

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

System quorum sensing bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Komárková**
Osobní číslo: **C17177**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Systém quorum sensing bakterie *Pseudomonas aeruginosa***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o systému quorum sensing bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2) V práci se zaměřte na obecné popsání systému quorum sensing, definujte bakterii *Pseudomonas aeruginosa* a poté popište, jak funguje systém quorum sensing u této bakterie.
- 3) Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. NCBI Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.111/1998Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. X/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

Martina Komárková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za zadání zajímavého tématu. Dále bych na tomto místě ráda poděkovala své konzultantce bakalářské práce Ing. Lucii Michalcové za odborné vedení, za pomoc, vstřícný přístup a rady při zpracování této práce.

Anotace

Tato bakalářská práce se věnuje popsání systému quorum sensing bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Obsah práce se zabývá obecným popisem systému quorum sensing a popisem mechanismu fungování, dále je charakterizována bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a její patogenita. Závěrečná kapitola se zabývá konkrétním popisem systému quorum sensing u této bakterie.

Klíčová slova

quorum sensing, *Pseudomonas aeruginosa*, patogenita, faktory virulence

Title

Pseudomonas aeruginosa quorum sensing system

Annotation

This Bachelor thesis deals with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing system. It deals with a general description of the quorum sensing system, characterization of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and its pathogenicity. The final chapter deals with a specific description of the quorum sensing system in this bacteria.

Keywords

quorum sensing, *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenicity, virulence factors

Obsah

Úvod	14
1 Quorum sensing	15
1.1 <i>Vibrio fischeri</i>	15
1.2 Peptidy zprostředkovávající QS u grampozitivních bakterií	16
1.3 Peptidy zprostředkovávající QS u gramnegativních bakterií.....	17
1.3.1 Dráha QS u bakterie <i>Vibrio fischeri</i> – dráha LuxI-LuxR.....	18
1.4 Cílené ovlivnění QS systémů.....	19
2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.1 Taxonomické zařazení <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.2 Morfologické znaky	21
2.3 Kultivace	22
2.3.1 Růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na specifických agarech	22
2.4 Patogenita.....	24
2.5 Onemocnění způsobená <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.5.1 Infekce dýchacích cest u nemocných s cystickou fibrózou.....	26
2.5.2 Ventilátorové pneumonie	27
2.5.3 Infekční komplikace popálenin	28
2.5.4 Katéetrové infekce.....	28
3 Quorum sensing systém u bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3.1 Mechanismus dráhy – LasI/LasR-RhlI/RhlR systém virulence	30
3.2 Systém PQS – pseudomonádový chinolonový signál.....	32
3.3 Systém IQS – integrovaný quorum sensing.....	33
3.4 Vybrané faktory virulence	33
3.4.1 Biofilm.....	34

3.4.2	Pyocyanin	35
3.5	Rod <i>Candida</i>	36
3.5.1	<i>Candida albicans</i>	37
3.5.2	System quorum sensing <i>Candida albicans</i>	37
3.6	Vzájemné interakce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>Candida albicans</i>	38
4	Závěr.....	40
5	Seznam použité literatury	41

Seznam ilustrací a tabulek

Obr. 1: Sepiola kropenatá - světelný orgán	16
Obr. 2: Obecné schéma pro peptidy zprostředkovávající quorum sensing u grampozitivních bakterií.....	17
Obr. 3: Strukturní vzorec acyl homoserin laktonu	18
Obr. 4: Schéma systému quorum sensing u bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	19
Obr. 5: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> po obarvení dle Grama.....	22
Obr. 6: Místa infekce způsobené <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
Obr. 7: Schéma quorum sensing systému u bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Obr. 8: Strukturní vzorec signální molekuly pro pseudomonádový chinolonový signál.	32
Obr. 9: Interakce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>Candida albicans</i>	39

Seznam zkratek a značek

- 3-oxo-C12-AHL – 3-oxo-dodekanoyl-homoserin lakton
- ABC – adenosintrifosfát – binding cassette transportér
- AHL – acyl homoserin lakton
- AIDS – syndrom získaného selhání imunity
- AIP – autoindukční peptid
- ATP – adenosintrifosfát
- C4-AHL – butanoyl-homoserin lakton
- cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
- c-di-GMP – cyklický diguanosin-5-monofosfát
- CF – cystická fibróza
- CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CNS – centrální nervová soustava
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- IL – interleukin
- IQS – integrovaný quorum sensing
- JIP – jednotka intenzivní péče
- LasI – acyl homoserin lakton syntáza
- LasR – transkripční aktivační protein
- LuxI – acyl homoserin lakton syntáza
- LuxR – transkripční aktivační protein
- Pel – extracelulární polysacharid *Pseudomonas aeruginosa*
- PQS – pseudomonádový chinolonový signál
- Psl – extracelulární polysacharid *Pseudomonas aeruginosa*
- QS – quorum sensing
- QSI – quorum sensing inhibitory

RANTES – Regulated upon Activation, normal T cell expressed and secreted, prozánětlivý chemokin

RhII – acyl homoserin lakton syntáza

RhIR – transkripční aktivační faktor

RNA – ribonukleová kyselina

sRNA – small RNA

VP – ventilátorová pneumonie

Terminologie

autoinduktor: chemická signální molekula, která je v procesu quorum sensing produkována a rozpoznávána (Reading, Sperandio, 2006).

dimorfismus: výskyt jednoho druhu organismu ve dvou morfologicky různých formách (Dowd, 2014).

efluxní pumpa: transmembránová pumpa, která využívá k extracelulárnímu transportu látek hydrolýzu ATP (Pechandová a kol., 2006).

integrováný quorum sensing: signální dráha systému quorum sensing bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Lee, Zhang, 2015).

operon: geny, které jsou přepisovány do jedné molekuly mRNA, tyto geny jsou společně regulovány - buď jsou přepisovány všechny - nebo žádný (Kočárek, 2008).

pseudomonádový chinolonový signál: signální dráha systému quorum sensing bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Lee, Zhang, 2015).

quorum sensing: forma chemické komunikace mezi bakteriemi, která reguluje genovou expresi (Prescott, Decho, 2020).

transkripce: přepis genetické informace z DNA do mRNA pomocí RNA-polymeráz (Kočárek, 2008).

Úvod

Pseudomonas aeruginosa se řadí mezi podmíněně patogenní mikroorganismy. Jedná se o klinicky nejvýznamnějšího zástupce rodu *Pseudomonas*. Běžně se vyskytuje ve vodě, v půdě, na rostlinách a na kůži a sliznicích živočichů, včetně lidí. Patogenita této bakterie se projevuje u pacientů se sníženou obranyschopností a způsobuje řadu zdravotních komplikací. Léčbu onemocnění způsobených touto bakterií značně komplikuje rezistence vůči široké škále antibiotik.

Schopnost bakteriálního kmene uplatnit druhovou patogenitu na daného hostitele označujeme jako virulenci. Mezi faktory virulence patří struktury přítomné na povrchu bakteriální buňky a dále také látky extracelulární povahy. Řada těchto faktorů vzniká pod vlivem systému quorum sensing. Protože bakterie *Pseudomonas aeruginosa* vystupuje jako významný oportunní lidský patogen, stal se tento bakteriální druh jedním z modelových organismů výzkumu quorum sensing mechanismu.

Quorum sensing je regulační mechanismus, pomocí kterého bakterie komunikují mezi sebou navzájem a následně přizpůsobují své chování podmínkám okolního prostředí. Tento systém však není omezen jen na doménu bakterií, ale můžeme se s ním setkat také například u kvasinek. *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans* se často nacházejí ve vzájemné koexistenci ve směsných biofilmech. Signální molekuly jejich quorum sensing drah jsou rozdílné chemické povahy, ale přesto se zapojují do řady interakcí.

V této práci se zabývám charakterizací bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a specifickým popisem jejího quorum sensing systému.

1 Quorum sensing

Quorum sensing (QS) je termín pro formu chemické komunikace mezi bakteriemi, která následně reguluje genovou expresi a tím umožňuje mikrobiálním společenstvím reagovat na změny okolního životního prostředí (Prescott, Decho, 2020). QS úzce souvisí s hustotou bakteriální populace. Tento mechanismus je zprostředkován tvorbou a následným rozpoznáváním chemických signálních molekul označovaných jako autoinduktory. Pokud stoupá hustota dané bakteriální populace, stoupá i koncentrace signálních molekul. Po dosažení prahové koncentrace následuje indukce nebo inhibice specificky cílených genů (Reading, Sperandio, 2006). Systém QS řídí tyto geny a ty řídí aktivity, které mají svůj význam, pokud se na nich podílí větší počet bakteriálních buněk jednajících synchronně (Rutherford, Bassler, 2012).

Tento fenomén byl poprvé objeven a popsán u mořských organismů žijících v symbióze. Avšak systém QS využívají také patogenní bakterie k cílené změně genové exprese faktorů virulence při sdružení s eukaryotickým hostitelským organismem. Mezi potenciálně patogenní bakterie, disponující touto vlastností, patří například *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella typhimurium* a *Yersinia enterocolitica* (Miller, Bassler, 2001).

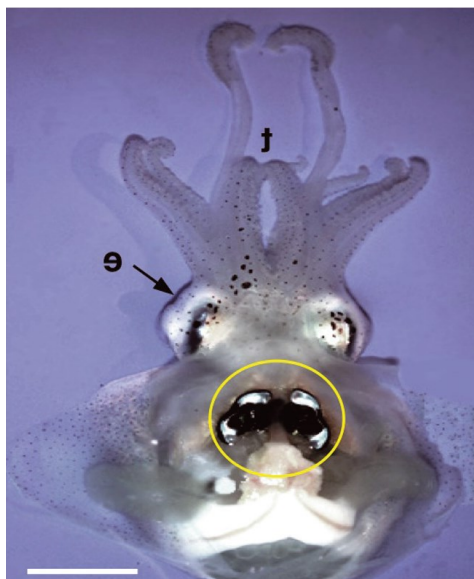
Mezi procesy, které jsou kontrolovány QS, patří produkce antibiotik, tvorba biofilmu, produkce virulentních faktorů nebo schopnost bioluminiscence (Rutherford, Bassler, 2012).

1.1 *Vibrio fischeri*

Pojem QS byl v literatuře poprvé použit v souvislosti s bakterií *Vibrio fischeri*. Jedná se o mořskou bakterii, která má schopnost luminescence. Bylo zjištěno, že pokud se tato bakterie nachází v prostředí svých symbiotických hostitelů, dokáže exprimovat geny ovlivňující emisi světla. Kódujícím enzymem je luciferrasa (Suga, 2003).

Každý eukaryotický hostitel využívá poskytované světlo ke konkrétnímu účelu. Například sepiola kropenatá (*Euprymna scolopes*) jevu bioluminiscence využívá k ochraně před predátory. Díky světélkování se tělo sepioly jeví jako odlesky měsíčního světla. I proto jsou tyto živočichové aktivní převážně v noci (Miller, Bassler, 2001). Bakteriální populace *Vibrio fischeri* je udržována uvnitř speciálních párových vakovitých světelných orgánů v kryptách lemovaných epitelem – Obr. 1. Ke komunikaci se zevním prostředím dochází přes vnější póry. Každý den sepiola vyloučí většinu obsahu z krypt, včetně 90 – 95 % přítomné bakteriální populace

přes póry. Během následujících 4 – 6 hodin dochází ke zmnožení zbývajících symbiontů a obnově světelného orgánu do plně kolonizovaného stavu (Visick, Ruby, 2006).



Obr. 1: Sepioloidea owstoni - světelný orgán.

Po pitvě odhalený světelný orgán – žlutě ohraničený u dospělé sepioly. Dále jsou na snímku vidět oči – „e“ a chapadla – „j“ (převzato a upraveno z Nyholm a kol., 2009).

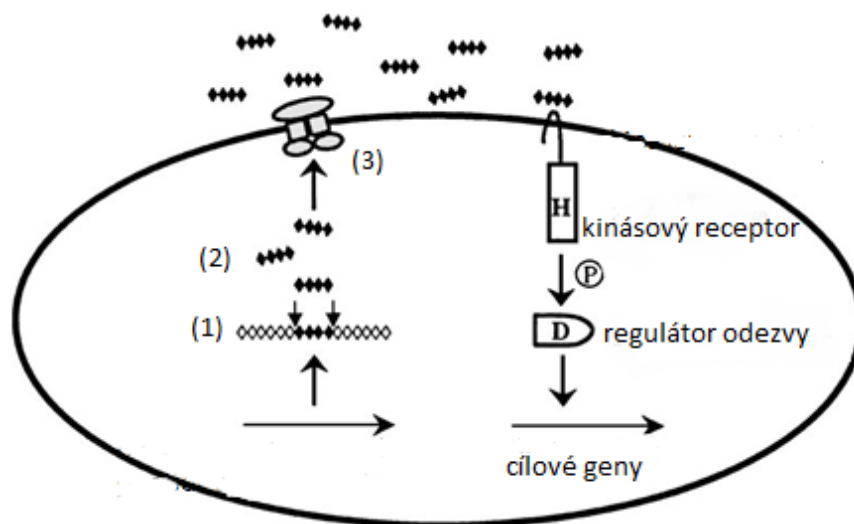
Naproti tomu mořská ryba trnonoš japonský (*Monocentris japonica*) využívá světla k přilákání partnera (Miller, Bassler, 2001). Pokud se však bakterie vyskytují volně v oceánu, klesá jejich densita populace a tento enzym exprimován není (Suga, 2003).

Regulační mechanismus QS se vyskytuje u grampozitivních i gramnegativních bakterií. Tyto dvě skupiny však produkují odlišné typy autoinduktorů.

1.2 Peptidy zprostředkovávající QS u grampozitivních bakterií

Grampozitivní bakterie využívají jako signální molekuly autoindukční peptidy (AIP). Tyto peptidy jsou strukturně různorodé, ale jejich společným znakem je malá velikost. AIP jsou syntetizovány ribozomy jako prekursorové peptidy. Vlivem posttranslačních úprav jsou aktivovány a stabilizovány. Sekrece signálních peptidů je umožněna přes ATP – Binding Cassette transporter označovaný jako ABC transportér. Grampozitivní bakterie využívají k detekci autoinduktorů kinásové detektory (Sturme a kol., 2002).

S rostoucí bakteriální populací stoupá hladina autoindukčních peptidů v okolí. Detektorem jsou dvousložkové kinasové receptory. Interakce mezi peptidovým ligandem a kinasovým receptorem iniciuje řadu fosforylačních reakcí, které vedou k fosforylaci regulátoru. Tento proces umožní navázání regulátoru na DNA a následnou transkripci genů, které jsou systémem QS řízeny – Obr. 2 (Miller, Bassler, 2001).



Obr. 2: Obecné schéma pro peptidy zprostředkovávající quorum sensing u grampozitivních bakterií.

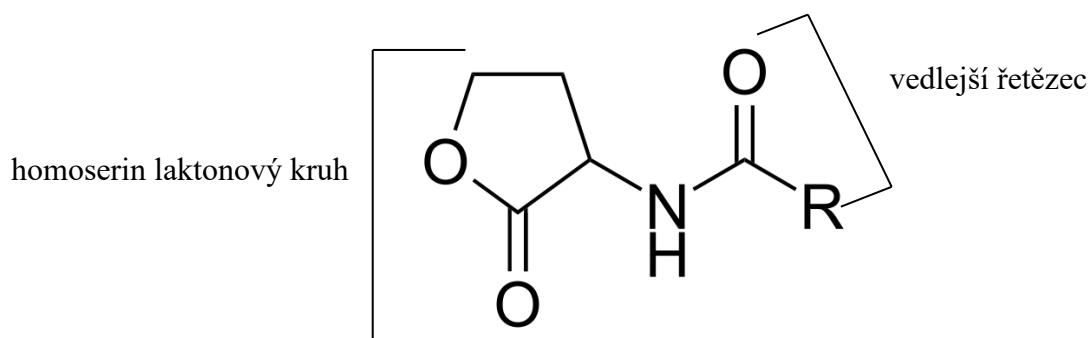
Prekursorové proteiny – 1 jsou rozštěpeny a vznikají z nich signální autoindukční peptidy – 2. Obecně jsou tyto peptidy transportovány ven z buňky přes ABC přenašeč – 3. Pokud extracelulární koncentrace AIP dosáhne minimální stimulační hladiny, zaznamená tuto skutečnost kinasový receptor. Poté následuje fosforylační/defosforylační kaskáda – „P“ (převzato a upraveno z Miller, Bassler, 2001).

Ve většině případů AIP vystupují jako komunikační molekuly a nemají žádnou další známou funkci. Výjimku tvoří lantibiotika, jako je nisin (*Lactobacillus lactis*) a subtilin (*Bacillus subtilis*), které mají vedle signalizační aktivity také aktivitu antimikrobiální (Sturme a kol., 2002).

1.3 Peptidy zprostředkovávající QS u gramnegativních bakterií

Funkci malých signálních molekul u gramnegativních bakterií plní sloučeniny typu acyl homoserin lakton (AHL), které jsou též nazývány autoinduktory – Obr. 3. Jejich společným znakem je přítomnost homoserin laktonového kruhu. Homoserin laktonový kruh je spojen s acylovým řetězcem pomocí amidové vazby. Délka vedlejšího řetězce se pohybuje kolem 4 – 16

uhlíků (Chbib, 2020). V rámci druhové specifčnosti bakterií se liší jednak zmiňovanou délkou, ale také stupněm substituce acylového řetězce (Suga, 2003).



Obr. 3: Strukturní vzorec acyl homoserin laktonu.

(převzato a upraveno z https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/12/N-Acyl_Homoserine_Lactone.svg).

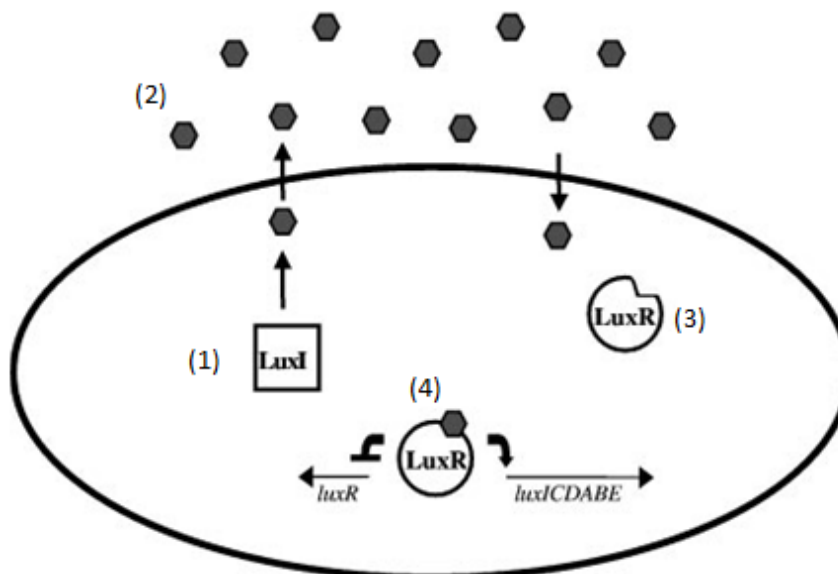
Molekuly AHL jsou syntetizovány z S-adenosylmethioninu. V rámci syntézy dochází k intramolekulárnímu zacyklení homocysteinového fragmentu s eliminací 5'-S-methyl-5'-thioadenosinu a současně probíhá acylace aminoskupiny (Chbib, 2020).

Mechanismy QS komunikující prostřednictvím AHL molekul patří obecně k nejlépe prostudovaným (Prescott, Decho, 2020).

1.3.1 Dráha QS u bakterie *Vibrio fischeri* – dráha LuxI-LuxR

V posledním desetiletí byl systém QS identifikován u více než 25 druhů gramnegativních bakterií. Ve všech případech zkoumaných bakterií, kromě *Vibrio harveyi* a *Myxococcus xanthus*, bylo zjištěno, že se dráha systému QS podobá dráze bioluminiscenční mořské bakterie *Vibrio fischeri* – Obr. 4 (Miller, Bassler, 2001).

Dráha bakterie *Vibrio fischeri* zahrnuje dva regulační proteiny – LuxI a LuxR. Jejich modifikace jsou přítomny u různých druhů gramnegativních bakterií. LuxI proteiny jsou zodpovědné za syntézu signálních molekul AHL, v tomto konkrétním případě se jedná o molekuly N-3-oxohexanoyl-homoserin lakton. Signální molekuly jsou volně prostupné přes cytoplazmatickou membránu, takže k jejich uvolnění z buňky není třeba přenašečů. LuxR vystupuje jako cytoplasmatický receptor pro navázání autoinduktorů. Jeho další funkcí je aktivace transkripce operonu luxICDABE, jejímž konečným výsledkem je emise světla (Miller, Bassler, 2001).



Obr. 4: Schéma systému quorum sensing u bakterie *Vibrio fischeri*.

U systému quorum sensing bakterie *Vibrio fischeri*, který zajišťuje emisi světla, existuje 5 strukturálních genů pro luciferázu (*luxICDABE*) a 2 geny regulační (*luxI*, *luxR*). Protein LuxI – 1 je zodpovědný za syntézu signálních molekul – 2. Při stoupající hustotě buněčné populace se zvyšuje koncentrace autoinduktorů v buňce i mimo ni. Při dosažení kritické hodnoty naváže receptor LuxR – 3 signální molekulu. Tento komplex – 4 se dále naváže na promotor *luxICDABE* a tím aktivuje transkripci tohoto operonu. Tato skutečnost má vliv jednak na zvýšení syntézy autoinduktorů a také na zvýšení emise světla (převzato a upraveno z Miller, Bassler, 2001).

1.4 Cílené ovlivnění QS systémů

Intenzivní používání antimikrobiálních látek umožnilo vznik multirezistentních a extensivně rezistentních kmenů. Proto je kladen důraz na nutnost kontroly šíření těchto bakterií a na hledání nových způsobů léčby onemocnění způsobených těmito kmeny (Saeki a kol., 2020). V roce 2017 zveřejnila Světová zdravotnická organizace seznam bakterií, pro které je nezbytně nutný vývoj nových antimikrobiálních látek. Mezi kmeny s nejvyšší prioritou patří *A. baumannii* rezistentní ke karbapenemům, *P. aeruginosa* rezistentní ke karbapenemům a enterobakterie rezistentní ke karbapenemům a produkující široké spektrum betalaktamáz (Willyard, 2017).

Předmětem zkoumání je možnost ovlivnění chemické komunikace mezi bakteriemi. Faktory virulence jsou řízeny systémem QS. Cílem této terapie je „odzbrojení“ patogenních bakterií a zabránění napadení hostitele. QS inhibitory (QSI) ovlivňují virulenci bakterií, ale nikoliv jejich životaschopnost, a proto nedochází ke vzniku selekčního tlaku a rozvoji rezistence (Saeki a kol. 2020).

Teoretických možností ovlivnění QS systému bakterií s cílem potlačit jejich virulenci bylo popsáno několik:

- inhibice syntézy AHL
- degradace signální molekuly
- blokáda R proteinu (Saeki a kol., 2020).

Předmětem vědeckých studií byla řada rostlinných extraktů a olejů. Nedávné výzkumy ukazují, že rostlinné výtažky mohou na QS systém působit jako inhibitory. Avšak přírodní zdroje neobsahují biologicky potřebné množství QSI, které by bylo dostačující pro terapeutické účely. Současné výzkumy jsou proto soustředěny na úplnou syntézu (Truchado a kol., 2015).

2 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1 Taxonomické zařazení *Pseudomonas aeruginosa*

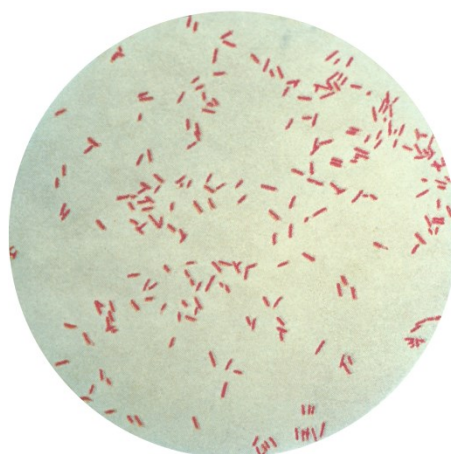
Říše:	<i>Eubacteria</i>
Kmen:	<i>Proteobacteria</i>
Třída:	<i>Gammaproteobacteria</i>
Řád:	<i>Pseudomonadales</i>
Čeleď:	<i>Pseudomonadaceae</i>
Rod:	<i>Pseudomonas</i>

Rod *Pseudomonas* kromě druhu *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) dále zahrnuje například druhy *P. alcaligenes*, *P. fluorescens* nebo *P. stutzeri* (The Universal Protein Resource).

Rod *Pseudomonas* patří z diagnostického hlediska do skupiny gramnegativních nefermentujících bakterií. Do této skupiny se dále řadí rody *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* a *Burkholderia* (Votava, 2010).

2.2 Morfologické znaky

Pseudomonas aeruginosa se řadí mezi gramnegativní nesporulující bakterie. Po obarvení dle Grama se proto ve světelném mikroskopu zobrazí jako červené rovné nebo lehce zahnuté tyčinky – Obr. 5. Tyčinky mohou dosahovat délky 1,5 – 5 μm a šířky 0,5 – 1 μm . U preparátů, které jsou zhotoveny ze starších kultur, můžeme však pozorovat tvar kokobacilů až koků, které mohou být uspořádány do dvojic nebo do krátkých řetězků (Votava, 2010; Mosio, 2012).



Obr. 5: *Pseudomonas aeruginosa* po obarvení dle Grama (Public Health Image Library).

Pseudomonas aeruginosa je schopna pohybu, neboť obsahuje jeden či více polárně umístěných bičků. Povrch této bakterie je kryt slizovou vrstvou, která připomíná pouzdro (Votava, 2010; Mosio, 2012).

2.3 Kultivace

Jedná se o aerobní druh bakterie, který není náročný na kultivační podmínky. Rozmezí teploty pro růst této bakterie je velmi široké a zahrnuje teploty od 4°C po 42°C. Optimální teplotní rozmezí pro růst této bakterie je však 25°C – 37°C. Bakterie rodu *Pseudomonas* se mohou vyskytovat v prostředí s pH nižším než 4,5 (Votava, 2010; Mosio, 2012).

Typickým rozpoznávacím znakem bakterie *P. aeruginosa* je charakteristický zápach připomínající vůni květin, přesněji jasmínu, který můžeme identifikovat u čerstvých kultur. U starších kultur se setkáváme s amoniakálním zápachem (Votava, 2010; Mosio, 2012).

Ke kultivaci této bakterie se používají běžná kultivační média, jako je například krevní agar nebo Endova půda.

2.3.1 Růst *Pseudomonas aeruginosa* na specifických agarech

- Krevní agar

Krevní agar je řazen mezi základní půdy využívané v lékařské bakteriologii. Na krevním agaru je možné identifikovat hemolytické vlastnosti daného bakteriálního kmene a často

ho podle nich klasifikovat. Právě proto je někdy na krevní agar nahlíženo jako na půdu diagnostickou (Votava, 2005).

Příprava krevního agaru spočívá v přidání 5 – 10% sterilní ovčí krve zbavené fibrinu k agarovému základu, který má teplotu 45 – 50 °C. Směs se vylévá do Petriho misek (Votava, 2005).

Na krevním agaru vyrůstá *P. aeruginosa* v nepravidelných perleťově lesklých koloniích obklopených zónou úplné hemolýzy (Mosio, 2012).

- Endův agar

Endova půda patří mezi skupinu selektivně diagnostických půd pro gramnegativní bakterie. Selektivitu pro gramnegativní bakterie zajišťuje bazický fuchsin, který půda obsahuje. Jeho úlohou je inhibice růstu grampozitivních bakterií. Endův agar se využívá k prokázání mikroorganismů štěpících laktosu. Tuto schopnost indikuje bazický fuchsin odbarvený siřičitanem sodným. Pozitivita schopnosti štěpit laktosu se projeví růstem tmavě rudých kolonií. Půda v okolí kolonií je taktéž zbarvena (Votava, 2005).

P. aeruginosa vyrůstá na Endově agaru v podobě drobných růžových kolonií (Mosio, 2012).

- McConkey agar

Využití a princip McConkey agaru je obdobné jako u Endova agaru. I tato půda je selektivní pro gramnegativní mikroorganismy. Zde selektivitu zajišťuje přítomnost žlučových solí nebo přítomnost krystalové violeti. V oblasti diagnostiky se i zde rozlišují mikroby štěpící a neštěpící laktosu. Indikátorem je neutrální červeň. Kmeny bakterií štěpící laktosu vyrůstají v růžových až červených koloniích se zbarvenou půdou v jejich okolí. Bakteriální kmeny neštěpící laktosu mají podobu bezbarvých kolonií (Votava, 2005).

- Mueller-Hinton agar

Primární využití tohoto agaru je stanovení citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky pomocí difusního testu. Difusní test se provádí pomocí antibiotických disků (Votava, 2005).

Mueller-Hinton agar poskytuje podmínky k pozorování pigmentů, které bakterie *Pseudomonas aeruginosa* tvoří. Jedná se o žlutozelený fluorescein a modrozelený pigment pyocyanin (Mosio, 2012).

Pro zvýšení syntézy pigmentů lze použít speciální kultivační média. Konkrétně se využívají *Pseudomonas* agar P pro pyocyanin nebo *Pseudomonas* agar F pro fluorescein (Stock, 1987).

- *Pseudomonas* agar P

Tento druh agaru slouží k odlišení bakterie *Pseudomonas aeruginosa* od jiných druhů pseudomonád. Jedná se o typ diagnostického média, které zvyšuje syntézu pigmentu pyocyaninu. Podle svého objevitele je často označován jako Kingovo médium A. Složení tohoto agaru je následující: pepton z želatiny, chlorid hořečnatý, síran draselný, glycerol a kanten. Želatinový pepton poskytuje základní dusíkaté živiny, uhlík, vitamíny a síru. Zároveň však obsahuje nízkou hladinu fosforu. Fosfor by způsobil inhibici syntézy pyocyaninu. Glycerol tvoří další zdroj uhlíku. Sloučeniny síranu draselného a chloridu hořečnatého aktivují syntézu pigmentu (Gill, Stock, 1987; King, 1954).

Kolonie produkující tento pigment jsou obklopené modrozeleně zbarvenou zónou (Gill, Stock, 1987).

- *Pseudomonas* agar F

Tento druh agaru zvyšuje syntézu pigmentu fluoresceinu a inhibuje syntézu pigmentu pyocyaninu. Synonymem je pro něj Kingovo médium B. Tento agar se skládá z peptonu z kaseinu, peptonu z živočišné tkáně, síranu hořečnatého, hydrogenfosforečnanu draselného, glycerolu a kantenu. Funkce jednotlivých složek jsou obdobné jako u agaru předchozího. Peptony tvoří zdroj dusíkatých látek, uhlíku, vitamínů a síry. Glycerol je též zdrojem uhlíku. Hydrogenfosforečnan draselný zde vystupuje jako pufr. Aktivátorem syntézy pigmentu je síran hořečnatý (Lamichhane, Varvaro, 2013; King, 1954).

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* vytváří kolonie obklopené žlutou až žlutozelenou zónou, která pod UV světlem fluoreskuje (Gill, Stock, 1987).

2.4 Patogenita

Patogenitu můžeme definovat jako schopnost vyvolat onemocnění u hostitele. Jedná se o vlastnost mikroorganismů, která je druhově specifická (Votava, 2010).

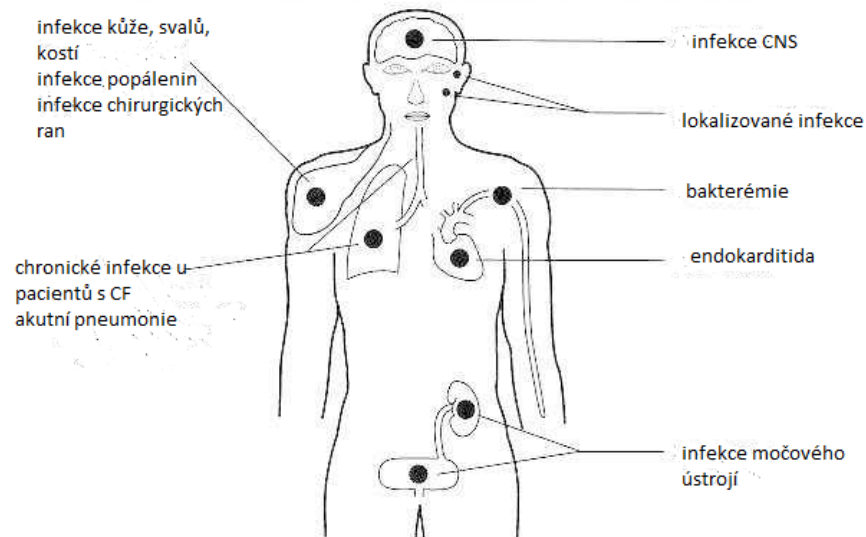
S pojmem patogenita úzce souvisí pojem virulence. Liší se tím, že je charakteristická pro daný mikrobiální kmen. Virulenci můžeme chápat jako schopnost daného kmene bakterií uplatnit druhovou patogenitu na určitého hostitele (Votava, 2010).

Mezi faktory virulence patří jednak struktury přítomné na povrchu bakteriální buňky, ale také látky extracelulární povahy (Votava, 2010).

Bakterie *P. aeruginosa* je součástí jak živé, tak neživé složky prostředí. Nachází se ve vodě, v půdě, můžeme ji izolovat z rostlin a živočichů, včetně lidí. Celý rod *Pseudomonas* se řadí mezi oportunní neboli podmíněné patogeny. Pro lidi s dobrým zdravotním stavem nepředstavuje tento rod bakterií ve většině případů žádné riziko. Pokud však dojde ke snížení obranyschopnosti hostitele, vznikají zdravotní komplikace (Gales a kol., 2001).

2.5 Onemocnění způsobená *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je primárně nozokomiálním patogenem. Způsobuje tedy onemocnění, která vznikají v přímé návaznosti na pobyt pacienta v nemocničním zařízení. Způsobuje pneumonie, dermatitidy, folikulitidy, otitidy, bakteriémie, infekce gastrointestinálního traktu, močových cest, infekce dýchacích cest u pacientů s cystickou fibrózou, infekce kostí, kloubů a další, zejména u pacientů s popáleninami a se sníženou funkcí imunitního systému, jako jsou například pacienti s rakovinou nebo AIDS (Azam, Khan, 2019). Možné oblasti vzniku infekce znázorňuje Obr. 6.



Obr. 6: Místa infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa* (převzato a upraveno z Iglewski, 1996).

2.5.1 Infekce dýchacích cest u nemocných s cystickou fibrózou

Cystická fibróza patří mezi autozomálně recesivní genetické poruchy. Jedná se o nevléčitelnou chorobu. Podstatou tohoto onemocnění je mutace cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genu (CFTR gen). Tento gen je umístěn na sedmém chromosomu (7q31,2). Jeho funkcí je kódování proteinu nesoucího stejný název jako gen. Příčinou cystické fibrózy je porucha transportu chloridových iontů apikální membránou buněk chloridovým kanálem, který je regulovaný pomocí cAMP – cyklický adenosinmonofosfát (Prickett, Jain, 2015).

Dosud existuje více než 1900 různých mutací CFTR o nichž je známo, že vedou ke vzniku cystické fibrózy. Naprostá většina případů je spojena s recesivní deleční mutací fenylalaninu v pozici delta 508. Obecně jsou mutace CFTR řazeny do pěti tříd podle druhu strukturální nebo funkční poruchy syntézy proteinu (Cant, Pollock, Ford, 2014).

- třída 1 – chybějící syntéza proteinu – nepřítomnost proteinu CFTR na apikální membráně buněk
- třída 2 – porucha nitrobuněčného transportu a zpracování proteinu – nepřítomnost proteinu CFTR na apikální membráně
- třída 3 – porucha aktivace – protein CFTR přítomný na apikální membráně buněk, nefunkční jako chloridový kanál

- třída 4 – snížená vodivost chloridového kanálu – protein CFTR přítomný na apikální membráně buněk, snížená funkce chloridového kanálu
- třída 5 – snížená syntéza proteinu – nižší množství plně funkčního proteinu CFTR (Cant, Pollock, Ford, 2014).

Typickým projevem tohoto onemocnění je zvýšená koncentrace chloridů v potu pacientů. Tato skutečnost se využívá v diagnostice. Koncentrace je zvýšená třikrát až pětkrát oproti fyziologické hodnotě (Rowntree, Harris, 2003). Hodnoty fyziologického rozmezí koncentrace chloridů v potu se pohybují mezi 10 – 30 mmol/l. Hodnoty v oblasti 30 – 60 mmol/l jsou označovány jako hraniční. Při výsledku nad 60 mmol/l je test označen jako pozitivní (Jakubec, 2006).

Místa primárního postižení jsou epitelové buňky nacházející se v dýchacích cestách, střevě, slinivce břišní, žlučníku a v potních žlázách. Hlavní příčinou úmrtnosti postižených pacientů je nadměrná tvorba hlenu a jeho nedostatečné odstraňování ze sliznic, což vede ke vzniku obstrukční plicní poruchy. Druhým faktorem úmrtnosti je vznik chronické bakteriální infekce vedoucí k respiračnímu selhání. U naprosté většiny nemocných také dochází k selhávání produkce enzymů v pankreatu při pankreatické nedostatečnosti (Rowntree, Harris, 2003).

U mladších pacientů jsou nejčastěji izolovanými patogeny druhy bakterií *Haemophilus influenzae* a *Staphylococcus aureus*. Ve vyšším věku je většina pacientů kolonizována nefermentujícími gramnegativními bakteriemi, zejména *Pseudomonas aeruginosa*. Jedná se o nejčastější patogen izolovaný ze sputa pacientů trpících cystickou fibrózou nad věkovou hranicí pěti let (Taccetti a kol., 2013).

Dalšími druhy nefermentujících bakterií způsobujících infekční komplikace jsou *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* a *Achromobacter xylosoxidans* (Taccetti a kol., 2013).

2.5.2 Ventilátorové pneumonie

Jako ventilátorové pneumonie (VP) jsou označovány pneumonie, které se objevují u pacientů, kteří jsou napojeni na umělou plicní ventilaci, a před tímto stavem nebyla žádná infekce přítomna. VP představují jeden z nejčastěji se vyskytujících druhů nozokomiálních infekcí na jednotkách intenzivní péče (JIP) v Evropě. Zároveň jsou hlavní nozokomiální příčinou úmrtnosti pacientů na JIP (Yarham, Young, 2008).

Během intubace jsou vyřazeny z funkce nespecifické mechanismy obranyschopnosti postiženého. Neúčinné nebo eliminované jsou například hrtanová příklopka, reflex kašle, řasnatý epitel nebo hlen horních cest dýchacích (Pieracci, Barie, 2007).

2.5.3 Infekční komplikace popálenin

Kůže je primární mechanickou bariérou v obranyschopnosti člověka před vniknutím mikroorganismů a dalších částic z vnějšího prostředí do lidského těla. Vedle toho hraje důležitou roli při zachování homeostázy tekutin a ve schopnosti termoregulace. Popáleniny poškodí kůži, která funkci bariéry ztrácí a zvyšuje se riziko infekce (Manning, 2018).

Neléčená infekce může vést k rozvoji sepse. Mezi rizikové faktory vzniku sepse patří věk, stupeň popálenin, přidružené onemocnění, snížená funkce imunitního systému (Manning, 2018).

2.5.4 Katéetrové infekce

Metoda zavádění cévních neboli intravaskulárních a močových katétrů se stala nepostradatelnou součástí ošetrovatelských postupů moderní lékařské péče. Aplikace katétrů je sama o sobě spjata s rizikem možného iatrogenního poškození pacienta. Dalším rizikem je vznik nozokomiálních infekcí (Trautner, Darouiche, 2004).

Katéetrové infekce jsou spojeny se schopností mikroorganismů tvořit biofilm (Skar, Snowden, 2018). Vznik biofilmu na katéetrových pomůckách je v první řadě závislý na přítomnosti povlaku nebo vrstvy umožňující výstavbu samotného biofilmu. Povaha původního povlaku je závislá na tekutině, která katétr omývá. V případě cévních katétru tvoří základ povlaku fibrin a fibronektin, zatímco močové katétry jsou na povrchu pokryty vrstvou proteinů, elektrolytů a molekul různých organických látek přítomných v moči pacientů. Dalšími faktory, které umožňují přichycení bakteriálních populací na povrchu katétru a následný rozvoj biofilmu, jsou hydrofobní a elektrostatické síly, povrchové struktury bakteriálních buněk, zahrnující pili nebo bičíky a fyzikální vlastnosti tekutého prostředí v okolí (Trautner, Darouiche, 2004).

- Cévní katétry

Infekce (lokální i systémové) spojené s používáním intravaskulárních katétrů patří mezi nejčastější infekce získané v nemocničním prostředí. Tato skupina zahrnuje širokou škálu zdravotních komplikací. Menší riziko přináší zavádění periferních katétrů a následný vznik

infekce. Naopak velkým problémem jsou infekce vzniklé v důsledku zavedení centrálních katétrů. Tento stav může vést k rozvoji septického šoku, vzniku endokarditidy nebo hnisavé flebitidy (Rodríguez a kol., 2002).

- Močové katétrů

Zavedení katétru do močových cest může vést k poškození slizniční vrstvy, která cesty vystýlá. Dochází k narušení přirozené ochranné bariéry, což umožní bakteriální kolonizaci. Dalšími obrannými mechanismy, které jsou při katetrizaci eliminovány, jsou délka močové trubice a průtok moči, které za fyziologických podmínek brání vniknutí patogenu do močového měchýře (Mittal a kol., 2009).

Mezi organismy, které jsou nejčastěji zodpovědné za vznik infekce spojené s katetrizací močového systému, patří *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a *Streptococcus faecalis* (Mittal a kol., 2009). Tyto organismy pocházejí jednak z přirozené mikroflóry tlustého střeva pacienta a jednak z rukou zdravotního personálu (Trautner, Darouiche, 2004).

3 Quorum sensing systém u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* disponuje vedle dalších druhů gramnegativních bakterií schopností tvořit autoindukční molekuly systému QS. Tuto schopnost mají dále například bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Legionella pneumophila* nebo například již zmiňované *Vibrio fischeri* (Miller, Bassler, 2001).

Vzhledem ke skutečnosti, že bakterie *Pseudomonas aeruginosa* vystupuje jako významný lidský patogen, stal se tento bakteriální druh předmětem intenzivního zkoumání a je jedním z modelových organismů výzkumu QS (Lee, Zhang, 2015).

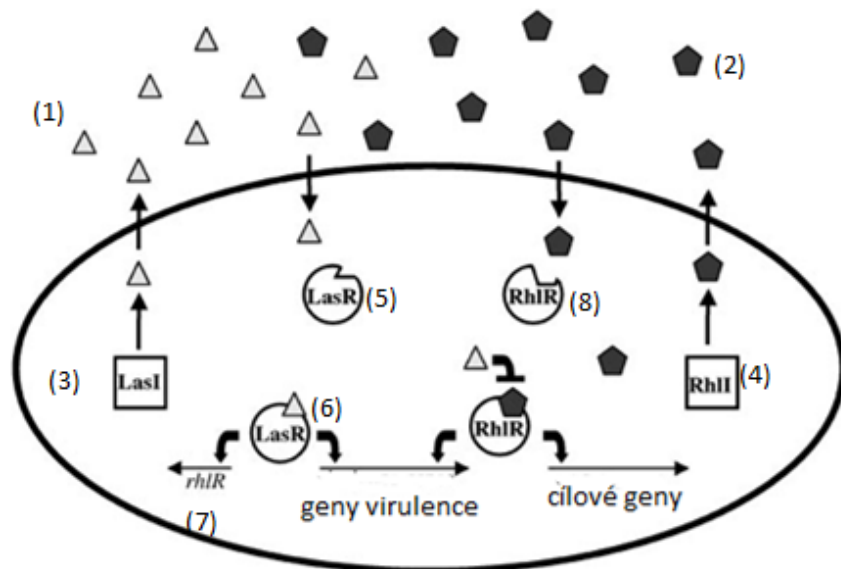
Systém QS u tohoto druhu bakterií je organizován v hierarchickém uspořádání a sestává se z nejméně čtyř navzájem propojených signálních drah. Konkrétně se jedná o systémy las, rhl, pseudomonádový chinolinový signál (PQS) a nedávno objevený integrovaný quorum sensing (IQS). Cílem celého QS mechanismu je tvorba genů virulence a produkce biofilmu (Lee, Zhang, 2015).

3.1 Mechanismus dráhy – LasI/LasR-RhlI/RhlR systém virulence

Dráha LasI/LasR-RhlI/RhlR tvoří pomyslné jádro celého QS systému u bakterie *P. aeruginosa* (Williams, Cámara, 2009). Písmena „I“ v názvu značí syntázu a písmena „R“ označují transkripční regulátor. Mechanismus fungování této signální dráhy vychází z vědeckých studií založených na prototypu luxI-luxR systému u bakterie *Vibrio fischeri* (Lee, Zhang, 2015).

Chemická podstata signálních molekul v obou těchto drahách je základní skelet homoserin laktonového kruhu (Schuster, Greenberg, 2006). V systému LasI/LasR jako autoinduktory vystupují molekuly 3-oxo-dodekanoyl-homoserin laktonu (3-oxo-C12-AHL). V systému RhlI/RhlR tuto funkci plní molekuly butanoyl-homoserin laktonu (C4-AHL). Oba tyto komplexy aktivují expresi genů, jejichž cílem je tvorba a aktivace faktorů virulence a dalších proteinů potřebných k přežití v lidském hostiteli (Suga, 2003).

Fungování systému QS bakterie *P. aeruginosa* je názorně zobrazeno na následujícím schématu – Obr. 7.



Obr. 7: Schéma quorum sensing systému u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Dráha LasI/LasR-RhlI/RhlR systému quorum sensing bakterie *P. aeruginosa* využívá dvou různých druhů autoinduktorů – 1,2. Protein LasI – 3 tvoří 3-oxo-C12-AHL – 1 a protein RhlI – 4 syntetizuje C4-AHL – 2. Při překročení prahové koncentrace signálních molekul v okolí bakterie se autoinduktor naváže na receptor LasR – 5. Komplex receptor LasR-autoinduktor – 6 se váže na promotory cílových genů virulence. Zároveň dochází k zahájení transkripce genu *rhlR* – 7 potřebného pro funkčnost druhé dráhy QS. Receptor RhlR – 8 váže příslušný druh signální molekuly – 2. Tím dochází k aktivaci transkripce daných genů (převzato a upraveno z Miller, Bassler, 2001).

Vysoká hustota buněčné populace způsobí vyšší koncentraci autoinduktorů v prostředí. Signální molekuly LasI se v buňce naváží na receptor LasR. Tento vzniklý komplex se naváže na promotory cílových genů a tím aktivují jejich expresi. Cílové geny jsou zodpovědné za tvorbu virulentních faktorů způsobujících destrukci hostitelské tkáně během počáteční fáze infekce. Konkrétně se jedná o následující virulentní faktory:

- elastáza – gen *lasB*
- proteáza – gen *lasA*
- exotoxin A – gen *toxA*
- alkalická fosfatáza – gen *aprA* (Miller, Bassler, 2001).

Vazba autoinduktor – receptor způsobí, kromě již zmíněného, další sekreci LasI, jedná se o pozitivní zpětnou vazbu (Miller, Bassler, 2001).

Další funkcí tohoto komplexu je aktivace druhého QS systému, a to konkrétně zahájením exprese genu *rhlR*, který umožní tvorbu RhlR receptoru. Tento receptor váže signální molekuly

RhII analogicky jako první systém. Takto vzniklý komplex aktivuje jednak expresi genů, které jsou pod kontrolou prvního systému (lasB a aprA), ale také aktivuje sekundárně cílené geny:

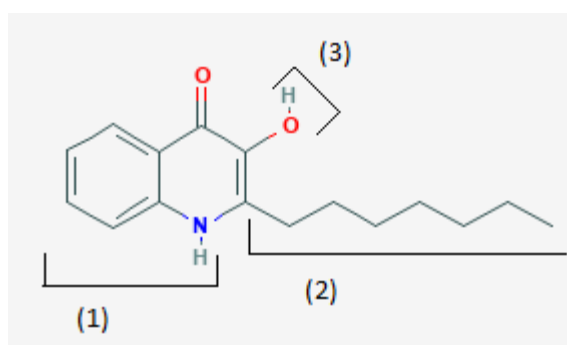
- sigma faktor – gen rpoS
- rhamnosyltransferáza – gen rhlAB
- pyocyanin – gen phzABCDEFG, phzH, phzM, phzS
- lectin – gen lecA.

Druhým kontrolním mechanismem, že se tyto dvě kaskády spustí postupně a v příslušném pořadí, je skutečnost, že signální molekula LasI zabraňuje vazbě signální molekuly RhII na jí příbuzný receptor (Miller, Bassler, 2001).

Systém LasI/LasR je považován za přirozený QS systém u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Zatímco u systému RhII/RhlR se předpokládá, že byl získán později v průběhu vývoje *Pseudomonas aeruginosa* horizontálním genovým přenosem a tím přispěl k vytvoření nových vlastností virulence (Schuster, Greenberg, 2006).

3.2 Systém PQS – pseudomonádový chinolonový signál

Třetí drahou, která se účastní QS mechanismu, je dráha s názvem pseudomonádový chinolonový signál. Roli signální molekuly u tohoto systému přebírá sloučenina 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon (Lee, Zhang, 2014). Strukturální rozložení této molekuly je zobrazeno a popsáno na Obr. 8.



Obr. 8: Strukturální vzorec signální molekuly pro pseudomonádový chinolonový signál.

Tato signální molekula se skládá z chinolon-4-onu – 1. Na tento základní skelet je v poloze 2 napojen heptylový substituent – 2 a v poloze 3 hydroxylová skupina – 3 (převzato a upraveno z Chemical Entities of Biological Interest).

Tyto signální molekuly se váží na svůj receptor PqsR a tento komplex se váže na promotory genů (Hodgkinson a kol., 2016).

Tento systém se společně s předcházejícími dvěma dráhami podílí na transkripční kontrole několika genů pro tvorbu složek virulence. Jedná se konkrétně o složky lectin A, pyocyanin, elastáza a rhamnolipidy (García-Reyes a kol., 2020).

Signální molekuly tohoto systému jsou však spojeny i s dalšími funkcemi, které nemají souvislost s PqsR receptorem. Jedná se například o regulaci efluxní pumpy nebo syntézu pyoverdinu (Hodgkinson a kol., 2016).

Avšak i přes velké úsilí ve výzkumu PQS jak in vitro, tak in vivo, zůstává jeho přesná role ve fungování mechanismu QS objasněna jen velmi málo (Lin a kol., 2018).

3.3 Systém IQS – integrovaný quorum sensing

V nedávné době byl objeven čtvrtý mezibuněčný komunikační kanál. Podílí se na koordinaci sítě QS při působení stresových podnětů z prostředí na bakteriální buňku (Lee a kol., 2013). Signální molekuly jsou 2-2-hydroxyfenyl-thiazol-4-karbaldehydy. Pokud je tato dráha narušena, sníží se také syntéza PQS a AHL signálů a tím klesá exprese cílových genů faktorů virulence. Zejména produkce pyocyaninu, rhamnolipidů a elastázy (Lee a kol., 2015). Při vyčerpání fosfátů je tato dráha schopna částečně převzít řídicí funkci QS místo LasI/LasR dráhy (Lee a kol., 2013).

3.4 Vybrané faktory virulence

Jak již bylo zmíněno v kapitole výše, termín virulence označuje schopnost daného bakteriálního kmene uplatnit druhovou patogenitu na určitý hostitelský organismus (Votava, 2010).

3.4.1 Biofilm

Biofilm představuje organizované společenství bakterií, které jsou přichyceny k nějakému povrchu (Skar, Snowden, 2018). Bakterie jsou obklopeny extracelulární polysacharidovou maticí, která tvoří základní stavební strukturu pro biofilm (Trautner, Darouiche, 2004). Matrice je složena z látek, které produkují samy bakterie. Význam matrice spočívá ve tvorbě rezistence proti antimikrobiálním látkám a chrání mikrobiální společenství před působením obranných mechanismů hostitele. Všechny gramnegativní bakterie disponují touto schopností (Skar, Snowden, 2018).

Matrice je složena z extracelulárních polymerních látek, které obsahují především polysacharidy, extracelulární DNA a polypeptidy. Tyto látky tvoří vysoce hydratovanou polární směs, která usnadňuje bakteriím přichycení k povrchu a jejich následné pomnožení (Rasamirakava a kol., 2015).

P. aeruginosa produkuje nejméně tři polysacharidy, které ovlivňují stabilitu biofilmového uspořádání. Lineární nerozvětvený polymer alginát přispívá ke strukturní opoře a ochraně biofilmu. Dále také přispívá k retenci vody a živin ve společenství. Extracelulární polysacharidy Pel a Psl slouží jako základní stavební kameny pro výstavbu samotného biofilmu a uplatňují se především v raných fázích tvorby biofilmu. Extracelulární DNA se uplatňuje v počáteční fázi rozvoje biofilmu. Slouží k propojení mezi buňkami a ve stavu hladovění bakterií poskytuje zdroj živin (Rasamirakava a kol., 2015).

Kromě výše zmíněných látek se na vzniku a rozvoji biofilmu podílejí také struktury vázané na bakteriální buňku. Přítomnost organel pohybu - bičíků, pil a fimbrií je důležitá pro adhezi bakterií k danému povrchu. Mimo to se uplatňují i při formování mikrokolonií (Trautner, Darouiche, 2004).

Cyklus formování biofilmu lze rozdělit do pěti fází:

- reverzibilní adheze planktonických bakterií na vhodný povrch
- nevratné navázání bakterií, tvorba mikrokolonií, vznik jednovrstevného biofilmu
- růst a dělení buněk, migrace za účelem vzniku vícevrstevného společenství
- produkce extracelulární matrix
- zrání biofilmu, tvorba trojrozměrného uspořádání (Skar, Snowden, 2018).

Trojrozměrná síť bakteriálního společenství dále roste. Část bakterií přechází zpět do planktonického stavu a následně se rozptýlí ze vzniklé struktury a vstupují do okolí, kde kolonizují další povrchy (Skar, Snowden, 2018).

Schopnost bakterie *P. aeruginosa* tvořit biofilm v různých prostředích, činí léčbu antibiotiky neefektivní a tím podporuje rozvoj chronických infekčních onemocnění. Možnosti, kterými lze ovlivnit patogenní bakterie na úrovni tvorby biofilmu, zahrnují:

- zamezení vazby mikroorganismu na povrch
- narušení vývoje biofilmu a/nebo ovlivnění struktury biofilmu za účelem zvýšení penetrace antimikrobiální látky
- ovlivnění zrání biofilmu a/nebo vyvolání jeho rozpadu (Rasamirakava a kol., 2015).

Na tvorbě a regulaci tvorby biofilmu se vedle systému QS dále také podílejí c-di-GMP a sRNA. Vysoké hladiny c-di-GMP podporují biosyntézu alginátu a polysacharidu Pel (Rasamirakava a kol., 2015).

3.4.2 Pyocyanin

Pyocyanin je modrozelený pigment produkovaný ve velkém množství kulturami *P. aeruginosa*. Ve sputu pacientů trpících cystickou fibrózou jsou nalézány vysoké koncentrace pyocyaninu. Klinicky významné hladiny jsou dále nalézány v ušních sekretech, ranách a v moči po chronické infekci. Jedná se o ve vodě rozpustný pigment. Díky nízké molekulové hmotnosti snadno přestupuje přes buněčné membrány (DeBritto a kol., 2020).

Z chemického hlediska se jedná o N-methyl-1-hydroxyfenazin. Syntéza vychází z aniontové formy kyseliny chorismové. Jednotlivé kroky syntézy jsou zprostředkovány pomocí dvou phzABCDEFG operonů a pomocí genů phzH, phzM, phzS, které modifikují výchozí látku do podoby tricyklické sloučeniny. Exprese těchto genů je regulována pomocí QS systému (Lau a kol., 2004).

Pyocyanin patří k hlavním virulentním faktorům tohoto patogenu. Uplatňuje se při rozvoji akutních i chronických infekcí. Hlavním faktorem přispívajícím k cytotoxicitě je oxidační stres. Pyocyanin se podílí na tvorbě reaktivních forem kyslíku – $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 , které následně poškozují řasinkové epiteliální buňky a ovlivňují homeostázu vápníku. Dále čerpá intracelulární hladiny cAMP a ATP a tím ovlivňuje funkci chloridových iontových kanálů. Pyocyanin potlačuje

proliferaci lymfocytů. Dále inaktivuje inhibitory proteáz. V neposlední řadě ovlivňuje hladinu IL 8 – interleukin 8 a RANTES – Regulated upon Activation, normal T cell expressed and secreted. Jedná se o druh chemokinů (Jayaseelan a kol., 2014, Lau a kol., 2004).

Kromě své hlavní funkce faktoru virulence také slouží jako signální molekula v procesech efluxu a v procesech získávání železa. Efluxní pumpy představují významný mechanismus rezistence bakterií k antibiotikům. Jejich funkcí je snížit hladinu antibiotika přítomného v cytoplazmě bakteriální buňky (Wu a kol., 2015). V procesech získávání železa hraje důležitou roli, protože pyocyanin je schopen redukovat a uvolňovat železo z transferinu. Železo je klíčovou komponentou pro růst *P. aeruginosa* (Jayaseelan a kol., 2014).

3.5 Rod *Candida*

Rod *Candida* taxonomicky náleží do říše hub, třídy deuteromycety (Neppelenbroek a kol., 2014). Druhy *Candida* jsou jednobuněčné houby, které se rozmnožují pučením. V závislosti na podmínkách prostředí jsou schopné růst ve dvou fázích, a to jako oválné blastospory nebo jako hyfy. Tato vlastnost se označuje jako dimorfismus. K pučení dochází ve stádiu blastospor. Při využití techniky barvení dle Grama jsou grampozitivní (Dowd, 2014).

Rod *Candida* zahrnuje 150 až 200 různých druhů (Spampinato, Leonardi, 2013). Z nejznámějších lze jmenovat *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* nebo například *Candida krusei* (Neppelenbroek a kol., 2014).

U zdravých jedinců jsou druhy *Candida* přirozenou součástí mikroflóry. Nicméně i tyto mikroorganismy, stejně jako bakterie rodu *Pseudomonas*, mohou vystupovat jako oportunní patogeny a původci infekcí u oslabených jedinců (Neppelenbroek a kol., 2014). Infekce způsobené rodem *Candida* mohou být povrchové, nejčastěji na kůži nebo sliznici nebo invazivní, které napadají krevní oběh, šíří se do vnitřních orgánů a představují život ohrožující stav (Spampinato, Leonardi, 2013). Obecně se tyto infekce označují jako kandidózy (Neppelenbroek a kol., 2014).

Podle záznamů z National Nosocomial Infections Surveillance System je druh *Candida* čtvrtým nejčastějším patogenem infekcí krevního řečiště. Míra úmrtnosti je až 45 %. Nejčastěji je způsobená neefektivním způsobem diagnostiky a nevhodnou antimykotickou léčbou (Spampinato, Leonardi, 2013).

3.5.1 *Candida albicans*

Kvasinka *Candida albicans* (*C. albicans*) je součástí přirozené mikroflóry gastrointestinálního traktu, urogenitálního ústrojí, dutiny ústní a spojivky (Spampinato, Leonardi, 2013). *C. albicans* je nejčastější oportunní patogen mezi druhy *Candida*. Patogenním se stává v případě, že dojde ke snížení funkce imunitního systému hostitele nebo ke změně obsazení bakteriální flóry. Léze, která tato kvasinka působí na kůži nebo sliznici, se objevují jako charakteristické bílé skvrny. Odtud pochází označení „albicans“ = bílý. Nejčastějšími místy infekce jsou dutina ústní a vagina. V některých případech může být vaginální kandidóza přenesena z matky na novorozence během porodu. U obézních pacientů se mohou infekce objevit v místě kožních záhybů. *C. albicans* také může způsobit systémové infekce (Dowd, 2014). Většina systémových infekcí je spojena se vznikem a vývojem biofilmu v implantovaných zdravotnických pomůckách nebo na povrchu těchto prostředků (Bernard a kol., 2019).

3.5.2 Systém quorum sensing *Candida albicans*

Kvasinka *C. albicans* byla prvním organismem z domény eukaryot, u které bylo zjištěno, že disponuje systémem QS (Alem a kol., 2006).

Úloha systému QS u kvasinky *C. albicans* je především umožnit reverzibilní morfologické změny. Jedná se o přechod mezi stádiem pučících blastospor (kvasinková forma) a stádiem vláknité růstové formy. Vláknité formy růstu jsou dvojího typu, a to v podobě pseudohyf nebo hyf (Polke a kol., 2017). Tato transformace může být indukována teplotou, pH, koncentrací živin nebo hustotou buněčné populace (Mear a kol., 2013).

Při systémových infekcích jsou izolovány obě stádia vývoje. Stádium blastospor usnadňuje šíření patogenních částic. Stádium vláknitých hyf nebo pseudohyf je důležité pro invazi a poškození tkání. Vlastnost přizpůsobování růstových stádií podmínkám prostředí představuje hlavní patogenní faktor této houby (Polke a kol., 2017).

Hlavní signální molekulou, která byla u tohoto druhu objevena a studována, je lipofilní seskviterpen farnesol – 3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodekatrien-1-ol (Alem a kol., 2006). Při vysoké buněčné hustotě stoupá extracelulární koncentrace farnesolu. Tato skutečnost brání strukturální přeměně kvasinkové formy na vláknitou. Farnesol nezastavuje růst hyf již existujících, ale brání

vzniku nových hyf. *C. albicans* se vyvíjí ve formě pučících blastospor (Hornby a kol., 2001). Stejný účinek má i kyselina farnesolová, která byla také identifikována jako signální molekula u některých druhů kvasinek (Chen a kol., 2004).

Druhou signální molekulou, která se systému QS účastní, je tyrosol – 2-(4-hydroxyphenyl) ethanol (Alem a kol., 2006). Tyrosol je tvořen a uvolňován během procesu růstu. Funkce tyrosolu je stimulace tvorby vláknité formy. Jeho účinek je tedy antagonistický k účinku, kterým působí předcházející signální molekula farnesol (Chen a kol., 2004).

C. albicans je také schopna tvořit biofilm, především na zdravotnických prostředcích jako jsou endotracheální trubice, cévní nebo močové katétry. Tyto biofilmy jsou místem pro možné interakce mezi zástupci odlišných domén (Méar a kol., 2013).

3.6 Vzájemné interakce *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*

P. aeruginosa a *C. albicans* se velmi často vyskytují ve vzájemné koexistenci ve směsných biofilmech. Oba tyto organismy disponují systémem QS. Signální molekuly jsou rozdílné chemické podstaty, přesto se zapojují do řady interakcí. Široká škála faktorů virulence těchto organismů je pod vlivem systému QS (Méar a kol., 2013).

Analýzy vzájemných interakcí *P. aeruginosa* a *C. albicans* prokázaly, že možností jakými se tyto organismy mohou navzájem ovlivňovat, je více. Například *P. aeruginosa* je schopna vytvořit biofilm na povrchu vláknitých hyf *C. albicans* (Cugini a kol., 2007). Bakterie napadá a ničí buňky houby působením sekretovaných faktorů, jako jsou fosfolipázy nebo fenaziny, za účelem získání živin pro svůj vývoj (Fourie a kol., 2019).

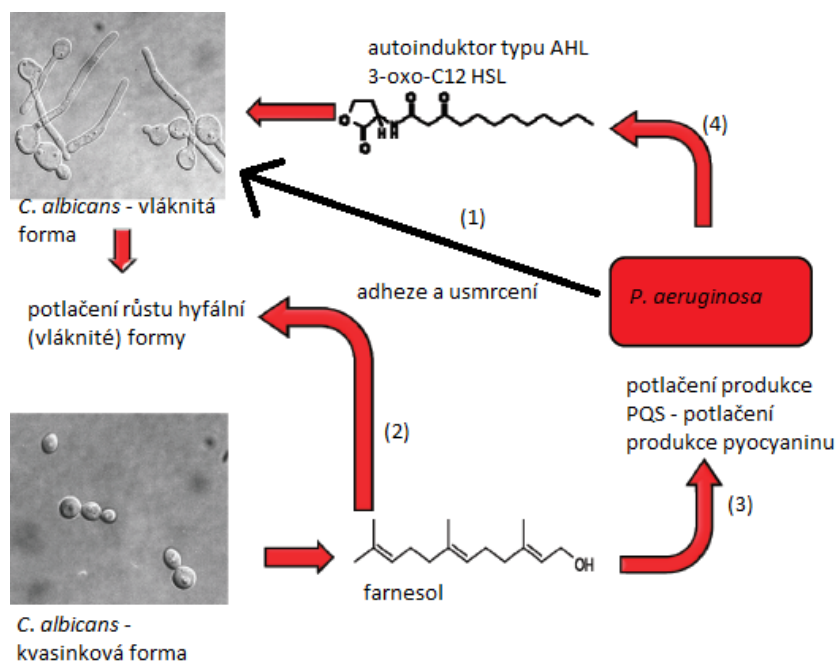
Pokud však dojde ke zvýšení koncentrace signálních molekul *P. aeruginosa*, kterými jsou molekuly AHL, dochází k inhibici přechodu růstu na vláknitou formu. Kvasinka zůstává ve formě blastospor a bakterie *Pseudomonas* nemůže kvasinku napadat (Méar a kol., 2013).

Další cestou, kterou dochází ke vzájemnému ovlivňování, je přes molekulu farnesolu. Farnesol, signální molekula QS dráhy *C. albicans*, která je zodpovědná za ukončení stádia hyf, inhibuje syntézu PQS *Pseudomonas* zastavením transkripce *pqs* operonu. Tím dojde ke snížení produkce pyocyaninu, významného virulentního faktoru. Růst bakterie však není ovlivněn (Méar a kol., 2013, Cugini a kol., 2007).

Pokud tedy nastane situace, při které jsou extracelulární koncentrace farnesolu a signálních molekul AHL ve vyšších koncentracích, je umožněna koexistence těchto dvou organismů.

Farnesol ukončuje filamentaci kandidy a zároveň z funkce vyřadí systém PQS a tím syntézu pyocyaninu jako toxické látky. Molekuly AHL blokují přeměnu kandidy z blastospor do hyf. Ve stádiu blastospor nemůže být kandida napadena (De Sordi, Mühlischlegel, 2009).

Interakce *P. aeruginosa* a *C. albicans* je graficky znázorněna a popsána na Obr. 9.



Obr. 9: Interakce *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans* (De Sordi, Mühlischlegel, 2009).

P. aeruginosa je schopna napadat a využívat živiny kvasinky pouze pokud je ve stádiu vláknitých hyf – 1. Produkce farnesolu způsobí ukončení filamentace – 2 a zároveň potlačuje syntézu pyocyaninu – 3. Autoinduktor 3-oxo-C12-AHL blokuje přeměnu kvasinkové formy na hyfální – 4 (převzato a upraveno z De Sordi, Mühlischlegel, 2009).

4 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala obecným popisem systému quorum sensing. První část této práce podává základní pohled na to, co to quorum sensing je a vysvětluje mechanismy fungování tohoto systému jednak u grampozitivních, ale především u gramnegativních bakterií, kam se řadí i bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Další část bakalářské práce je zaměřena konkrétně na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Cílem této bakalářské práce bylo definovat bakterii *Pseudomonas aeruginosa* a popsat mechanismus fungování jednotlivých drah quorum sensing systému této bakterie.

Protože systém quorum sensing není omezen jen na doménu bakterií, jsou v práci zmíněné možné interakce mezi bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a kvasinkou *Candida albicans*.

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* vystupuje jako významný podmíněný lidský patogen. Řada faktorů virulence vzniká v návaznosti na quorum sensing systém. Infekce způsobené bakterií *Pseudomonas aeruginosa* představují závažný problém. Léčbu těchto onemocnění značně komplikuje rezistence vůči široké škále antibiotik. Proto je ve výzkumu kladen důraz na pochopení mechanismů, kterými tento oportunní patogen působí, protože to je cesta k nalezení možné efektivnější terapie.

5 Seznam použité literatury

- ALDEA MANSILLA, Carmen, José MARTÍNEZ-ALARCÓN, Irene GRACIA AHUFINGER a María GUEMBE RAMÍREZ. Microbiological diagnosis of catheter-related infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [online]. Elsevier, 2019, **37**(10), 668-672 [cit. 2020-04-07].
- ALEM, Mohammed A. S., Mohammed D. Y. OTEEF, T. Hugh FLOWERS a L. Julia DOUGLAS. Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eukaryotic Cell* [online]. 2006, **5**(10), 1770-1779 [cit. 2020-04-27].
- AZAM, Mohd W. a Asad U. KHAN. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today* [online]. 2019, **24**(1), 350-359 [cit. 2020-03-13].
- BERNARD, C., M. GIRARDOT a C. IMBERT. *Candida albicans* interaction with Gram-positive bacteria within inter kingdom biofilms. *Journal de Mycologie Médicale* [online]. 2019, **30** [cit. 2020-04-27].
- CANT, Natasha, Naomi POLLOCK a Robert C. FORD. CFTR structure and cystic fibrosis [online]. 2014, **52**, 15-25 [cit. 2020-04-06].
- CUGINI, Carla, M. Worth CALFEE, John M. FARROW, Diana K. MORALES, Everett C. PESCI, Deborah A. HOGAN a B. GUERY. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*: More than an opportunistic criminal association? *Molecular Microbiology* [online]. 2007, **65**(4), 896-906 [cit. 2020-04-28].
- DEBRITTO, Savitha, Tanzeembanu D. GAJBAR, Praveen SATAPUTE, Lalitha SUNDARAM, Ramachandra Yarappa LAKSHMIKANTHA, Sudisha JOGAIHAH a Shin-ichi ITO. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2020-07-07].
- DE SORDI, Luisa a Fritz 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. 2020-04-28].

- DOWD, F.J. *Candida albicans* Infections. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Elsevier, 2014 [cit. 2020-04-27].
- FOURIE, Carla, M. Worth POHL, John M. FARROW, Diana K. MORALES, Everett C. PESCI, Deborah A. HOGAN a B. GUERY. Beyond Antagonism: The Interaction Between *Candida* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Fungi* [online]. 2019, **5**(2), 896-906 [cit. 2020-04-28].
- GALES, A. C., R. N. JONES, J. TURNIDGE, R. RENNIE a R. RAMPHAL. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates: Occurrence Rates, Antimicrobial Susceptibility Patterns, and Molecular Typing in the Global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2001, **32**(2), 146-155 [cit. 2020-03-13].
- GARCÍA-REYES, Selene, Gloria SOBERÓN-CHÁVEZ a Miguel COCOTL-YANEZ. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2020, **69**(1), 25-34 [cit. 2020-04-22].
- GILL, Vee J. a Frida STOCK. Medium for the Simultaneous Detection of Pyocyanin and Fluorescein Pigments of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 1987, **88**(1), 110-112 [cit. 2020-03-27].
- HODGKINSON, James T., Jeremy GROSS, Ysobel R. BAKER, David R. SPRING a M. WELCH. A new *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) binding partner: MexG. *Chemical Science* [online]. 2016, **7**(4), 2553-2562 [cit. 2020-04-22].
- HORNBY, Jacob M., et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(7), 2982-2992.
- CHBIB, Christiane. Impact of the structure-activity relationship of AHL analogues on quorum sensing in Gram-negative bacteria [online]. 2020, **28**(3) [cit. 2020-02-23].
- CHEMICAL ENTITIES OF BIOLOGICAL INTEREST. 2-HEPTYL-3-HYDROXY-4-QUINOLONE. ChEBI [online]. [cit. 22.4.2020]. Dostupné z www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:29472.
- CHEN, H., Fujita, M., FENG, Q., CLARDY, J., & FINK, G. R. Tyrosolis a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2004, **101**(14), 5048–5052.
- IGLEWSKI BH. *Pseudomonas*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 27.

- JAKUBEC, Petr. Cystická fibróza. Interní medicína pro praxi [online]. 2006, (5), 235-239 [cit. 2020-04-06].
- JAYASEELAN, Sheeba, Damotharan RAMASWAMY a Selvakumar DHARMARAJ. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **30**(4), 1159-1168 [cit. 2020-07-07].
- KING, E. O., Ward M., K., Raney D., E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin, *J. Lab. Clin. Med.*, 1954, **44**(2), s. 301-307.
- KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2008. Biologie pro gymnázia. ISBN 9788086960364.
- LAMICHHANE, J. R. a L. VARVARO. A new medium for the detection of fluorescent pigment production by pseudomonads. *Plant Pathology* [online]. 2013, **62**(3), 624-632 [cit. 2020-04-01].
- LAU, Gee W., Daniel J. HASSETT, Huimin RAN a Fansheng KONG. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2004, **10**(12), 599-606 [cit. 2020-07-07].
- LEE, Jasmine, Jien WU, Yinyue DENG, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology* [online]. 2013, **9**(5), 339-343 [cit. 2020-04-22].
- LEE, Jasmine a Lianhui ZHANG. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* [online]. 2015, **6**(1), 26-41 [cit. 2020-04-20].
- LIN, Jinshui, Juanli CHENG, Yao WANG a Xihui SHEN. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2018, **8** [cit. 2020-04-22].
- MANNING, Jennifer. Sepsis in the Burn Patient. *Critical Care Nursing Clinics of North America* [online]. 2018, **30**(3), 423-430 [cit. 2020-04-02].
- MÉAR, J.-B., E. KIPNIS, E. FAURE, R. DESSEIN, G. SCHURTZ, K. FAURE a B. GUERY. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association? *Médecine et Maladies Infectieuses* [online]. 2013, **43**(4), 146-151 [cit. 2020-04-28].
- MILLER, Melissa B. a Bonnie L. BASSLER. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2001, **55**(1), 165-199.

- MITTAL, Rahul, Sudhir AGGARWAL, Saroj SHARMA, Sanjay CHHIBBER a Kusum HARJAI. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *Journal of Infection and Public Health* [online]. 2009, **2**(3), 101-111 [cit. 2020-04-15].
- MOSIO, Petra. Atlas bakterií. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-467-3.
- N-ACYL HOMOSERINE LACTONE. WikimediaCommons [online]. [cit. 24.3.2020]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/12/N-Acyl_Homoserine_Lactone.svg.
- NEPPELENBROEK, KH, RS SEÓ, VM URBAN, S SILVA, LN DOVIGO, JH JORGE a NH CAMPANHA. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Diseases* [online]. 2014, **20**(4), 329-344 [cit. 2020-04-27].
- NYHOLM, Spencer V., Jennifer J. STEWART, Edward G. RUBY a Margaret J. MCFALL-NGAI. Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environmental Microbiology* [online]. 2009, **11**(2), 483-493 [cit. 2020-07-06].
- PIERACCI, Frederic M. a Philip S. BARIE. Strategies in the Prevention and Management of Ventilator-Associated Pneumonia. *The American Surgeon* [online]. 2007, **73**(5), 419-432 [cit. 2020-04-20].
- PECHANDOVÁ, K, H BUZKOVÁ, O SLANAŘ a F PERLÍK. Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, **14**(35), 196-201 [cit. 2020-07-17].
- POLKE, Melanie, et al. A functional link between hyphal maintenance and quorum sensing in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 2017, **103**(4). 595-617.
- PRESCOTT, Rebecca D. a Alan W. DECHO. Flexibility and Adaptability of Quorum Sensing in Nature. *Trends in Microbiology* [online]. 2020, **28**(6), 436-444 [cit. 2020-07-06].
- PRICKETT, Michelle; JAIN, Manu. Gene therapy in cystic fibrosis. In: *Translating Gene Therapy to the Clinic*. Academic Press, 2015, 247-260.
- PUBLIC HEALTH IMAGE LIBRARY. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. PHIL [online]. [cit. 25.5.2020]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2118>.

- RASAMIRAVAKA, Tsiry, Quentin LABTANI, Pierre DUEZ a Mondher 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, 1-17 [cit. 2020-07-08].
- READING, Nicola C. a Vanessa SPERANDIO. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2006, **254**(1), 1-11 [cit. 2019-12-15].
- RODRÍGUEZ-BAÑO, J., José MARTÍNEZ-ALARCÓN, Irene GRACIA AHUFINGER a María GUEMBE RAMÍREZ. Selection of empiric therapy in patients with catheter-related infections. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. Elsevier, 2018, **8**(5), 275-281 [cit. 2020-04-07].
- ROWNTREE, Rebecca K. a Ann HARRIS. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics* [online]. 2003, **67**(5), 471-485 [cit. 2020-03-20].
- RUTHERFORD, S. T. a B. L. BASSLER. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2**(11), 12427-12427 [cit. 2019-12-15].
- SAEKI, Erika Kushikawa, Renata Katsuko Takayama KOBAYASHI a Gerson NAKAZATO. Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2020, **142** [cit. 2020-07-06].
- SHUMAN, Emily K., Carol E. CHENOWETH, Saroj SHARMA, Sanjay CHHIBBER a Kusum HARJAI. Urinary Catheter-Associated Infections: A minireview. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 2018, **32**(4), 885-897 [cit. 2020-04-15].
- SCHUSTER, Martin a E. PETER GREENBERG. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2006, **296**(2-3), 73-81 [cit. 2020-04-20].
- SKAR, Gwenn L. a Jessica N. SNOWDEN. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Central Nervous System Catheter Infections. *The Microbiology of Central Nervous System Infections* [online]. 2018, 29-44 [cit. 2020-04-07].
- SPAMPINATO, Claudia a Darío LEONARDI. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents: Review Article. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* [online]. 2013 [cit. 2020-04-27].
- STURME, Mark H.J., Michiel KLEEREBEZEM, Jiro NAKAYAMA, Antoon D.L. AKKERMANS, Elaine E. VAUGHAN a Wilem M. DE VOS. Cell to cell

- communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2002, **81**(81), 233-243 [cit. 2019-12-20].
- SUGA, H. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2003, **7**(5), 586-591 [cit. 2019-12-19].
 - TACCETTI, G., S. CAMPANA, A.S. NERI, V. BONI a F. FESTINI. Antibiotic Therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Journal of Chemotherapy* [online]. 2013, **20**(2), 166-169 [cit. 2020-04-06].
 - THE UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE: Taxonomy [online]. [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/taxonomy/136841>
 - TRAUTNER, Barbara W. a Rabih O. DAROUICHE. Catheter-Associated Infections. *Archives of Internal Medicine* [online]. 2004, **164**(8) [cit. 2020-04-07].
 - TRUCHADO, Pilar, Mar LARROSA, Irene CASTRO-IBÁÑEZ a Ana ALLENDE. Plant food extracts and phytochemicals: Their role as Quorum Sensing Inhibitors. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2015, **43**(2), 189-204 [cit. 2020-07-06].
 - VISICK, Karen L. a Edward G. RUBY. *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2006, **9**(6), 632-638 [cit. 2020-07-06].
 - VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.
 - VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
 - WILLIAMS, Paul a Miguel CÁMARA. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2009, **12**(2), 182-191 [cit. 2020-04-21].
 - WILLYARD, Cassandra. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature* [online]. 2017, **543**(7643), [cit. 2020-07-06].
 - WU, Weihui, Yongxin JIN, Fang BAI a Shouguang JIN. *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology* [online]. 2015, s. 753-767 [cit. 2020-07-07].
 - YARHAM, Sarah a Peter YOUNG. Ventilator-associated pneumonia and new airway technologies. *Trauma* [online]. 2008, **10**(2), 71-83 [cit. 2020-04-20].