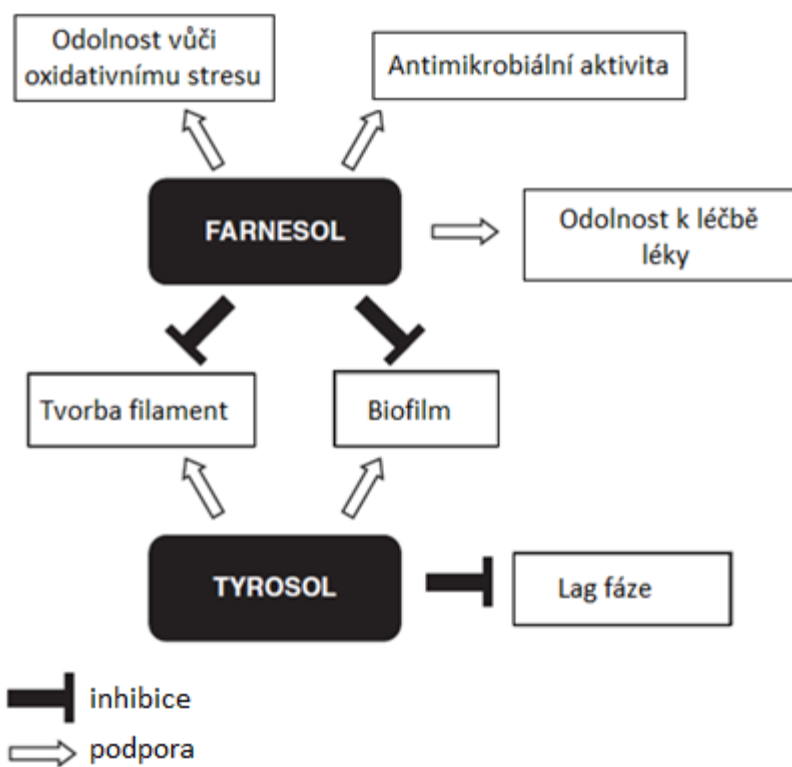
Přílohy

Příloha A – Schematické znázornění efektu tyrosolu a farnesolu na tvorbě biofilmu u *Candida albicans*

Příloha B - Tvorba biofilmu u kvasinky *Candida albicans*

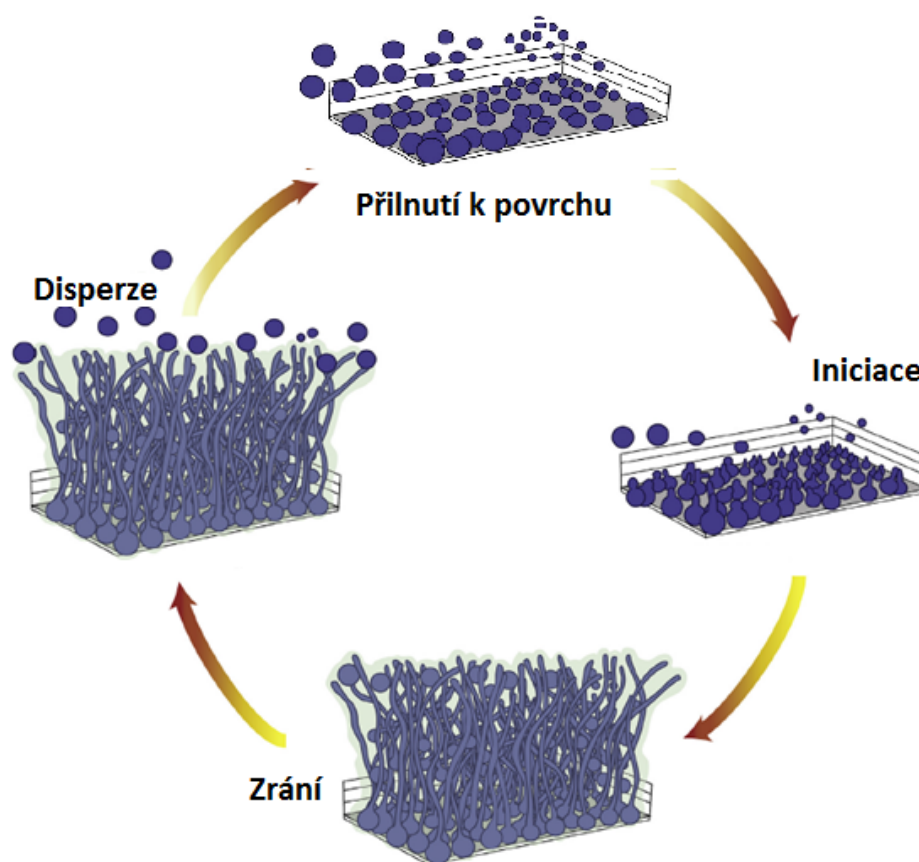
Příloha C – Disk CD

Příloha A - Schematické znázornění efektu tyrosolu a farnesolu na tvorbě biofilmu u *Candida albicans*



Schematické znázornění efektu tyrosolu a farnesolu na tvorbě biofilmu u *Candida albicans* (upraveno dle De Sordi and Mühlischlegel., 2016).

Příloha B - Tvorba biofilmu u kvasinky *Candida albicans*



Tvorba biofilmu u kvasinky *Candida albicans* (upraveno dle Gulati *et al.*, 2016).

Příloha C - Disk CD

- Vlastní text práce – SkalickáK_Tvorba_Biofilmu_PM_2018.pdf