

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Hana Flégrová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Struktura a funkce karbonických anhydráz v kvasinkách

Hana Flégrová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Hana Flégrová**
Osobní číslo: **C17158**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Struktura a funkce karbonických anhydráz v kvasinkách**
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. Prostudujte literaturu pojednávající o karbonických anhydrázách. Zaměřte se zejména na karbonické anhydrázy typu β .
2. Prostudujte literaturu týkající se kvasinek, jejichž karbonické anhydrázy byly charakterizovány.
3. Ke studiu tématiky použijte hlavně zahraniční odbornou literaturu a informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:


Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



Ing. Petr Kalenda, Ph.D.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kančár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 7. 2019

Hana Flégrová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce paní RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za její trpělivost, užitečné rady a věcné připomínky při konzultaci a vypracování bakalářské práce.

ANOTACE

Bakalářská práce se zaměřuje na karbonické anhydrázy, jejich strukturu a funkci. Dále je v této práci stručně popsána struktura kvasinek, jejich význam a funkce. Další část zahrnuje podrobnější charakterizaci jednotlivých významných rodů kvasinek. Bakalářská práce také obsahuje detailní popis oxidu uhličitého jako signální molekuly spolu s jeho reverzibilní hydratací a dehydratací. Poslední část popisuje karbonické anhydrázy třídy β , jejich strukturu, funkci a příklady konkrétních β karbonických anhydráz vyskytujících se v buňkách kvasinek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karbonická anhydráza; kvasinky; oxid uhličitý; signální molekula; reverzibilní hydratace; reverzibilní dehydratace; β karbonické anhydrázy

TITLE

Structure and function yeast carbonic anhydrases

ANNOTATION

The bachelor thesis is focused on carbonic anhydrases, their structure and function. Further, it describes a brief structure of yeast, their importance and function. The next section includes more detailed characterization of the individual genera of yeasts. The bachelor thesis also contains detailed description of carbon dioxide as a signaling molecule along with its reversible hydration and dehydration. The last part describes β class carbonic anhydrases, their structure, function, and specific examples of β carbonic anhydrases occurring in yeast cells.

KEYWORDS

Carbonic anhydrase; yeasts; carbon dioxide; signaling molecule; reversible hydration; reversible dehydration; β carbonic anhydrases

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	11
ÚVOD	14
1 KARBONICKÉ ANHYDRÁZY	15
2 KVASINKY	18
2.1 Obecný úvod	18
2.2 Historie	18
2.3 Využití kvasinek v současnosti	18
2.4 Buňka kvasinky	19
2.5 Schopnost tvořit pouzdra	19
2.6 Metabolismus kvasinek	20
2.7 Rozmnožování kvasinek	20
2.7.1 Pohlavní rozmnožování	20
2.7.2 Nepohlavní rozmnožování	20
3 ROD <i>Saccharomyces</i>	21
3.1 Obecně	21
3.2 Zástupci	21
3.3 Taxonomie	22
3.4 Morfologie a struktura	22
3.5 Genomová struktura	22
3.6 Využití	23
4 ROD <i>Candida</i>	24
4.1 Obecně	24
4.2 Zástupci	24
4.3 Taxonomie	25
4.4 Morfologie a struktura	25
4.5 Genomová struktura	26

4.6 Využití.....	26
5 ROD <i>Cryptococcus</i>	27
5.1 Obecně.....	27
5.2 Zástupci.....	28
5.3 Taxonomie.....	28
5.4 Morfologie a struktura.....	29
5.5 Genomová struktura	29
5.6 Využití.....	29
6 OXID UHLIČITÝ JAKO SIGNÁLNÍ MOLEKULA KVASINEK.....	30
7 REVERZIBILNÍ HYDRATAČE/DEHYDRATAČE OXIDU UHLIČITÉHO	32
8 KARBONICKÉ ANHYDRÁZY TŘÍDY β	34
8.1 Objev a historie	34
8.2 Výskyt	34
8.3 Rozdělení.....	34
8.4 Struktura.....	35
8.5 Vybrané β CA kvasinek	37
8.5.1 ScNce103p	37
8.5.2 CaNce103p.....	39
8.5.3 CAS1, CAS2	41
ZÁVĚR	44
ZDROJE.....	45

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIDS – syndrom získaného selhání imunity

ATCA - *Arabidopsis thaliana* β carbonic anhydrase

ATP – adenosintrifosfát

BCG - *Candida Bromcresol Green Agar*

bZIP - *Basic Leucine Zipper*

CA – karbonická anhydráza

CaNCE103 – gen kódující karbonickou anhydrázu CaNce103p u *Candida albicans*

CaNce103p – karbonická anhydráza u *Candida albicans* (genový produkt CaNCE103)

CAs – karbonické anhydrázy

CAS1 – karbonická anhydráza ze *Sordardia macrospora*

CAS2 - karbonická anhydráza ze *Sordardia macrospora*

cas3 - karbonická anhydráza ze *Sordardia macrospora*

cas4 - karbonická anhydráza ze *Sordardia macrospora*

CSF – mozkomíšní mok, *cerebrospinal fluid*

Cst6p – transkripční faktor u *Saccharomyces cerevisiae*

CT – počítačová tomografie, *computed tomography*

CynT – gen karbonické anhydrázy v *Escherichia coli*

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECCA - *Escherichia coli* β carbonic anhydrase

ELISA – enzymoimunoanalýza, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

GMS - *Grocott's methenamine silver stain*

HCA – *human carbonic anhydrase*

hCA II - *human carbonic anhydrase*

HICA - *Haemophilus influenzae* β carbonic anhydrase

HIV - virus lidské imunitní nedostatečnosti, *Human Immunodeficiency Virus*

HTCA - *Halothiobacillus neapolitanus* β carbonic anhydrase

MLST - multilokusová sekvenční typizace, *multilocus sequence typing*

MRI – magnetická resonance, *magnetic resonance imaging*

MTCA - *Mycobacterium tuberculosis* β carbonic anhydrase

Nce - *non classical export*

Nce103 – karbonická anhydráza Nce103

Nce103 Δ N13 – enzym Nce103 po odštěpení 13 aminokyselin

Nce103 Δ N50 – enzym Nce103 po odštěpení 50 aminokyselin

PCC6803 – cyanobakterie *Synechocystis*

PCR - polymerázová řetězová reakce, *polymerase chain reaction*

PDB – proteinová banka, *protein data bank*

PPCA - *Porphyridium purpureum* β carbonic anhydrase

PSCA - *Pisum sativum* β carbonic anhydrase

Rca1p – transkripční faktor u *Candida albicans*

RNA – ribonukleová kyselina

Rv1284 - *Mycobacterium tuberculosis* Rv1284 β carbonic anhydrase

Rv3588 - *Mycobacterium tuberculosis* Rv3588 β carbonic anhydrase

ScNCE103 – gen kódující karbonickou anhydrázu ScNce103p u *Saccharomyces cerevisiae*

ScNce103p – karbonická anhydráza u *Saccharomyces cerevisiae* (genový produkt ScNCE103)

α CA – karbonická anhydráza třídy α

β CA – karbonická anhydráza třídy β

Δ 29_CaNce103p – enzym CaNce103p po odštěpení 29 aminokyselin

$\Delta 48_CaNce103p$ - enzym CaNce103p po odštěpení 48 aminokyselin

$\Delta 61_CaNce103p$ - enzym CaNce103p po odštěpení 61 aminokyselin

ÚVOD

Karbonické anhydrázy spadají do skupiny metaloenzymů. Metaloenzymy jsou látky obsahující ve své základní struktuře iont kovu. Většina karbonických anhydráz obsahuje ve své molekule zinek umístěný v tetraedrální struktuře složené ze tří aminokyselinových zbytků a hydroxylového aniontu. Jsou to enzymy katalyzující konverzi oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan, ale také konverzi hydrogenuhličitanu na oxid uhličitý. Optimální a dostatečná hladina oxidu uhličitého, ale i hydrogenuhličitanu, je důležitá pro udržení správné aktivity dalších enzymů, které používají CO_2 a HCO_3^- jako substrát pro své následné reakce. Vnímání koncentrace CO_2 a rychlá adaptace na jeho měnící se koncentraci je pro buňky kvasinek (nejen kvasinek) velmi podstatná [1, 2, 3, 4, 5].

Kvasinky jsou eukaryotní, heterotrofní organismy, které patří do říše hub. Mají schopnost fermentovat sacharidy na vodu a oxid uhličitý, proto se často vyskytují v oblastech s vyšší koncentrací sacharidů. Mohou se vyskytovat také v půdě nebo jako součást symbiotického soužití s jiným organismem. Jejich využití bylo známo již několik tisíc let před naším letopočtem a hojně sahá i do dnešní doby. Nejčastěji jsou využívány při výrobě některých potravin a alkoholických nápojů. Své uplatnění našly také například ve farmacii a v genové manipulaci eukaryotických organismů, kde díky svému rychlému růstu představují vhodný modelový organismus [6, 7].

Oxid uhličitý je důležitou signální molekulou, která u kvasinkových buněk podněcuje děj zvaný filamentace. Při filamentaci dochází u kvasinek k významné morfologické proměně. Buňky se začínají měnit ve vlákna, vytváří se tedy hyfální nebo pseudohyfální uspořádání. Tento děj výrazně zvyšuje patogenitu i virulenci patogenních zástupců kvasinek [8, 9, 10, 11].

Karbonické anhydrázy třídy β mají v buňkách kvasinek nenahraditelnou roli. Díky jejich schopnosti reverzibilní přeměny CO_2 na HCO_3^- jsou kvasinky schopny přežít měnící se koncentrace oxidu uhličitého v okolním prostředí. Bez CA tyto organismy defacto nejsou schopny přežít [2, 12, 13].

1 KARBONICKÉ ANHYDRÁZY

Karbonické anhydrázy (CA, uhličitánové lyázy, uhličitánové dehydratázy) patří do velké skupiny metaloenzymů (enzymů obsahujících ve své struktuře kovový iont). Ve většině případů obsahují ve své molekule zinek umístěný v tetraedru složeném ze tří aminokyselinových zbytků a hydroxylového aniontu. Byly však popsány i CA obsahující ve svém aktivním místě ionty Cd^{2+} nebo Fe^{2+} . Tyto enzymy katalyzují reverzibilní konverzi oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan. Vnímání koncentrace CO_2 a rychlá adaptace na jeho měnící se hladiny je pro buňky nezbytně důležitá [1, 2, 3, 4, 5].

Zinek je druhým nejhojnějším stopovým prvkem v lidském těle. Je nezbytný pro růst a vývoj organismu, ale má i preventivní a terapeutické účinky proti infekčním onemocněním. Zkracuje také délku nachlazení člověka. Nachází se ve více než 300 enzymech, kde má svou strukturální a katalytickou roli. Je také zapojen do procesu transkripce a translace genetické informace [14].

Poprvé byly CA objeveny v červených krvinkách, poté také u všech zvířat, fotoautotrofních organismů, ale i u bakterií a archeí, které fotosyntézu neprovádí. Podílí se na mnoha důležitých biologických procesech, mezi které patří udržení pH homeostázy, fotosyntéza, dýchání a iontový transport. Přeměna oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan je pomalý děj, karbonické anhydrázy pak tedy slouží jako akcelerátor reakce. Jedná se o velice důležitý fyziologický děj [1, 4].

Uhlík sám o sobě je primární složkou všech živých organismů, slouží jako základní stavební kámen pro vznik proteinů, lipidů, nukleových kyselin, sacharidů a CO_2 , který hraje významnou roli. Je to produkt buněčného dýchání eukaryotických buněk a syntézy ATP v mitochondriích, který je uvolňován z organismů ven do okolí. Oxid uhličitý také slouží jako základní substrát pro fotosyntézu rostlin a sinic, kde je spolu s vodou přeměněn na organické sloučeniny obsahující uhlík a kyslík (glukózu a jiné energeticky bohaté sloučeniny) [5, 15, 16].

Nicméně oxid uhličitý je také důležitý pro biologické procesy hub, jako například pro jejich růst, morfologii, ale také virulenci. Velkou skupinu tvoří houby, které žijí v teplokrevných organismech a jsou to buď komenzálové nebo mohou být pro organismus dokonce patogenní. Tato skupina je vystavena extrémně variabilní koncentraci CO_2 v organismu, a to až v rozmezí od 0,04 % do 5 %. Může nastat situace, kdy koncentrace oxidu uhličitého klesne na velice nízkou hodnotu, to potom znamená málo substrátu pro karboxylační reakce nebo naopak koncentrace oxidu uhličitého bude velice vysoká až toxická, což poté způsobí inhibici růstu buněk hub [1, 3].

Hydrogenuhlíčan je významná biologická molekula podílející se na syntéze mnoha látek, například argininu, mastných kyselin, uracilu nebo purinu. Tato molekula byla také popsána jako důležitý kofaktor pro různé enzymatické reakce, jako příklad můžeme uvést detoxikaci jedovatého kyanátu nebo tvorbu menachinonu (vitaminu K2) u některých bakterií, například u *Escherichia coli*. Hydrogenuhlíčanový iont se také významně podílí na udržování homeostázy, konkrétněji na udržování pH krve (referenční hodnoty 7,36 – 7,44), jako součást tzv. nárazníkového hydrogenuhlíčanového systému krve (pufry), který tlumí výkyvy pH krve při patologických stavech, ke kterým by mohlo dojít buď při zvýšené nebo snížené produkci H^+ protonu při hydrataci CO_2 na hydrogenuhlíčan. Udržení homeostázy je důležité pro průběh všech metabolických dějů každého živého organismu [1, 4, 5, 16].

CA můžeme dělit do několika základních strukturálních tříd, které spolu ale evolučně nesouvisí, jsou rozdílné v sekvenci aminokyselin a struktuře: α , β , γ , δ , ϵ a ζ třída. Některé zdroje uvádí menší počet, některé větší počet strukturálních tříd CA. Navzdory jejich rozdílům, všechny tyto třídy katalyzují podobný dvou-krokový enzymatický mechanismus, a to reverzibilní hydrataci/dehydrataci oxidu uhličitého na hydrogenuhlíčan a proton. Tento mechanismus můžeme popsat jednoduchou chemickou rovnicí $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ [1, 5, 16].

Podrobnější popis této reakce je uveden v samostatné kapitole tomu věnované.

Tato reakce může v organismu také nastat spontánně i bez CA, a to v případě, že je koncentrace oxidu uhličitého dostatečně vysoká [1, 3].

Vzhledem k jejich velkému rozšíření byly CA zkoumány jen u pár vybraných organismů. Většina výzkumu byla prováděna u buněk savců, protože některé izoenzymy CA jsou pozorovány ve zvýšených hladinách u tumorů [1, 5].

Třída α byla poprvé prostudována u erytrocytů obratlovců, později u rostlin, řas a hub. Jejich význam spočívá hlavně v usnadnění výměny CO_2 v dýchacím cyklu [1, 15, 17].

Třída β byla pak poprvé objevena u chloroplastů jetele lučního a kapradin, poté prostudována u bakterií, řas, prokaryot a vyšších rostlin, kde hrají CA důležitou roli při fotosyntéze. Třída β nebyla prokázána u savců. Všechny dosud prostudované CA kvasinek patří do třídy β [1, 2, 15, 17].

Mezi významné zástupce hub obsahující karbonické anhydrázy patří zejména kvasinky, konkrétněji potom rod *Candida*, *Saccharomyces*, *Sordaria*, *Cryptococcus* a další. Například

konkrétně *Candida albicans*, která patří mezi časté patogenní kvasinky člověka, může bujet v prostředí s různou koncentrací oxidu uhličitého díky své CA označované CaNce103p. Bez této konkrétní CA nemůže *Candida albicans* přežít v prostředí vzduchu. Je proto pro její přežití velmi důležitá [1, 4, 16].

Fakt, že CA CaNce103p strukturálně nesouvisí s CA savců, může vést k uplatnění pro vývoj antimykotik. *C. albicans* může způsobit vážný problém v nemocnicích, kde způsobují vysokou mortalitu, zejména u pacientů s oslabenou imunitou. Nozokomiální nákazy jsou závažným problémem, je potřeba je minimalizovat, výše zmíněná CaNce103p může pomoci k návrhu a rozvoji antimykotických prostředků [16, 18].

Rod *Candida* neobsahuje jen patogenní kvasinky, existují i nepatogenní druhy rodu *Candida*, které jsou na rozdíl od patogenních druhů schopny přežít a bujet ve více rozmanitém prostředí. Patogenním druhům se pak může dařit na kůži hostitele, na jeho sliznici nebo v krvi. Mohou dokonce přežít v abiotickém prostředí. Podobnou CA obsahuje také *Saccharomyces cerevisiae*, její název je ScNce103p [4, 16, 18].

Třída γ byla poprvé identifikována u termofilních Archeí *Methanosarcina thermophila*, zatímco δ a ζ byly nalezeny pouze v diatomech. CA třídy ε u bakterií mohou tvořit karboxysom [5, 17].

2 KVASINKY

2.1 Obecný úvod

Kvasinky patří mezi eukaryotní, heterotrofní organismy, řadící se do říše hub (Fungi). Netvoří svou vlastní taxonomickou skupinu. Své pojmenování získaly díky schopnosti fermentovat některé sacharidy (vzniká alkohol a CO₂), tuto schopnost má většina druhů. V přírodě se nejčastěji vyskytují v místech s větší koncentrací sacharidů, dále pak v symbiotickém soužití s jinými organismy či v půdním systému [6].

Kvasinky jsou rezistentní vůči antibiotikům, sulfoamidům a antibakteriálním činidlům, tyto schopnosti jsou geneticky dány od přírody [19].

2.2 Historie

Historie objevení a využití kvasinek sahá do doby několik tisíc let před začátek našeho letopočtu, kdy byly kvasinky používány ve starém Egyptě nebo antickém Řecku. Lidé je používali pro výrobu kynutého pečiva, pro výrobu piva, vína a jiných kvasných nápojů. Již na počátku devatenáctého století byly kvasinky poprvé považovány za živý organismus a jejich možnost fermentovat cukry byla poté prostudována mnoha biology, ale také chemiky. Jako první pozoroval kvasinky nizozemský vědec Anton van Leeuwenhoek v pivu. O něco později ho následoval francouzský biolog, chemik a lékař Louis Pasteur, který v roce 1857 přišel na možnost fermentace sacharidů (v prostředí bez kyslíku) pomocí kvasinek na kyselinu uhličitou a alkohol. Na tuto skutečnost navázal vydáním studií o pivu a vínu. O něco později už byly kvasinky řazeny mezi mikroby, byly popsány jejich různé druhy a byla studována jejich podrobnější fyziologie [6, 7].

2.3 Využití kvasinek v současnosti

Dnes mají kvasinky nenahraditelnou roli v průmyslové výrobě, zejména pak v průmyslu potravinářském. Používají se pro výrobu alkoholických nápojů (pivovarské kvasinky, vinařské kvasinky, lihovarské kvasinky), kynutého pečiva (pekařské kvasinky), potravinářskou i krmnou biomasu. Kromě potravinářství mají také využití ve farmacii a technologii pro jejich schopnost produkce biologicky aktivních látek a biodegradční aktivitu. Velký význam má jejich využití také u genových manipulací eukaryot (geneticky modifikované kvasinky), kde slouží jako vhodný modelový organismus, protože se rychle vyvíjí, rostou, je snadné je používat pro klonování a izolovat jejich zmutované formy. Lze je také využívat pro produkci bílkovin. Při výčtu všech těchto využití se používají samozřejmě kvasinky nepatogenní. Ne všechny druhy kvasinek mohou být ale takto přínosné, existují také patogenní druhy těchto mikroorganismů,

nejčastěji se pak jedná o některé zástupce rodů *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon* apod. Tito zástupci pak mohou způsobovat závažná onemocnění hlavně u jedinců s oslabenou imunitou [6].

2.4 Buňka kvasinky

Stavba buňky kvasinek je velice jednoduchá, její velikost se pohybuje mezi 3–15 μm . Jejich buněčná stěna je pevná a zároveň elastická, na rozdíl od rostlin je však silnější a odolnější. Můžeme si ji představit jako složitý polymer, jehož hlavní součásti tvoří z 90% polysacharidy (manan, glukán, chitin), proteiny (manoprotein), dále také lipidy, avšak jejich zastoupení je poměrně malé, a enzymy (proteázy, fosfatázy apod.) [20, 21].

Na povrchu buněčné stěny se po procesu pučení vytváří trvalé jizvy. Stěna má velký význam při buněčné komunikaci (s jinými kvasinkami nebo s hostitelem v případě soužití), transportu látek, seskupování buněk atd. Kromě buněčné stěny se buňka skládá z cytoplazmatické membrány (na rozdíl od cholesterolu, který je obsažen v cytoplazmatické membráně lidských buněk, obsahuje cytoplazmatická membrána kvasinek ergosterol), jádra, mitochondrií, vakuol, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a cytoplazmy [6, 22].

Největší podíl na složení buňky má voda tvořící 65-80% obsahu, dále zde nalezneme dusíkaté látky, sacharidy, lipidy, specifické bílkoviny, aminokyseliny, nukleové kyseliny, minerály a vitamíny [6].

Kvasinky mohou existovat buď samostatně jako jednobuněčné organismy zaujímající tvar elipsy nebo mohou tvořit dlouhá vlákna propojených kvasinek, jiným slovem pseudomycelia. Některé rody jsou schopné tvořit pravá mycelia (např. *Candida*). Tvar je ovlivněn několika vnějšími vlivy, ale i způsobem rozmnožování a může se měnit v průběhu jejich vývoje [6].

Shluknuté kvasinky vytváří kolonie, které mohou být dle svého povrchu označovány buď jako hladké, drsné nebo slizovité. Záleží také na druhu a rodové specifitě, kultivaci či na půdě, na které mikroorganismus žije. Kolonie můžeme také považovat za jakýsi mezistupeň mezi samostatnou nechráněnou buňkou a biofilmem (seskupení malých organismů, které je pevně spojeno s povrchem, tvorba biofilmu je typická zejména pro rody *Candida* a *Cryptococcus*) [6].

2.5 Schopnost tvořit pouzdra

Některé rody kvasinek jsou schopny vytvářet odolná pouzdra chránící je před škodlivými vlivy. Mezi takové rody patří například *Cryptococcus*. Složkami takového pouzdra jsou pak zejména polysacharidy, které tvoří mikrofibrily vystupující z buněčné stěny. Pouzdro hraje

velký význam jako faktor virulence zejména u patogenních druhů. Shluky takových opouzdřených kvasinek jsou pak slizovitého charakteru [6].

2.6 Metabolismus kvasinek

Jako hlavní zdroj energie a uhlíku slouží kvasinkám sacharidy, zejména pak monosacharidy a disacharidy. Uhlík však nemusí čerpat jen ze sacharidů, nýbrž i jiných látek, například z alkoholů (methanol, ethanol, glycerol), z laktátu a některých alkanů. Tyto látky, ze kterých většina kvasinek čerpá, jsou poté zpracovány aerobní cestou navazujícími procesy glykolýzy a Krebsova cyklu. Není to však jediný způsob, u kvasinek, které jsou schopny fermentace, se energie vytváří při kvašení. Mezi látky vznikající metabolismem těchto mikroorganismů patří například ethanol, CO₂, H⁺, acetát, sukcinát a glycerol [6].

2.7 Rozmnožování kvasinek

2.7.1 Pohlavní rozmnožování

Protože buňky kvasinek patří mezi eukaryota, mohou se samozřejmě rozmnožovat pohlavně. Při tomto typu rozmnožování se vytváří pohlavní spory, proběhne spájení dvou gamet, které jsou však haploidní. Po spájení vznikne buňka diploidní (zygota), v níž se jádro rozdělí procesem meiózy za vzniku čtyř identických buněk, znovu haploidních. Z těch se později vytváří pohlavní spory. Pohlavní rozmnožování je typické pro *Saccharomyces cerevisiae* a některé zástupce rodu *Candida* [23].

2.7.2 Nepohlavní rozmnožování

Nepohlavní rozmnožování, jinak nazvané pučení, je proces, kdy z jedné mateřské buňky vznikají buňky dceřiné, které jsou z hlediska genetiky shodné s mateřskými. Při tomto ději vznikají pupeny na protějších pólech sférických buněk. Vyvinuté dceřiné buňky mají menší průměr než buňky, ze kterých vznikly, a teprve po dosažení jisté velikosti startuje samotný proces dělení, jinak nazvaný cytokineze. Buňky dceřiné se u některých rodů (např. *Candida*) po pučení neoddělují od buněk mateřských a tvoří pak společně vlákna, tzv. pseudohyfy [24].

3 ROD *Saccharomyces*

3.1 Obecně

Pojmenování tohoto rodu kvasinek vychází z latinských slov *Saccharo* (cukr, sacharid) a *myces* (houba). Patří mezi jednobuněčné eukaryotické saprofytické houby, které jsou často využívány při výrobě potravin a nápojů. Rychle rostou, jsou jednoduché a odolné, jsou schopny fermentovat sacharidy, naopak nejsou schopny využívat dusičnany. Jejich kolonie jsou ploché, na povrchu hladké, lesklé či matné a mají krémovou barvu. Jejich průměr je 2-8 μm a délka 3-25 μm . Jednotlivé buňky mají elipsoidní nebo kulovitý tvar. V momentě, kdy je buňka vystavena zhoršeným životním podmínkám, je schopna vytvářet spory. Při použití Gramova barvení se samostatné buňky jeví jako grampozitivní, zatímco buňky ve stádiu spory jako gramnegativní. Rozmnožují se pučením [25].

V přírodě jsou velice rozšířené, lze je najít v rostlinách, ovoci, zelenině a v půdě. Nejsou omezeny na jedno konkrétní stanoviště. Jsou schopny růst v prostředí s variabilní koncentrací uhlíku a dusíku [26].

3.2 Zástupci

Nejznámějším zástupcem rodu *Saccharomyces* je *S. cerevisiae*. Je to taktéž jednobuněčná houba, obecně známá jako pivovarská nebo pekařská kvasinka, která má rozsáhlou historii, jelikož byla používána už od dob starověku. Může tvořit pseudomycelia. Množí se pučením. Její schopnost fermentovat cukry je využita při základní klinické identifikaci, ke které se využívají komerční diagnostické soupravy. *S. cerevisiae* má příbuzné druhy (průmyslově významné), které nejsou pro člověka patogenní, a to *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pasteurianus* a *Saccharomyces paradoxus* [19].

Dalším významným zástupcem je poddruh druhu *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, který je schopen vázat se na enteropatogeny, čímž brání adhezenci a rozšíření v buňkách střevního epitelu. Redukují tak bakteriální infekci střev a mají protizánětlivé účinky [26].

Dalšími zástupci jsou *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces jurei*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces uvarum* a mnoho dalších [27].

Počet identifikovaných druhů se rychle zvyšuje díky současné vědě a vývoji [28].

3.3 Taxonomie

S. cerevisiae se řadí do domény Eukaryota, říše *Fungi* (houby). Díky způsobu rozmnožování (pučení) spadají do oddělení *Ascomycota* – vřeckovýtrusné houby, pododdělení *Saccharomycotina*, řád *Saccharomycetales*, třída *Saccharomycetaceae*, rod *Saccharomyces* a druh *Saccharomyces cerevisiae* [27].

3.4 Morfologie a struktura

Buňky *S. cerevisiae* obsahují všechny běžné orgány, jako buňky živočišné. Typické je mnohostranné pučení. Hlavní složkou buněčné stěny je glukán a manoprotein. Kolonie rostou velice rychle (proto je možné na některých buňkách pozorovat pupeny), většinou narostou do tří dnů. Buňky jsou heterotrofní, energii získávají ze sacharidů (glukózy, sacharózy, rafinózy, melibiózy, proměnlivě také z galaktózy nebo maltózy), ale i z polysacharidů (škrob). Pro svůj metabolismus používají fermentaci i dýchání. Téměř 98% glukózy je metabolizováno během fermentace, zbylá 2 % jsou změněna na buněčný materiál. Při anaerobním procesu je však získáno více energie, až 10% glukózy může být přeměněno na buněčný materiál. Tento fenomén je znám jako Pasteurův efekt [19, 29].

Saccharomycety mají glukózový transportní systém, díky němuž dochází ke zpracování glukózy procesem glykolytické dráhy. Tato dráha je využívána v případě, že je glukóza přítomna v nízké koncentraci. Pokud tomu tak není, dráha není využita. Při vysoké koncentraci vstupuje glukóza do buňky pomocí usnadněné difúze, může dojít k potlačení dýchání ve prospěch fermentace, i když je dostupný kyslík. Tento efekt je znám pod názvem Crabtree [19].

3.5 Genomová struktura

Genom *S. cerevisiae* byl prvním kompletním eukaryotickým sekvenovaným genomem vůbec. Chromozomy tohoto druhu obsahují DNA, která obsahuje několik opakujících se sekvencí, což je způsobeno kódováním ribozomální RNA [19].

Genom má asi 12 156 677 párů bází, 6 275 genů organizovaných do 16 chromozomů. V roce 1988 americký genetik Ira Herskowitz odhadl, že kvasinky mají až 31% genů shodných s člověkem. V dnešní době, kdy je znám a prostudován také genom člověka, víme, že byl tento odhad správný. Mimo jiné, díky své jedinečné struktuře jsou využívány kvasinky *S. cerevisiae* jako modelový organismus pro výzkum ribozomu [19, 30].

3.6 Využití

Kromě potravinářství jsou kvasinky využívány při výrobě makromolekulárních látek, zahrnujících lipidy, proteiny, enzymy a vitamíny. Nově se *S. cerevisiae* začala používat jako aditivum v krmivu pro zvířata, např. pro přežvýkavce. Používají se také při výrobě biopaliv. Pro komerční využití byly vytvořeny produkty z mrtvých i živých buněk, kdy mrtvé slouží jako složka stravovacích doplňků pro masný skot, mléčný skot a koně (například kultury Yea-sacc od Alltech Inc., Diamond V Yeast culture od Diamond V, Mills Inc, a Levucell SC-20 od Lallemand Animal Nutrition podporují stravitelnost, využití živin, udržují vysokou produkci mléka, podporují tělesnou kondici zvířat či brání nadměrným výkyvům pH, které omezují trávení vlákniny a snižují příjem potravy) a živé jako kvasinky pro výrobu nápojů a pečiva. Využití také našly při výrobě léčiv. Jejich význam v biotechnologiích stále roste [19, 28].

Pokud jsou podány v optimální míře, mohou *S. cerevisiae* sloužit svému hostiteli jako probiotika. Jsou odolné vůči kyselině chlorovodíkové v žaludku a vůči žlučovým kyselinám, tudíž jsou schopny bez problémů projít trávicím traktem, kolonizovat ho a pomoci od zažívacích potíží. Jejich účinnost zvyšuje fakt, že jsou odolné vůči antibiotikům. Mohou být také využívány jako doplněk stravy, díky farmaceutickým firmám, které využily možnosti izolace *S. cerevisiae* z ovoce Litchi [26, 31].

V lékárnách je také možné zakoupit upravené pivovarské kvasnice (příkladem je výrobek Pangamin), které obsahují komplex vitaminů skupiny B, minerální látky, stopové prvky, enzymy, aminokyseliny a bílkoviny. Tento doplněk stravy je doporučen u široké škály onemocnění, například při léčbě cukrovky, srdečních a cévních onemocnění, pásových oparů, migrén, žloutenky a chřipky. Je vhodné ho používat i v období rekonvalescence. Je hojně využíván i sportovci [32].

4 ROD *Candida*

4.1 Obecně

Původ slova *Candida* pochází z latinského *candidus*, což znamená bílý. Rod *Candida* se řadí mezi kvasinky, které velmi často způsobují infekce u lidí i zvířat po celém světě. Mnoho druhů je neškodných, žijí v organismech jako komenzálové či v symbiotickém vztahu se svým hostitelem. Nejčastěji se vyskytují na povrchu sliznic, hlavně v gastrointestinálním traktu, ženském genitálním traktu, v dýchacích cestách a na kůži. Jejich vztah s hostitelem není pro hostitele nijak nebezpečný. Pokud ovšem dojde k porušení slizničního povrchu hostitelského organismu, může dojít k oportunnímu onemocnění (onemocnění, které doprovází jiné primární onemocnění, vyvolávají ho organismy, které nejsou za normálních podmínek patogenní). Na kvasinkové infekce jsou náchylní hlavně lidé s oslabenou imunitou (nemocní trpící HIV či diabetem), ale také lidé, kteří dlouhodobě užívají antibiotika. Riziko je stejné jak u mužů, tak i u žen [33, 34, 35].

Pro rychlé rozlišení různých druhů *Candida* kvasinek podle zabarvení jejich kolonií se používá agar s názvem CHROMagar™ *Candida*, dále také Sabouraudův agar, agar podle Nickersona nebo *Candida* BCG Agar Base [36, 37, 38, 39].

4.2 Zástupci

Mezi nejznámější zástupce patří *Candida albicans*. Je to oportunní patogen nacházející se nejčastěji v gastrointestinálním traktu člověka. Je to běžný komenzál, který se stává patogenním v případě imunosuprimovaných jedinců. Jako jeden z mála druhů tohoto rodu způsobuje onemocnění zvané kandidóza. Často se používá jako modelový organismus v biologii [40].

Označuje se jako polymorfní houba. Roste ve dvou formách, jako klasická kulovitá kvasinka, ale také jako dlouhá vláknitá buňka houby. Tyto dvě formy může střídat, a to v závislosti na měnící se podmínky prostředí, jako například na různou dostupnost živin, změnu teploty, pH a koncentraci CO₂. Tato flexibilita je důležitým faktorem virulence, díky ní se kvasinka snadněji šíří v epitelu hostitele. *C. albicans* může vytvářet biofilm [40].

Dalším významným zástupce je *C. auris*, která byla poprvé identifikována v roce 2009. Stejně jako dříve zmíněná *C. albicans* je jako jedna z mála schopna způsobit onemocnění zvané kandidóza. Vytváří lesklé, hladké, šedé, viskózní kolonie. Je velice invazivní, může pronikat do krevního řečiště hostitele, centrální nervové soustavy, ledvin, jater, kostí, svalů, sleziny a očí. Postižení touto kvasinkou se na první pohled projeví jako součást jiného onemocnění, jako

je například diabetes, onemocnění plic, ledvin nebo sepse. Je rezistentní k mnoha lékům [41, 42, 43].

Patogenními zástupci rodu *Candida* jsou kromě *C. albicans* a *C. auris* dále *C. glabrata* (také způsobuje kandidózy, ovlivňuje urogenitální trakt a může způsobit systémovou infekci způsobenou vstupem patogenu do krevního řečiště hlavně u imunosuprimovaných jedinců), *C. parapsilosis* (běžný lidský komenzál, vyskytuje se často na ruce, způsobuje závažné sepse a infekce ran u imunosuprimovaných jedinců, není obligátním lidským patogenem), *C. tropicalis* (vyskytuje se u lidí s neutropenií, velice virulentní, produkuje nejvíce biofilmu), *C. krusei* (patogen pacientů s hematologickými malignitami a příjemců transplantovaných orgánů, vyšší úmrtnost, než u *C. albicans*) [27, 44, 45, 46, 47].

Mezi další zástupce patří *C. antarctica*, *C. auris*, *C. bracarensis*, *C. dubliniensis*, *C. humilis*, *C. rugosa* nebo *C. utilis* [48].

V rámci rodu *Candida* bylo popsáno více jak 200 druhů [49].

4.3 Taxonomie

Druh *Candida albicans* se řadí do domény Eukaryota, říše *Fungi* (houby). Spadá do kmenu *Ascomycota*, podkmenu *Ascomycotina*, třídy *Ascomycetes*, řádu *Saccharomycetales*, čeledi *Saccharomycetaceae*, rodu *Candida* [48].

4.4 Morfologie a struktura

Candida albicans má velké, kulaté, bílé až krémové kolonie vyznačující se kvasničným zápachem. Buněčná stěna obsahuje dvojvrstvu slouženou z vnějšího fibrilárního manoproteinu a vnitřního β glukanu a chitinu (ten má protizánětlivé účinky a pomáhá zmírnit například zánětlivé onemocnění střev). Dále buňka *C. albicans* obsahuje fimbrie (na povrchu buněčné stěny), plazmatickou membránu, mitochondrie, vakuoly, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, ribosomy, jádro, jadérko, peroxisomy a pupen na okraji buňky, který slouží k rozmnožování (pučení) [40, 50, 51].

Energii získává *C. albicans* pomocí fermentace sacharidů, jako je glukóza, galaktóza, maltóza, sacharóza (tu však fermentuje velice pomalu), nebo taktéž zpracováním glukózy, aminokyselin, organických kyselin a alkoholů (ethanolu) [52, 53, 54].

Její případná patogenita je závislá na několika faktorech virulence, jako například na schopnosti adherence na hostitele, na schopnosti tvořit biofilm nebo vylučovat hydrolytické enzymy (např. proteázy, fosfolipázy, lipázy, esterázy, hemolyziny) [55].

V průběhu infekce může *C. albicans* ovlivňovat imunitní systémem hostitelského organismu tím, že mění strukturu své buněčné stěny, mění svůj tvar a vylučuje látky působící jako faktory virulence. Změny ve struktuře a složení stěny buňky závisí na prostředí hostitelského organismu a často vznikají jako reakce na působení antimykotik. *C. albicans* může inhibovat aktivaci komplementu hostitele, inaktivovat antimikrobiální peptidy a inhibovat další funkce imunitních buněk, čímž oslabuje obranyschopnost hostitele [40].

4.5 Genomová struktura

C. albicans se často používá jako modelový organismus. Je to diploidní organismus, jehož genom obsahuje 30 000 000 párů bází – 10krát více než u bakterií. Tyto báze jsou rozprostřeny na 8 chromozomech obsahujících přibližně 6 200 genů. Struktura populace *C. albicans* byla odhalena pomocí metody MLST (multilokusová sekvenční typizace, z anglického *multilocus strain typing*), která má uplatnění v molekulární epidemiologii a používá se také pro taxonomické zařazení organismu [56, 57].

4.6 Využití

Lyzáty kvasinek *C. albicans* lze využít k léčbě kvasinkových infekcí [58].

5 ROD *Cryptococcus*

5.1 Obecně

Poprvé byl rod *Cryptococcus* popsán v roce 1894 patologem Otto Bussem a chirurgem Abrahamem Buschkem, a to při izolaci z kostní infekce u mladé ženy [59].

Zástupci rodu *Cryptococcus* jsou invazivní patogenní houby, které způsobují závažná infekční onemocnění zvaná kryptokokózy zejména u imunosuprimovaných jedinců trpících zvláště pak na AIDS, diabetes, chronická onemocnění ledvin, chronická onemocnění jater, anebo u pacientů, kteří podstoupili transplantaci orgánu. Kryptokokózy se také mohou objevit u lidí, kteří dlouhodobě užívají steroidy, u lidí s vrozenými imunologickými problémy a hematologickými poruchami. U zdravých jedinců jsou onemocnění způsobená touto kvasinkou vzácná [60, 61].

Počátek infekce často začíná inhalací bazidiospor z okolí (velké 1-2 μm), usazením v alveolách a poté se šíří krevním řečištěm imunosuprimované osoby. Spory však nemusí být hned aktivní v momentě, kdy se dostanou do hostitele, v případě zdravých jedinců mohou zůstat v neaktivní formě a až po několika letech se reaktivovat poté, co se jedinec stane imunosuprimovaným. Navzdory tomu, že jsou plíce nejčastějším místem vstupu patogenu do těla, je nejčastějším klinickým projevem infekce meningoencefalitida, která se projevuje horečkou, bolestí hlavy, malátností, nevolností a zvracením. K potvrzení diagnózy se využívají laboratorní testy mozkomíšního moku (CSF z anglického *cerebrospinal fluid*), který se odebírá lumbální punkcí, dále pak mohou být použity imunologické techniky ke stanovení koncentrace antigenů a protilátek, jako ELISA (z anglického *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) nebo latexová aglutinace. Tyto kvasinky mohou také způsobovat kožní problémy, známé jako dermatografismus (zčervenání, kopřivka, vyrážka) [60, 61, 62].

Rod *Cryptococcus* může být identifikován také mikrobiologicky, a to pomocí inkoustových přípravků India-ink nebo pomocí barvení GMS (z anglického *Grocott's methenamine silver stain*). Využívá se také vyšetření pomocí CT (z anglického *Computed tomography*) nebo MRI (z anglického *Magnetic resonance imaging*) [61, 62].

Cryptococcus je rozšířen pouze v určitých částech světa a vyskytuje se v půdě, v rozpadajícím se dřevu, v dutinách stromů nebo je roznášen pomocí ptačího trusu běžných druhů, často holubů [60].

Ročně je hlášen zhruba 1 milion nových případů kryptokokózy, v důsledku toho umírá až 625 000 lidí. Výskyt infekcí u jedinců trpících AIDS spojených s rodem *Cryptococcus* výrazně pokles v posledních dvou desetiletích díky pokrokům v antiretrovirální terapii (léčba infekcí způsobených retroviry, spočívá ve vhodné kombinaci léků a také v pravidelných kontrolách anamnestických a laboratorních hodnot pacienta a viru) [60, 63].

I přes pokles onemocnění způsobených rodem *Cryptococcus* existují stále ve světě oblasti, které se potýkají s vysokou incidencí. Například v subsaharské Africe patří kryptokoková meningitida k nejběžnějším meningitidám vůbec a zabije až půl milionu lidí ročně, což je větší počet než například u úmrtí způsobených tuberkulózou [62].

5.2 Zástupci

V rámci rodu *Cryptococcus* rozeznáváme asi 50 jednotlivých druhů, většina z nich žije v půdě a není nijak škodlivá pro člověka [61].

Dva nejznámější zástupci způsobující infekční onemocnění jsou *Cryptococcus neoformans* (spojený s imunosuprimovanými pacienty) a *Cryptococcus gatti* (spojený s imunokompetentními a zdravými pacienty) [60, 62].

C. neoformans je běžný zvířecí i lidský patogen vyskytující se v tlejícím dřevu. Je endemický v oblasti Spojených států podél pobřeží Pacifiku, oblast výskytu sahá až do Kanady, objevuje se také v Brazílii a v místech mírného klimatu po celém světě. Tento druh lze rozdělit na *C. neoformans* a na *C. deneoformans* [61, 62, 64, 65].

C. gatti byl naposledy hlášen v severní Kalifornii a na ostrově Vancouver v Kanadě a je endemický v Papui, Nové Guineji a v severní Austrálii. Vyskytuje se často v jehličnatých stromech, které mají voskovou kutikulu (např. u *Pseudotsuga menziesii* – Douglaska tisolistá). Tento druh lze také dále rozdělit, a to na *C. gattii*, *Cryptococcus bacillisporus*, *Cryptococcus deuterogattii*, *Cryptococcus tetragattii* a *Cryptococcus decagattii* [62, 65].

Mezi velmi běžné zástupce patří *C. laurentii* a *C. albidus*, jsou však známy případy, kdy i tyto druhy mohou způsobit závažné onemocnění [64].

5.3 Taxonomie

Rod *Cryptococcus* se řadí do domény Eukaryota, říše *Fungi* (houby). Spadá do kmenu *Basidiomycota*, podkmenu *Agaricomycotina*, třídy *Tremellomycetes*, řádu *Tremellales*, čeledi *Cryptococcaceae* [48].

5.4 Morfologie a struktura

Rod *Cryptococcus* roste dobře na kultivačních bakteriálních či houbových médiích zhruba 48–72 hodin. Při pěstování na agarech tvoří bílé, mukoidní kolonie. Specifickým agarem pro pěstování v laboratoři je agar s anglickým názvem *canavanin-glycine-bromo methyl blue* [60, 62].

Jedná se o fakultativně intracelulární parazity, kteří se vyskytují ve stádiu pohlavním (jako teleomorfy, podléhají cyklu meiózy) a nepohlavním (jako kvasinky, které se množí pučením a jsou velké 3-6 μm). Jsou oportunními patogeny. Jejich buňky jsou zapouzdřené, hlavními složkami jejich pouzdra jsou polysacharidy glukuronoxylomannan (skládá se z kyseliny glukuronové, xylózy a manózy) a glukuronoxylomannogalaktan, které jsou hlavními faktory přispívající k virulenci tohoto organismu. Mezi další faktory virulence patří například produkce melaninu (typická hnědá barva pro kolonie) nebo růst při vysokých teplotách (nepatogenní druhy však při vysokých teplotách nerostou) [60, 61, 62].

5.5 Genomová struktura

Genom *C. neoformans* se obvykle skládá ze 14 chromozomů, je však popsána heterogenita u počtu a velikosti chromozomů tohoto druhu. Genom kóduje zhruba 6 500 genů, každý gen průměrně obsahuje 5,3 intronu a asi 50-70 nukleotidů [59].

Dostupnost sekvence kryptokokového genomu pak také umožnila rozsáhlé studie genové exprese, mutageneze a genetických interakcí [59].

5.6 Využití

V dnešní době se používá *C. neoformans* ve výzkumu a rozvoji mnoha oblastí biologie, slouží jako modelový systém například v oblastech sexuální reprodukce, v oblastech syntézy polysacharidů či u zkoumání přenosů části genetické informace pomocí transdukce (přenos přes bakteriofága). Těmito detailními studii můžeme rozvíjet znalosti v oblasti fyziologie a patogeneze kvasinek [59].

6 OXID UHLIČITÝ JAKO SIGNÁLNÍ MOLEKULA KVASINEK

Oxid uhličitý vzniká v organismech při metabolickém ději zvaném Krebsův cyklus procesem dekarboxylace. Do buněk se dostává procesem difúze a uvnitř se poté mění ze pomoci enzymu karbonické anhydrázy na HCO_3^- . Příliš vysoká koncentrace CO_2 může mít na kvasinky negativní až cytotoxický vliv. Může ovlivňovat fluiditu membrány buňky kvasinek, inhibici některých důležitých enzymů a acidifikaci vnitřního prostředí. Oxidu uhličitého se ale také využívá v souvislosti s uchováváním potravin a nápojů v ochranné atmosféře tohoto plynu, který zabraňuje rychlému ničení potravin mikroby [8, 9, 10, 11].

V atmosféře se vyskytuje pouze 0,033% CO_2 , u savců pak od 0,033% do 5% (5% obsaženo v krvi). Díky tomu jsou kvasinky, vyskytující se uvnitř živých organismů, vystaveny dramaticky se měnící koncentraci tohoto plynu. Buňky kvasinek mohou reagovat na změnu CO_2 změnou svého vzhledu. Zmíněná 5% koncentrace CO_2 podněcuje u některých druhů kvasinek filamentaci (přechod z kvasinkové formy do vláknitého růstu) hlavně ve formě pseudohyfy nebo hyfy. Tyto pseudohyfy/hyfy pak usnadňují adhezi k epitelu, vznik biofilmu a průnik do buněk tkání hostitele. Možnost měnit svoji morfologii je velice důležitým faktorem virulence. Proces přechodu z kvasinkové formy na vláknitou formu je reverzibilní. Na morfologii buněk nemá vliv jen množství CO_2 , ale také sérum hostitele, pH prostředí (u savců 7,4), okolní teplota (u savců 37°C) a koncentrace kyslíku [8, 9, 10].

Kvasinky samozřejmě potřebují CO_2 také pro svůj metabolismus, až při překročení kritického prahu metabolické poptávky se CO_2 stává iniciátorem filamentace a povrchové invaze patogenu [9, 66].

Pokud hostitel nebo obecně prostředí, ve kterém kvasinka přežívá, neposkytuje dostatek oxidu uhličitého, nabývají na významu karbonické anhydrázy. Projevy CA tedy souvisí s koncentrací CO_2 . Jejich posláním je vytvořit CO_2 z přítomného hydrogenuhličitanu a vodného roztoku vyskytujících se uvnitř buňky a podněcovat tak růst i virulenci kvasinky. Tento děj může také nastat při kontaktu kvasinky s fagocyty hostitele. Exprese karbonické anhydrázy závisí na transkripčním faktoru bZIP, konkrétně Rca1p u *C. albicans* a Cst6p u *S. cerevisiae* [67].

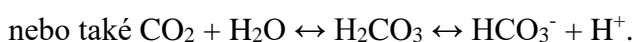
Závislost exprese karbonické anhydrázy na koncentraci oxidu uhličitého byla kromě *C. albicans* a *S. cerevisiae* popsána také u *S. macrospora*, *A. fumigatus* a *A. nidulans* [68].

Vysoká koncentrace CO₂ u *C. albicans* nepodněcuje pouze filamentaci, ale také změnu buněk z formy white (kvasinkové buňky) na formu opaque (opacitní neprůhledné prodloužené buňky schopné párovat se), nezbytnou pro páření buněk. Vnímání koncentrace CO₂ pomocí CA je tedy důležité pro sexuální reprodukci fungálních patogenů. Při nízkých koncentracích CO₂ naopak převládají buňky formy white. Přepínání těchto dvou forem také závisí na CA, transkripčních faktorech a adenylátcykláze [69].

7 REVERZIBILNÍ HYDRATAČE/DEHYDRATAČE OXIDU UHLIČITÉHO

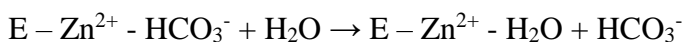
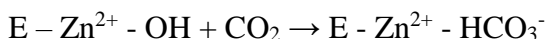
Pochopení této reakce není důležité pouze ve spojení s CAs, ale také s návrhem chemických procesů spojených s redukcí emisí CO₂ a transformací CO₂ kvůli jevu, který je znám jako skleníkový efekt. Oxid uhličitý je stejně jako například oxid dusný, methan, ozon nebo freon skleníkovým plynem. Skleníkový efekt způsobuje nadměrné zahřátí zemského povrchu a také významné klimatické změny (atmosféra sice propustí sluneční záření na povrch země, ale tepelné záření z povrchu země absorbuje a zabraňuje jeho zpětnému úniku). Tento plyn můžeme transformovat například na kyselinu mravenčí, která má význam v mnoha odvětvích průmyslu, například v potravinářství, zemědělství, kožedělném průmyslu a gumárenském průmyslu [70].

Reverzibilní hydrataci/dehydrataci CO₂ lze shrnout reakčním schématem [71, 72]:

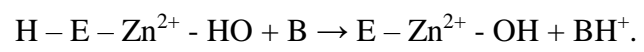
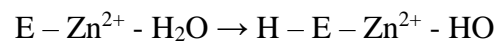


Tato reakce je katalyzována právě karbonickými anhydrázami. Je to reakce s rychlým reakčním obratem. CA je jedním z nejrychlejších enzymů v přírodě vůbec s rychlostí reakce řádově 10⁶/s. V dřívější době se vzhledem k zaostalosti metod enzymatických studií nevědělo, zda je produktem této reakce kyselina uhličitá H₂CO₃ nebo pouze hydrogenuhličitan HCO₃⁻, jelikož mezi těmito dvěma látkami probíhá rychlá ionizace [71, 72, 73].

Kinetické i katalytické mechanismy CA byly studovány za pomoci hCA II (z anglického *human carbonic anhydrase*) jako modelu. HCA jsou izoenzymy CA u lidí, které se nachází v cytosolu všech buněk. Nicméně bylo později zjištěno, že všechny CA vykazují stejné obecné reakční schéma dvou-krokového mechanismu, a to sice deprotonaci molekuly vody vázané na zinek, nukleofilní atak CO₂ zbývajícím hydroxidem zinečnatým (ten je koordinován třemi histidinovými ligandy) za vzniku hydrogenuhličitanu v prvním kroku [73, 74, 75]:



a regeneraci aktivního místa enzymu pomocí molekuly vody navázané na zinek a uvolněním hydrogenuhličitanového iontu do roztoku spolu s odstraněním protonu z aktivního místa ve druhém kroku [73, 75]:



8 KARBONICKÉ ANHYDRÁZY TŘÍDY β

8.1 Objev a historie

První karbonická anhydráza třídy β byla nevědomky objevena v roce 1939 jako součást rostlinných chloroplastů. Avšak nebyly považovány za samotné CA, k jejich definitivnímu odlišení došlo až o 50 let později, a to díky technologii DNA sekvenace. Od roku 1990 bylo objeveno mnoho druhů β CA nejen v organismech provozujících fotosyntézu, ale také v bakteriích, kvasinkách a archeích. V tomtéž roce bylo také prokázáno, že tyto rostlinné CA nejsou homologní k živočišným α CA [2].

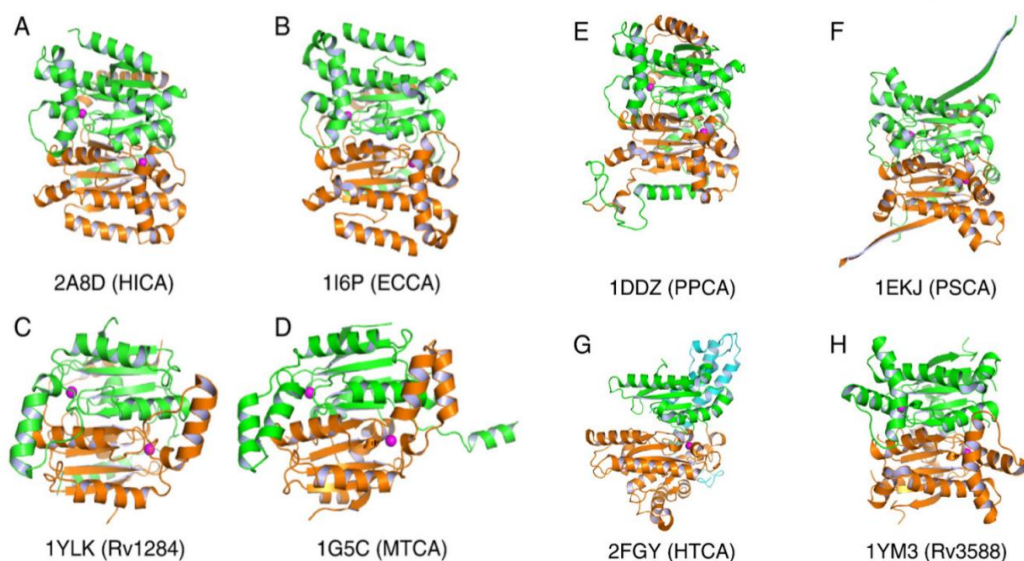
Mezi zástupci rostlin byly nejprve podrobněji popsány β CA u špenátu setého (*Spinacea oleracea*), hrachu setého (*Pisium sativum*) a huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). První bakteriální β CA byla popsána pomocí genu *CynT* u *Escherichia coli* [2].

8.2 Výskyt

V dnešní době je zastoupení β CA v bakteriích známé, vyskytují se u běžných patogenních bakterií, jako je *Mycobacterium tuberculosis*, and *Salmonella typhimurium*. Můžeme je najít také u archeí (*Methanobacterium thermoautotrophicum*), kvasinek, cyanobakterií (*Synechocystis PCC6803*), v karboxysomech chemoautotrofních bakterií (bakterií, které získávají energii oxidací anorganické látky, např. *Halothiobacillus neapolitanus*) a u zelených (*Chlamydomonas reinhardtii*) a červených řas (*Porphyridium purpureum*). CA u *Helicobacter pylori* existují dokonce ve dvou třídách, kromě intracelulární β CA se zde také vyskytuje periplazmatická α CA. β CA se nevyskytují u savců [2].

8.3 Rozdělení

Existují dvě strukturální třídy β CA, a to β CA typu I a β CA typu II. Do typu I patří PSCA (*Pisum sativum* β carbonic anhydrase), ATCA (*Arabidopsis thaliana* β carbonic anhydrase), MTCA (*Mycobacterium tuberculosis* β carbonic anhydrase), Rv1284 (*Mycobacterium tuberculosis* Rv1284 β carbonic anhydrase) a HTCA (*Halothiobacillus neapolitanus* β carbonic anhydrase). Do typu II patří HICA (*Haemophilus influenzae* β carbonic anhydrase) a ECCA (*Escherichia coli* β carbonic anhydrase), PPCA (*Porphyridium purpureum* β carbonic anhydrase) a Rv3588 (*Mycobacterium tuberculosis* Rv3588 β carbonic anhydrase). Tyto třídy se od sebe odlišují polohou aktivního místa enzymu, organizací a orientací okolních zbytků kolem iontu zinku. Jako zbytek může být navázán cystein, histidin, molekula vody nebo aspartát [2].



Obrázek 1 – tzv. ribbon diagrams základních strukturních dimerů β CA. Struktury jsou označeny svými přístupovými PDB (z anglického protein data bank) kódy, jejich název je pak uveden v závorce. Zdroj: [2].

8.4 Struktura

Detailní struktura karbonických anhydráz typu β byla objevena za pomoci rentgenové difrakce, a to konkrétně poprvé u červené řasy (*Porphyridium purpureum*) v roce 2000. Následovaly detailní studie rostlin, bakterií, archeí a dalších zástupců. Základní struktura β CA se jeví jako homodimer nebo vyšší oligomer formovaný těmito homodimery, například tetramer, oktamer [2, 12].

Každá podjednotka β CA se skládá ze tří částí, z N-terminálního ramene (složeno ze dvou nebo tří vystupujících šroubovic α , které jsou navázány na další molekulu v asymetrické jednotce), z jádra vzájemného zinek (skládá se z jednotek α - β - α) a z C-terminální koncové domény obsahující převážně α helixy, které směřují k povrchu jádra [2, 13].

N-terminální rameno jedné podjednotky zprostředkovává kontakt s N-terminálním ramenem jiné podjednotky prostřednictvím výměny domén. Zinek je vázán pomocí zbytků, které se liší podle třídy CA. Konkrétně u β CA jsou to dva zbytky aminokyseliny cysteinu, jeden zbytek aminokyseliny histidinu a dále molekula vody, aspartátu, kyseliny octové nebo iont acetátu [2, 12, 13].

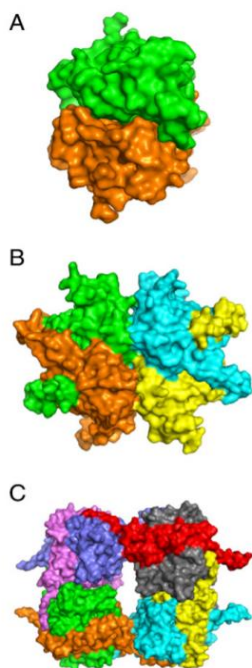
Všechna jádra β CA mají stejný konstrukční prvek, který je složený z paralelního β listu, ten je dále složen ze čtyř vláken β 2- β 1- β 3- β 4 a jednoho antiparalelního řetězce β 5 v každém monomeru nebo pseudo-monomeru. S výjimkou HTCA je každý monomer a pseudo-monomer složen z paralelních β listů složených antiparalelně tak, že společně vytváří rozšířené β jádro

karbonické anhydrázy. Toto jádro má 8 až 10 stran a rozprostírá se přes celou strukturní jednotku CA [2,13].

Na jádro β jsou připojeny α šroubovice, společně s β vlákny tvoří dohromady základní strukturu dimeru a pseudo-dimeru, ty jsou velice pevně propleteny. Téměř všechny β CA obsahují jeden iont zinku na jeden monomer nebo pseudo-monomer pseudo-tetraedrál ní struktury. Umístění iontu zinku je oním aktivním místem tohoto enzymu, toto aktivní místo je umístěno na rozhraní dvou podjednotek, vypadá jako úzký tunel a zinek je lokalizován na jeho dně [2, 12, 13].

V případě PSCA, ECCA, HICA, Rv1284, Rv3588 a MTCA je základní dimer složen ze dvou identických proteinových řetězců, v případě PPCA a HTCA je základní strukturní jednotkou pseudo-dimer, který vznikl genovou duplikací monomeru. Tento monomer se poté spojil v řetěz za vzniku onoho pseudo-dimeru s dvojnásobnou symetrií [2].

β CA se vyskytují ve formě tetramerů (HICA, ECCA, Rv1284) nebo pseudo-tetramerů (PPCA, HTCA) složených ze dvou pseudo-dimerů, dále se však mohou vyskytovat také struktury oktamerů (PSCA) a dimerů (MTCA, Rv3588) [2].



Obrázek 2 – oligomerní struktury β CA. (A) Dimer Rv 3588, rozhraní dimerizace je horizontální, rozhraní tetramerizace je pravostranné. (B) Tetramer HICA, jeden základní dimer je zelený a oranžový, druhý je žlutý a azurový. Rozhraní dimerizace je horizontální, rozhraní tetramerizace je vertikální. (C) Oktamer PSCA, základní dimery jsou oranžovo-zelené, světle-modro-růžové, červeno-šedé a azurovo-žluté, rozhraní tetramerizace je podle horizontální osy, rozhraní oktamerizace je podle vertikální osy. Zdroj: [2].

8.5 Vybrané β CA kvasinek

U kvasinek jsou až na jednu výjimku známy pouze CA třídy β . Jedinou výjimkou je pak CA třídy α u *Aspergillus oryzae* [76].

Kvasinky reagují na různé podněty z okolí, jako je například přívod živin nebo teplota. Ke vnímání okolních podnětů jim slouží signální molekuly. Speciálním příkladem signální molekuly je již výše zmíněný CO_2 , který navozuje přeměnu z kvasinkové formy na formu vláknitou. Bylo prokázáno, že tento proces nezbytný pro virulenci a patogenezí je navozen právě β CA a také kvasinkovou adenylátcyklázou. Všechny známé fungální CA patří povětšinou do třídy β , některé do třídy α [1, 15].

Kvasinkové β CA byly dosud funkčně popsány jen u několika málo zástupců (zejména u patogenních zástupců). Jedním z nich je *Candida albicans*, dále *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Sordaria macrospora*, *Malassezia globosa* a někteří zástupci *Penicilium* a *Pichia stipitis* [1, 77].

V této bakalářské práci jsou detailně popsány CA pouze tři z těchto zástupců.

8.5.1 ScNce103p

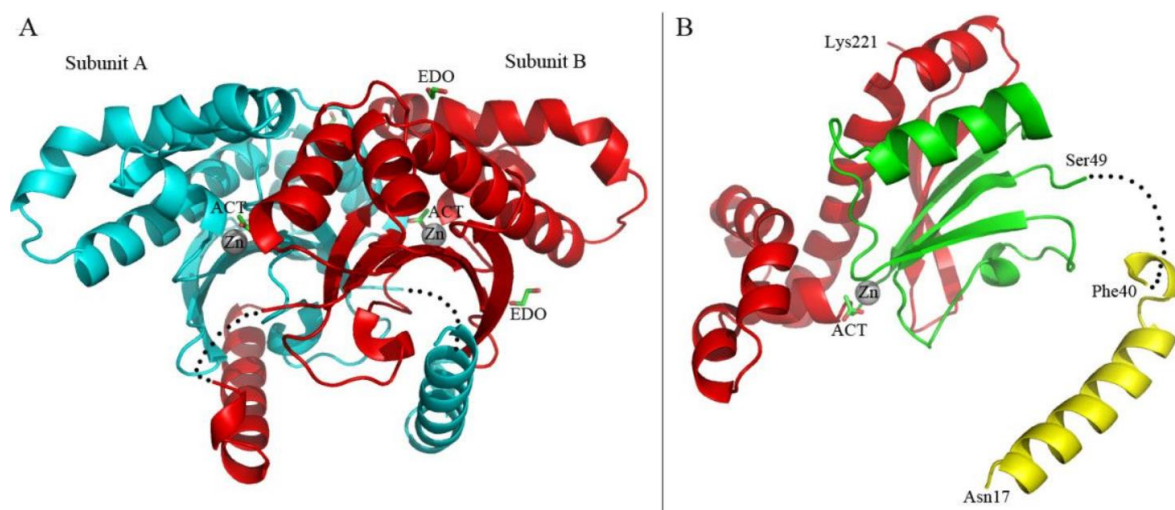
První rozpoznanou β CA byla v roce 1996 CA u *S. cerevisiae*. *ScNCE103* (karbonická anhydráza *S. cerevisiae*, zkratka Nce z anglického *non classical export*) byla poprvé identifikována jako kódující sekvence pro proteiny vyskytující se v extracelulárním prostoru, třebaže postrádá klasický signální peptid. Později objevený genový produkt ScNce103p odvozený od *ScNCE103* prokázal svoji aktivitu karbonické anhydrázy a nezbytnost pro buňky kvasinek v prostředí s nízkou koncentrací CO_2 . Ukázalo se, že kvasinka bez genu ScNce103p není schopna přežít na vzduchu, delece tohoto genu pak vyžaduje růst jen ve vyšší koncentraci (5%) oxidu uhličitého [1, 12].

ScNce103p je homodimer připomínající sedlo a její aktivní místo je umístěno mezi dvěma monomery. Podobně jako u jiných β CA se tento monomer skládá ze tří základních částí zmíněných v obecném úvodu struktury β CA (z N-terminálního ramene nezbytného pro enzymatickou aktivitu této CA – interaguje s povrchovou drážkou umístěnou na vrcholu aktivního místa sousedního monomeru uvnitř dimeru, jádra a C-terminální subdomény). Iont zinku je v tomto aktivním místě koordinován třemi různými zbytky, konkrétně dvěma cysteinovými, jedním histidinovým a jednou molekulou vody. Stabilizace iontu zinku pomocí zbytků je zprostředkována četnými vodíkovými vazbami [13].

ScNce103p je také důležitá pro homeostázu, udržení fyziologického pH kvasinky. Hlavní úlohou však stále zůstává výroba hydrogenuhličitanu, na kterém jsou závislé další metabolické pochody zprostředkované pyruvátkarboxylázou, acetyl Co-Akarboxylázou a karbamoylfosfátsyntetázou při nízkých koncentracích oxidu uhličitého [1, 15].

Pro výzkum ScNce103p byla použita amplifikace (vytvoření počtu kopií určitého úseku DNA pro následné vyšetření) DNA z genomu *S. cerevisiae* metodou PCR (polymerázová řetězová reakce, z anglického *polymerase chain reaction*, rychlá a jednoduchá metoda pomnožení konkrétního úseku DNA), dále purifikace proteinu (proces pro zjištění detailní struktury bílkovin, tento proces zahrnuje zpravidla tři kroky – za použití afinitních značek je protein v prvním kroku zachycen na matrici chromatografické kolony, následuje druhý krok, což je promytí proteinu, na závěr se z kolony vyloučí zcela čistý protein). Tento proces detailní charakterizace je použit také u zkoumání aktivity CaNce103p (CA u *Candida albicans*). Byly zkoumány enzymy a jejich aktivity: enzym s plnou délkou, dále enzym po odštěpení 13 aminokyselin - Nce103 Δ N13 (u této CA byla stanovena také krystalová struktura, bylo prokázáno, že Nce103 Δ N13 vykazuje stejnou aktivitu, jako enzym plné délky) a enzym po odštěpení 50 aminokyselin - Nce103 Δ N50 (aktivita byla narušena, prvních 50 aminokyselin je nezbytných pro její stabilitu a aktivitu) [13, 78].

Strukturně je ScNce103p podobná rostlinným β CA nalezeným u *P. sativum*, dále β CA nalezeným u *Porphyridium purpureum*, *E. coli*, *H. influenzae*, *M. tuberculosis Rv3588c* a *C. neoformans* [13].



Obrázek 3 – organizace a struktura ScNce103p. (A) Homodimer ScNce103p, molekuly zinku jsou znázorněny jako šedivé kuličky, podjednotky A a B jsou zbarveny azurově a červeně. (B) Monomer ScNce103p. Jádru α/β a C-terminální subdoména jsou zbarveny žlutě, zeleně a červeně. Zdroj: [13].

8.5.2 CaNce103p

Candida albicans, obsahující CaNce103p, je během svého životního cyklu (kdy způsobuje různé infekce) vystavena drasticky se měnícím okolním podmínkám (koncentrace CO₂ v krvi je 150krát vyšší, než v atmosféře). Hlavní úlohou CA u *Candida albicans* je tedy zvýšení virulence a patogenity pomocí procesu filamentace. Bez funkční CaNce103p *C. albicans* nemůže přežít na vzduchu, postradatelnost CaNce103p je přípustná pouze u vyšší koncentrace CO₂ (5%) [1, 12].

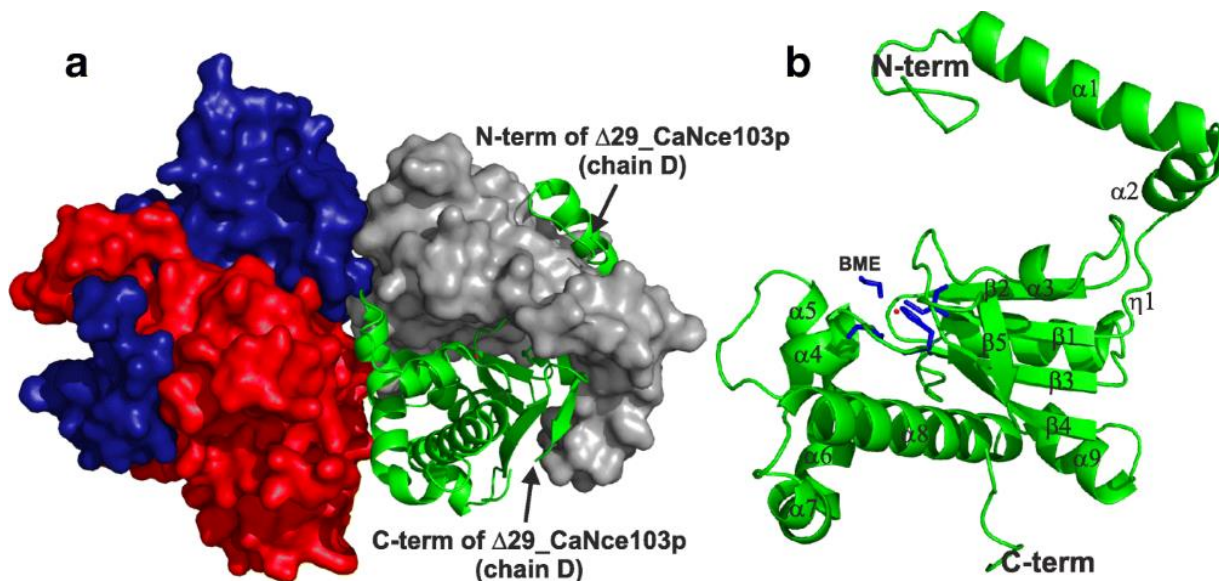
Její fyziologická role je podobná ScNce103p v pekařských kvasinkách *S. cerevisiae*, ale strukturou se více podobá karbonické anhydráze CAS1 nalezené u saprofytické houby *Sordaria macrospora*, která je také tetramerní. Je také podobná struktuře βCA u červených řas a u řady bakterií (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* a *Haemophilus influenzae*) [12].

CaNce103p byla připravena pomocí rekombinantního expresního systému v *E. coli* a má strukturu homotetrameru složeného ze dvou homodimerů. N-terminální konec obsahuje dvě na sebe kolmé α šroubovice, pomocí nich jsou pak spojeny jednotlivé podjednotky. Každý monomer obsahuje více než 90 zbytků, které zprostředkovávají kontakt s druhým monomerním, společně pak vytváří dimer. Jádro CaNce103p je uspořádáno stejně, jako u jiných βCA (čtyři paralelní β vlákna a jeden antiparalelní řetězec β, společně vytváří β list po obou stranách lemovaný α helixem). C-terminální část sousedící s doménou β listu je většinou helikální [12].

Zinek vázaný v aktivním místě enzymu je v tomto případě koordinován dvěma zbytky cysteinu, jedním histidinovým a molekulou β-merkaptioethanolu (sloučenina odvozená od ethylenglykolu, čirá, bezbarvá kapalina s nepříjemným zápachem, mísitelná s vodou, jedna její skupina -OH je nahrazena thiolovou skupinou -SH, používá se v molekulární biologii jako složka pufru, má schopnost redukce disulfidických můstků, je nezbytná pro udržení proteinu v rozpustném stavu během purifikačního procesu, který charakterizuje detailní strukturu proteinu). Každý monomer obsahuje jeden iont Zn²⁺ umístěný v aktivním místě na dně tunelu, podobně jako u ScNce103p [12].

CaNce103p lze dále rozdělit podle počtu odštěpených aminokyselin, čehož se využívá při procesu purifikace a zkoumání aktivity enzymu. Pro výzkum a izolaci DNA byl využit genom *C. albicans*, který byl následně amfplikován pomocí metody PCR. Dělení je následující: Δ29_CaNce103p, Δ48_CaNce103p, Δ61_CaNce103p (zkrácení o 29, 48 a 61 aminokyselin). Zkrácení o 29 aminokyselin a 48 aminokyselin nezpůsobilo změnu v celkové aktivitě enzymu,

zkrácení o 61 aminokyselin však ano. Na počtu odštěpených aminokyselin pak závisí finální prostorové uspořádání, může to být monomer, dimer, tetramer nebo jen sraženina [12].



Obrázek 4 – detailní krystalová struktura karbonické anhydrázy $\Delta 29_CaNce103p$. (A) Tetramerní sestavení karbonické anhydrázy $\Delta 29_CaNce103p$. Tetramer je znázorněn řetězci A, B, C (červená, modrá, šedá) a D (zelená). (B) $\Delta 29_CaNce103p$ monomer. Jsou zde znázorněny N-terminální konec a C-terminální konec. Ionty Zn^{2+} jsou označeny jako červené kuličky. Koordinující zbytky histidinu, cysteinu a β -merkaptóethanolu (modré tyčinky) jsou zde znázorněny jen pro řetězec D. Zdroj: [12].

Nepostradatelnost a zároveň fakt, že $CaNce103p$ není nijak příbuzný s CA savců, staví $CaNce103p$ do role slibné budoucnosti v oblasti antimykotické léčby. Inhibitory $Nce103p$ nemohou hrát roli v oblasti systémových mykóz, jelikož krev obsahuje 5% CO_2 a tato koncentrace aktivitu $Nce103p$ potlačuje. Tyto inhibitory by však mohli být použity jako složky mastí pro lokální léčbu nebo složky povrchových dezinfekčních prostředků v nemocničním prostředí (koncentrace CO_2 ve vzduchu je 150krát menší, než v krvi člověka). Popsané struktury $CaNce103p$ by mohly být tedy využity při navrhování a vývoji fungicidních sloučenin, v současné době však nevykazují dostatečnou selektivitu [12].

Využitelnost CA je také zkoumána ve spojitosti se sekvestrací uhlíku, což znamená, že je oxid uhličitý přeměněn na stabilní uhlikatou sloučeninu a uložen v rostlině nebo půdě. Vývoj sekvestračních systémů má velký význam při zmírnění stále se zvyšujícího obsahu oxidu uhličitého v atmosféře [12].

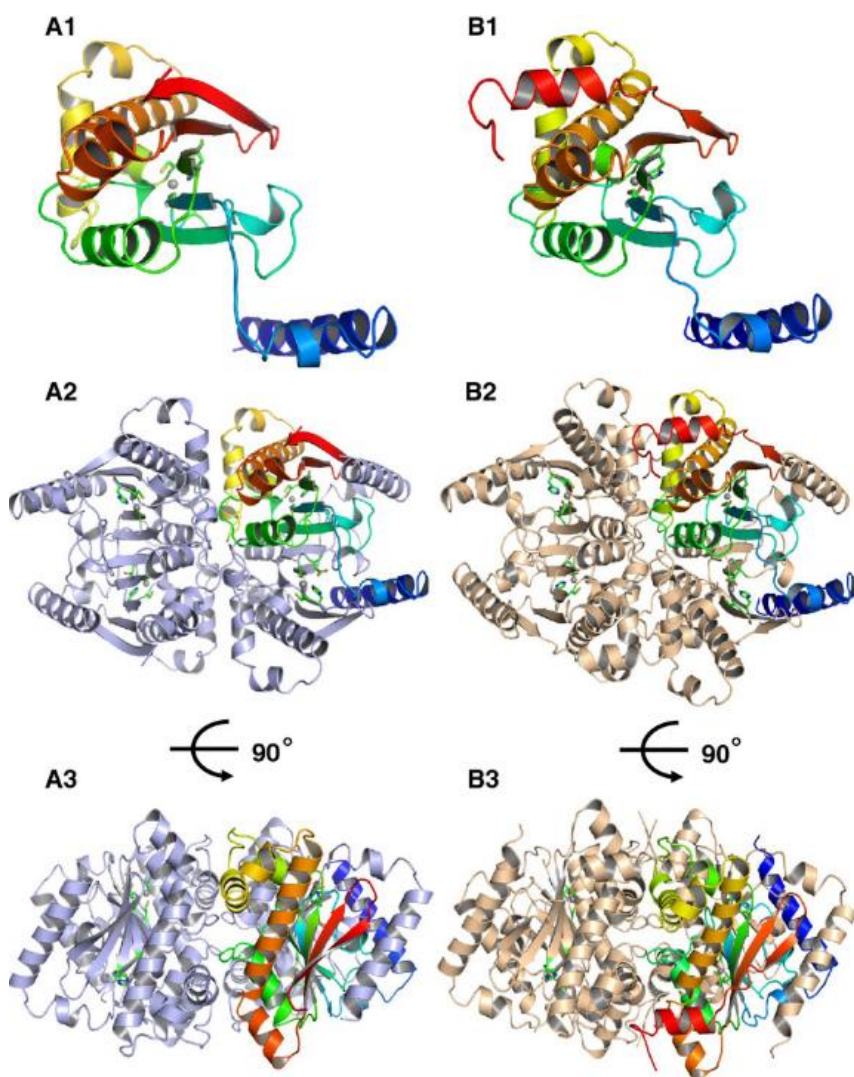
8.5.3 CAS1, CAS2

Jedná se o zkratky karbonických anhydráz saprofytické houby *Sordaria macrospora*. Její genom kóduje celkem čtyři CA, CAS1, CAS 2, cas3 a cas4. Poslední dvě zmíněné nejsou tolik významné pro rozmnožování. Tento redundantní systém obsahující více CA je schopen jednotlivé CA mezi sebou navzájem v případě potřeby nahradit (oproti tomu většina kvasinek a bakterií musí přísun hydrogenuhlčitanu zajišťovat jen jednou CA). Oligomerní struktura CAS1 i CAS 2 je tetramerní a je příbuzná s rostlinnými β CA. Obě CA se významně podílejí na pohlavním vývoji *Sordaria macrospora*. K jejich výzkumu byl taktéž použit proces purifikace jako u předchozích dvou karbonických anhydráz [79].

CAS1 a CAS2 se staly prvním příkladem tetramerních struktur β CA v říši hub. Celková struktura každého monomeru obsaženého v tetramerní struktuře se skládá z N-terminálního konce tvořeného dvěma na sebe navzájem kolmými α helixy, které interagují se sousední podjednotkou a napomáhají tak ke tvorbě dimeru. Jádro je konstruováno stejně jako u jiných β CA (smíšený β list z pěti vláken $\beta 1 - \beta 5$), to znamená ze čtyř β vláken uspořádaných paralelně ($\beta 2 - \beta 1 - \beta 3 - \beta 4$) a pátého antiparalelního řetězce $\beta 5$. C-terminální subdoménu tvoří α helixy ze jedné strany přiléhající k β listu, z druhé strany se tyto helixy podílí na tvorbě dimerů a homotetramerů. U obou enzymů CAS1 i CAS2 je iont Zn^{2+} koordinován tetrahedrálně, rozdíl je však v odlišnosti čtvrtého koordinujícího zbytku [79].

V případě CAS1 je iont Zn^{2+} koordinován pomocí dvou zbytků cysteinu, jednoho zbytku histidinu a molekuly vody. CAS1 je cytoplazmatický enzym složený z 234 aminokyselin [79].

V případě CAS2 je koordinace zprostředkována dvěma zbytky cysteinu, jedním zbytkem histidinu a jedním zbytkem kyseliny asparagové (jinak nazývané aspartát). CAS2 se projevuje jako signální polypeptid pro translokaci v mitochondriích a je složen z 284 aminokyselin [79].



Obrázek 5 – krystalové struktury karbonických anhydráz CAS1 a CAS2. (A) CAS1. (B) CAS2. (A1, B1) Monomery CAS1 a CAS2 (duhové zbarvení). (A2, B2) Kvartévní struktura CAS1 a CAS2, v duhovém zbarvení jsou zobrazeny monomery v doplnění dalších monomerů tvořící dohromady tetramerní sestavení. (A3, B3) Tetramer (A2) a (B2) otočený o 90°. Iony Zn^{2+} jsou zobrazeny jako šedivé kuličky. Boční řetězce zbytků koordinujících ionty Zn^{2+} v CAS1 a CAS2 jsou znázorněny jako zelené tyčinky. Zdroj: [79].

Obě CA nacházející se u *S. macrospora* byly zkoumány pomocí rekombinantního expresního systému v *E. coli*. Pro zjištění detailního strukturního uspořádání a funkčnosti bylo provedeno klonování, exprese a purifikace proteinu, a dále také krystalizace těchto enzymů. Bylo také prokázáno, že jsou tyto dvě CA ze *S. macrospora* schopny obnovit růst Nce103 u *S. cerevisiae* nebo jej dokonce funkčně nahradit, pokud kvasinka tuto karbonickou anhydrázu postrádá. *Sordaria macrospora* je také doposud jediná známá saprofytická houba, která je schopna přežít na atmosférickém vzduchu při absenci funkční karbonické anhydrázy. Pro její normální fungování jí totiž stačí pouze jedna ze čtyř CA, delece ostatních tří ji nijak nelimituje.

Delece CA u ostatních organismů obsahujících tyto enzymy ovšem vede k úplné neschopnosti růstu v aerobních podmínkách (obsahují jen jednu CA) [12, 79].

V poslední době roste zájem o využití CA ve spojení s průmyslovou sekvestrací oxidu uhličitého. Karbonické anhydrázy využívané v průmyslovém odvětví by však neodolali drsným podmínkám, jako je například vysoká koncentrace oxidů dusíku NO_x a oxidů síry SO_x . Přítomnost oxidů ve spalinách by inhibovala aktivitu těchto enzymů. Využití CA je také diskutováno ve spojení s výrobou biopaliv [77, 79].

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium karbonických anhydráz. Bylo vysvětleno, co vůbec karbonické anhydrázy jsou, kde se vyskytují, jaká je jejich funkce a struktura.

Byla zmíněna základní podstatná fakta o kvasinkách, o jejich historii, současnosti a jejich využití. Byla detailně popsána struktura kvasinkové buňky spolu s jejich schopností tvořit pouzdra. Dále byl popsán jejich metabolismus a rozmnožování.

V této bakalářské práci byly také detailně popsány některé významné rody kvasinek, konkrétně rod *Saccharomyces*, *Candida* a *Cryptococcus*. U každého rodu byl zmíněn obecný úvod, nejznámější a nejdůležitější zástupci, taxonomie rodu, morfologie, struktura, genomová struktura a využití.

V další části práce byla detailně popsána funkce oxidu uhličitého jako signální molekuly následovaná rozborem reakčního mechanismu reverzibilní hydratace/dehydratace oxidu uhličitého.

Poslední část byla věnována karbonickým anhydrázám třídy β . Byl popsán jejich objev spolu s historií, jejich výskyt, rozdělení a detailní struktura. Celou práci završila část vybraných β CA vyskytujících se u *S. cerevisiae*, *C. albicans* a *S. macrospora*. Pro lepší popis a pochopení struktury β CA byly do práce vloženy příslušné obrázky.

ZDROJE

1. Elleuche, S. & Poggeler, S. Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology* **156**, 23–29 (2010).
2. Rowlett, R. S. Structure and catalytic mechanism of the β -carbonic anhydrases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 362–373 (2010).
3. Boone, C. D., Gill, S., Habibzadegan, A. & McKenna, R. Carbonic Anhydrase: An Efficient Enzyme with Possible Global Implications. *Int. J. Chem. Eng.* **2013**, 1–6 (2013).
4. Aguilera, J., Van Dijken, J. P., De Winde, J. H. & Pronk, J. T. Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochem. J.* **391**, 311–316 (2005).
5. Supuran, C. T. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J.* **473**, 2023–2032 (2016).
6. Kopecká, J., Matoulková, D. & Němec, M. Yeast and its uses. *Kvas. Prum.* **58**, 326–335 (2012).
7. Barnett, J. A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **16**, 755–771 (2000).
8. Stenni, B. *et al.* An oceanic cold reversal during the last deglaciation. *Science* **293**, 2074–7 (2001).
9. Hall, R. A. *et al.* CO₂ Acts as a Signalling Molecule in Populations of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **6**, e1001193 (2010).
10. Tao, L. *et al.* Integration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with cAMP signaling and Sfl2 pathways in the regulation of CO₂ sensing and hyphal development in *Candida albicans*. *PLOS Genet.* **13**, e1006949 (2017).
11. Aguilera, J., Petit, T., Dewinde, J. & Pronk, J. Physiological and genome-wide transcriptional responses of to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Res.* **5**, 579–593 (2005).
12. Dostál, J. *et al.* Crystal structure of carbonic anhydrase CaNce103p from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Struct. Biol.* **18**, 14 (2018).

13. Teng, Y.-B. *et al.* Structural insights into the substrate tunnel of *Saccharomyces cerevisiae* carbonic anhydrase Nce103. *BMC Struct. Biol.* **9**, 67 (2009).
14. Crichton, R. R. & Crichton, R. R. Zinc: Lewis Acid and Gene Regulator. *Biol. Inorg. Chem.* 197–210 (2008). doi:10.1016/B978-044452740-0.50012-0
15. Lehneck, R. & Pöggeler, S. A matter of structure: structural comparison of fungal carbonic anhydrases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 8433–8441 (2014).
16. Martin, R., Pohlers, S., Mühlshlegel, F. A. & Kurzai, O. CO₂ sensing in fungi: at the heart of metabolic signaling. *Curr. Genet.* **63**, 965–972 (2017).
17. Amoroso, G., Morell-Avrahov, L., Müller, D., Klug, K. & Sültemeyer, D. The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol. Microbiol.* **56**, 549–558 (2005).
18. Klengel, T. *et al.* Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO₂ Sensing with cAMP Signaling and Virulence. *Curr. Biol.* **15**, 2021–2026 (2005).
19. World Agroforestry Centre. *Agroforestry systems*. (Kluwer Academic Publishers).
20. Marián Mazáň, Katarína Mazáňová, V. F. (PDF) Bunková stena húb - Výzva pre výskum nových antimykotík (Fungal Cell Wall – Challenge for the Search of New Antimycotics). *Chem. List.* 433–439 (2006).
21. Rothblatt, J. A. *The Yeasts. Volume 4: Yeast Organelles*. Anthony H. Rose, J. Stuart Harrison. *Q. Rev. Biol.* **67**, 368–369 (1992).
22. Van Der Rest, M. E. *et al.* *The Plasma Membrane of Saccharomyces cerevisiae: Structure, Function, and Biogenesis*. *Microbiological reviews* **59**, (1995).
23. Sherwood, R. K. & Bennett, R. J. Fungal meiosis and parasexual reproduction — lessons from pathogenic yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 599–607 (2009).
24. Knop, M. Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. *C. R. Biol.* **334**, 599–606 (2011).
25. Anaissie, E. J., McGinnis, M. R. & Pfaller, M. A. *Clinical mycology*. (Churchill Livingstone, 2009).
26. Farid, F., Sideeq, O., Khan, F. & Niaz, K. *Saccharomyces cerevisiae*. in *Nonvitamin and*

- Nonmineral Nutritional Supplements* 501–508 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-812491-8.00066-7
27. Federhen, S. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D136–D143 (2012).
 28. Mustafa Türker. (PDF) Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. *Conference Paper* (2014). Available at: https://www.researchgate.net/publication/285598626_Yeast_Biotechnology_Diversity_and_Applications. (Accessed: 9th April 2019)
 29. de Hoog, S., Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M. J. *Atlas of Clinical Fungi, Second Edition*. (Amer Society for Microbiology, 2000).
 30. Herskowitz, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 536–53 (1988).
 31. Dr.Max EnteroMax tob.10 | Dr. Max lékárna. Available at: <https://www.drmax.cz/dr-max-enteromax-tob-10>. (Accessed: 19th April 2019)
 32. Vítejte - Pangamin. Available at: <http://www.pangamin.cz/cs/>. (Accessed: 24th May 2019)
 33. Manolakaki, D. *et al.* *Candida* infection and colonization among trauma patients. *Virulence* **1**, 367–375 (2010).
 34. Kourkoumpetis, T. K. *et al.* The Effect of Cumulative Length of Hospital Stay on the Antifungal Resistance of *Candida* Strains Isolated from Critically Ill Surgical Patients. *Mycopathologia* **171**, 85–91 (2011).
 35. Yeast Infections. Available at: <https://medlineplus.gov/yeastinfections.html>. (Accessed: 23rd April 2019)
 36. CHROMagar™ *Candida* Chromogenic Media Focus on *Candida* Species. Available at: http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-candida-focus-on-candida-species-22.html#.XMHP_ugzZPZ. (Accessed: 25th April 2019)
 37. Sabouraud agar (SA) | Biovendor. Available at: <https://www.biovendor.cz/sabouraud-agar-sa-/p91.98029/>. (Accessed: 25th April 2019)
 38. Oxoid Česká republika - Product Detail. Available at: http://www.oxoid.com/CZ/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0589&org=19&c=

CZ&lang=EN. (Accessed: 25th April 2019)

39. Candida BCG Agar Base | Microbiology | Dehydrated Culture Media | Selective | Animal based Media | Fungal. Available at: <http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Microbiology/Dehydrated-Culture-Media-Diagnostic-Animal-based-Media-Fungal/Candida-BCG-Agar-Base-M355>. (Accessed: 25th April 2019)
40. Gow, N. A. R. & Yadav, B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology* **163**, 1145–1147 (2017).
41. Satoh, K. *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* **53**, 41–44 (2009).
42. Chatterjee, S. *et al.* Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics* **16**, 686 (2015).
43. Identification of *Candida auris* | *Candida auris* | Fungal Diseases | CDC. Available at: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/recommendations.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffungal%2Fdiseases%2Fcandidiasis%2Frecommendations.html. (Accessed: 23rd April 2019)
44. Fidel, P. L., Vazquez, J. A., Sobel, J. D. & Sobel, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 80–96 (1999).
45. Trofa, D., Gácsér, A. & Nosanchuk, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 606 (2008).
46. Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P. & Chaves, G. M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Front. Microbiol.* **8**, 1927 (2017).
47. Pfaller, M. A. *et al.* *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 515–21 (2008).
48. Taxonomy Browser. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. (Accessed: 23rd April

- 2019)
49. Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. *The yeasts : a taxonomic study*. (Elsevier Science, 1998).
 50. da Silva Dantas, A. *et al.* Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 111–118 (2016).
 51. *Candida albicans* Yeast Cell, illustration - Stock Image - C027/9943 - Science Photo Library. Available at: <https://www.sciencephoto.com/media/705615/view/candida-albicans-yeast-cell-illustration>. (Accessed: 25th April 2019)
 52. Morales, D. K. *et al.* Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio* **4**, e00526-12 (2013).
 53. Van Neil, C. B. & Cohen, A. L. On the metabolism of *Candida albicans*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **20**, 95–112 (1942).
 54. Han, T.-L., Cannon, R. D. & Villas-Bôas, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet. Biol.* **48**, 747–763 (2011).
 55. Mendes Giannini, M. J. S., Bernardi, T., Scorzoni, L., Fusco-Almeida, A. M. & Sardi, J. C. O. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* **62**, 10–24 (2013).
 56. Poulain, D. *Candida albicans* , plasticity and pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**, 208–217 (2015).
 57. Busse, H.-J., Tindall, B. J., Ludwig, W., Rosselló-Móra, R. & Kämpfer, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 249–266 (2010).
 58. doc. MUDr. Jaromír Bystroň, Cs. Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi. *Interní medicína* 12–17 (2012).
 59. Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H. & Doering, T. L. *Cryptococcus neoformans* : historical curiosity to modern pathogen. *Yeast* **31**, 47–60 (2014).
 60. Mada, P. K. & Alam, M. U. *Cryptococcus (Cryptococcosis)*. *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
 61. Pescador Ruschel, M. A. & Thapa, B. *Meningitis, Cryptococcal*. *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).

62. Akram, S. M. & Koirala, J. *Cryptococcus (Cryptococcosis), Cutaneous. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
63. Rozsypal H. *et al.* Doporučený postup komplexní péče o dospělé infikované HIV. 10 (2010). Available at: <https://www.infekce.cz/DoporART10.htm>. (Accessed: 4th May 2019)
64. Cheng, M. F., Chiou, C. C., Liu, Y. C., Wang, H. Z. & Hsieh, K. S. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1608–11 (2001).
65. May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T. & Nielsen, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 106–17 (2016).
66. Han, T.-L., Cannon, R. D. & Villas-Bôas, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet. Biol.* **48**, 747–763 (2011).
67. Cottier, F. *et al.* The bZIP Transcription Factor Rca1p Is a Central Regulator of a Novel CO₂ Sensing Pathway in Yeast. *PLoS Pathog.* **8**, e1002485 (2012).
68. Elleuche, S. & Pöggeler, S. β -Carbonic Anhydrases Play a Role in Fruiting Body Development and Ascospore Germination in the Filamentous Fungus *Sordaria macrospora*. *PLoS One* **4**, e5177 (2009).
69. Huang, G., Srikantha, T., Sahni, N., Yi, S. & Soll, D. R. CO₂ regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr. Biol.* **19**, 330–4 (2009).
70. Guzmán-Angel, D., Gutiérrez-Oliva, S. & Toro-Labbé, A. Hydrogenation and hydration of carbon dioxide: a detailed characterization of the reaction mechanisms based on the reaction force and reaction electronic flux analyses. *J. Mol. Model.* **25**, 16 (2019).
71. Khalifah, R. G. Carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase: paradoxical consequences of the unusually rapid catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 1986–9 (1973).
72. Boone, C. D., Gill, S., Habibzadegan, A. & McKenna, R. Carbonic Anhydrase: An Efficient Enzyme with Possible Global Implications. *Int. J. Chem. Eng.* **2013**, 1–6 (2013).
73. Rogers, D. M., Jiao, D., Pratt, L. R. & Rempe, S. B. Structural Models and Molecular

- Thermodynamics of Hydration of Ions and Small Molecules. *Annu. Rep. Comput. Chem.* **8**, 71–127 (2012).
74. Taslimi, P. *et al.* The human carbonic anhydrase isoenzymes I and II (hCA I and II) inhibition effects of trimethoxyindane derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 152–157 (2016).
75. Yadav, R. R. *et al.* Carbonic anhydrase mediated carbon dioxide sequestration: Promises, challenges and future prospects. *J. Basic Microbiol.* **54**, 472–481 (2014).
76. Cuesta-Seijo, J. A. *et al.* Structure of a dimeric fungal α -type carbonic anhydrase. *FEBS Lett.* **585**, 1042–1048 (2011).
77. Vullo, D., Lehneck, R., Pöggeler, S. & Supuran, C. T. Sulfonamide inhibition studies of two β -carbonic anhydrases from the ascomycete fungus *Sordaria macrospora*, CAS1 and CAS2. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **33**, 390–396 (2018).
78. Růčková, E., Müller, P. & Vojtěšek, B. Protein Expression and Purification. *Klin. Onkol.* **27**, S92–S98 (2014).
79. Lehneck, R. *et al.* Crystal structures of two tetrameric β -carbonic anhydrases from the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora*. *FEBS J.* **281**, 1759–1772 (2014).