UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

# AMINOPEPTIDÁZY RODINY M28 V PATOGENNÍCH KVASINKÁCH RODU *CANDIDA*

ONDŘEJ MORÁVEK

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

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

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

| | |
|---|---|
| Jméno a příjmení: | **Ondřej Morávek** |
| Osobní číslo: | **C17193** |
| Studijní program: | **B3912 Speciální chemicko-biologické obory** |
| Studijní obor: | **Zdravotní laborant** |
| Téma práce: | **Aminopeptidázy rodiny M28 v patogenních kvasinkách rodu *Candida*** |
| Zadávající katedra: | **Katedra biologických a biochemických věd** |

## Zásady pro vypracování

1. Prostudujte a zpracujte literaturu pojednávající o metalopeptidázách. Zaměřte se zejména na peptidázy rodiny M28.

2. Prostudujte a zpracujte literaturu týkající se patogenních kvasinek rodu *Candida*. Zaměřte se na druhy *C. albicans* a *C. parapsilosis*.

3. Ke studiu tématiky použijte hlavně zahraniční odbornou literaturu a informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

4. V experimentální části bakalářské práce se pokuste zavést protokol pro přípravu aminopeptidáz Ape3p kvasinek *C. albicans* a *C. parapsilosis*.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.**
Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova

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 Kanďár, Ph.D.**
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

**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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutežností, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21. 7. 2020

Ondřej Morávek

**Poděkování:**

Rád bych tímto poděkoval své vedoucí bakalářské práce Mgr. Barboře Jankovičové, Ph.D. a konzultantce své bakalářské práce RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za zadání zajímavého tématu a vstřícný přístup. Dále bych chtěl poděkovat za možnost pracovat na experimentální části, která byla součástí této práce a já si tak mohl vyzkoušet i práci v laboratoři a děkuji také za poskytnuté materiály. V neposlední řadě bych jim ještě rád poděkoval za cenné rady, za strávený čas a za trpělivost, které mi po celou dobu věnovaly.

## ANOTACE:

Tato práce se věnuje vybraným metalopeptidázám rodiny M28 v patogenních kvasinkách rodu *Candida*. Práce je rozdělena do tří částí. V první části se zabývám patogenními kvasinkami a významem jejich vakuol. V druhé části se věnuji metalopeptidázám a jejich konkrétní rodině M28. Ve třetí části popisuji experimentální zavádění protokolu pro přípravu aminopeptidáz Ape3p kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*.



## KLÍČOVÁ SLOVA:

Patogenní kvasinky, vakuoly, *Candida*, metalopeptidázy, aminopeptidáza Y


## TITLE:

Aminopeptidases of family M28 in pathogenic yeasts of *Candida* genus


## ANNOTATION:

This Bachelor thesis deals with selected metallopeptidases of the M28 family in pathogenic yeasts of the genus *Candida*. The work is divided into three parts. In the first part I focus on pathogenic yeasts and the importance of their vacuoles. In the second part I deal with metallopeptidases and their specific family M28. In the third part I describe the experimental implementation of a protocol for the preparation of aminopeptidases Ape3p of the yeasts *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*.



## KEY WORDS:

Pathogenic yeasts, vacuoles, *Candida*, metallopeptidases, aminopeptidase Y

**OBSAH:**

Seznam obrázků ..... 10

Seznam tabulek ..... 11

Seznam zkratek ..... 12

Úvod ..... 14

1. Patogenní kvasinky rodu *Candida* ..... 15

1.1. Vakuoly kvasinek ..... 15

1.1.1. Degradace proteinů ve vakuole ..... 17

1.1.1.1. Autofagie ..... 17

1.1.1.2. Endocytóza ..... 18

1.1.2. Cesta proteinu na místo učení a jeho průběžná modifikace ..... 18

1.1.3. Vakuolární proteázy ..... 19

1.1.3.1. Rozpustné vakuolární proteiny ..... 20

1.1.3.2. Membránově vázané vakuolární proteiny ..... 23

1.2. Šíření kvasinek způsobujících kandidózu ..... 23

1.2.1. Geografický vliv ..... 24

1.2.2. Vliv zdravotního stavu ..... 24

1.2.3. Vliv nemocniční epidemiologie ..... 24

1.2.4. Vliv antimykotické léčby ..... 25

1.3. Vývoj patogenity ..... 25

1.3.1. Sekvence genomu ..... 26

1.3.2. Polymorfismus v diploidních genomech ..... 26

1.3.3. Využití a evoluce kódování CUG kodonů ..... 27

1.3.4. Páření a meióza ..... 27

1.4. *Candida albicans* ..... 28

1.4.1. Strategie boje *C. albicans* s makrofágy ..... 29

1.4.1.1. „Maskování se“ před imunitními buňkami ..... 29
1.4.1.2. Ochrana před antimikrobiálními látkami vylučovanými makrofágy ..... 29
1.4.1.3. Modifikace buněčné stěny na základě zdrojů živin ..... 30
1.4.1.4. Ochrana v kyselém prostředí ..... 30
1.4.1.5. Regulace morfogeneze ..... 30
1.4.1.6. Interakce kvasinka-fagocyt ..... 31
1.5. *Candida parapsilosis* ..... 31
1.5.1. Incidence ..... 32
*1.5.2.* Genom *C. parapsilosis* ..... 32
1.5.3. Molekulární virulenční mechanizmy ..... 33
1.5.3.1. Adheze ..... 34
1.5.3.2. Morfologie ..... 34
1.5.3.3. Tvorba biofilmů ..... 34
1.5.3.4. Produkce hydrolytických enzymů ..... 35
1.5.3.5. Stavba buněčné stěny ..... 36
1.5.3.6. Metabolizmus mastných kyselin ..... 36
1.5.3.7. Produkce prostaglandinu ..... 37
2. Aminopeptidázy rodiny M28 ..... 38
2.1. Peptidázy ..... 38
2.2. Metalopeptidázy ..... 38
2.2.1. Klan MH ..... 39
2.2.2. Rodina M28 ..... 40
2.2.2.1. Aminopeptidáza Y ..... 43
2.2.2.2. Glutamátkarboxypeptidáza II ..... 43
2.2.2.3. Glutamátkarboxypeptidáza III ..... 44
2.2.2.4. Aminopeptidáza S ..... 44

2.2.2.5. AaaA aminopeptidáza ..... 45
2.2.2.6. Karboxypeptidáza Q ..... 45
2.2.2.7. Aminopeptidáza ES-62 ..... 46
2.3. PA doména ..... 47
3. Experimentální část ..... 48
3.1. Materiál a přístroje ..... 48
3.1.1. Buněčný materiál ..... 48
3.1.2. Tekuté půdy a agary ..... 48
3.1.3. Sady (kity) ..... 48
3.1.4. Přístroje ..... 49
3.1.5. Ostatní chemikálie a roztoky ..... 49
3.1.6. Ostatní materiál ..... 51
3.2. Metodika ..... 52
3.2.1. Strategie přípravy vektorů pro expresi aminopeptidáz APE3 ..... 52
3.2.2. Design primerů ..... 52
3.2.3. Izolace DNA ..... 56
3.2.4. Amplifikace genů kódujících aminopeptidázy ..... 56
3.2.5. Konstrukce expresních vektorů a minipreparace plasmidové DNA ..... 57
3.2.6. Transformace a kultivace ..... 58
3.2.7. Exprese aminopeptidáz v *E. coli* ..... 58
3.2.8. Izolace a solubilizace inkluzních tělísek ..... 58
3.2.9. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza ..... 59
3.2.10. MS analýza ..... 63
Závěr ..... 65
Seznam použité literatury ..... 66

## Seznam obrázků

**Obrázek 1** Morfologické formy kvasinek. Nahoře je forma blastospory, vlevo pak forma pseudohyfy a vpravo forma pravé hyfy. Morfologický přerod mezi hyfou a pseudohyfou probíhá spíš jen výjimečně. (Berman a kol., 2007) .....28

**Obrázek 2** Schéma aktivního místa metalopeptidáz rodiny M28 (Stamper a kol., 2001).....40

**Obrázek 3** Předpokládaná katalytická cesta aminopeptidázy kvasinky Streptomyces griseus (SGAP). Kyselý zbytek Glu131 aktivuje na zinek vázanou molekulu vody a další zbytek Tyr246 polarizuje karbonylový uhlík a stabilizuje tranzitní stav. Čárkované čáry označují stabilizační interakce a / nebo vodíkové vazby (Fundoiano-Hershcovitz a kol., 2004). .....41

**Obrázek 4** Imunomodulační účinky aminopeptidázy ES-62: 1) ES-62 je schopen indukovat zrání dendritických buněk, které indukují $T_H2$ (protizánětlivý fenotyp T-buněk) a odvádět imunitní odpovědi pryč od $T_H1$ (prozánětlivý fenotyp T-buněk); 2) makrofágy vystavené ES-62 jsou odolné vůči indukci prozánětlivé odpovědi následnými stimuly; 3) ES-62 indukuje produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 z B1 lymfocytů, což působí na potlačení zánětu a polarizaci imunitních odpovědí. (Harnett a kol., 2004).....46

**Obrázek 5** Schéma in-fusion klonování (převzato z návodu - http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/In-Fusion_HD_Cloning_Kit_121416.pdf) .....55

**Obrázek 6** Elektroforéza APE3 na 1% agarózovém gelu. *1. Marker 1kb DNA Ladder, 2. CaAPE3his (PPP Master Mix), 3. CaAPE3his (EmeraldAmp GT PCR Master Mix), 4. CaAPE3 (PPP Master Mix), 5. CaAPE3 (EmeraldAmp GT PCR Master Mix), 6. CpAPE3his (PPP Master Mix), 7. CpAPE3his (EmeraldAmp GT PCR Master Mix), 8. CpAPE3 (PPP Master Mix), 9. CpAPE3 (EmeraldAmp GT PCR Master Mix)* .....57

**Obrázek 7** SDS-PAGE CaApe3p – exprese při **27 °C**; 12% gel: 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (3 h po indukci IPTG), 6. CaAPE3his (4 h po indukci IPTG), 7. CaAPE3his (vzorek CYTOSOL), 8. CaAPE3his (vzorek LB média), 9.-10. (prázdné jamky); (jamky číslovány zleva doprava) .....59

**Obrázek 8** SDS-PAGE CaApe3p – exprese při **32 °C**, 12% gel: 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (3 h po indukci IPTG), 6.

CaAPE3his (4 h po indukci IPTG), 7. CaAPE3his (5 h po indukci IPTG), 8. CaAPE3his (6 h po indukci IPTG) .....60

**Obrázek 9** SDS-PAGE CaApe3p – exprese při **37 °C**, 12% gel: 1. Marker 10-250kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (3 h po indukci IPTG), 6. CaAPE3his (4 h po indukci IPTG) .....60

**Obrázek 10** SDS-PAGE CaApe3p, 12% gel - Porovnání exprese při 27 °C a při 37 °C vedle sebe: 1. Marker 10-250kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (18 h po indukci IPTG), 6. CaAPE3his (před indukcí), 7. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 8. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 9. (3 h po indukci IPTG), 10. CaAPE3his (4 h po indukci IPTG); (jamky číslovány zleva doprava); jamky 2-5 obsahují vzorky z průběhu exprese při 27 °C, jamky 6.-10 obsahují vzorky z průběhu exprese při 37 °C. .....61

**Obrázek 11** SDS-PAGE (12% gel) - Porovnání rozpouštění inkluzí v 60% kyselině octové (HAc) a v 8M močovině (U): 1. Marker 10-250kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (S, HAc), 3. CaAPE3his (P, HAc), 4. CaAPE3his (LB médium), 5. CaAPE3his (S, U), 6. CaAPE3his (P, U), 7. CaAPE3his (S, HAc).....62

**Obrázek 12** MALDI LTQ Orbitrap – MS spektrum analyzovaného proužku z gelové elektroforézy obsahující specifické peptidy odpovídající proteinu APE3 (značeny červeně). 64

## Seznam tabulek

**Tabulka 1** Přehled rozřazení peptidáz rodiny M28 do jednotlivých podrodin. (převzato z https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M28 [online], upraveno, [cit. 2020-06-14]).....42

**Tabulka 2:** Design primerů pro přípravu CaAPE3 *(černá část odpovídá polilinkeru pET28b, modrá část odpovídá genu CaAPE3).*.....54

**Tabulka 3:** Design primerů pro přípravu CpAPE3 (černá část odpovídá polilinkeru pET28b, zelená část odpovídá genu CpAPE3).....54

**Tabulka 4** Přehled identifikovaných peptidů odpovídajících proteinu APE3 C. albicans .....64

## Seznam zkratek

ALP – alkalická fosfatáza

AP-1 – adaptorový protein 1

AP-3 – adaptorový protein 3

APY / APE3 – aminopeptidáza Y

BCG – β-citrylglutamát

CIE – na klatrinu nezávislá endocytóza

CME – klatrinem zprostředkovaná endocytóza

CPS – karboxypeptidáza S

CPY – karboxypeptidáza Y

Cvt – cesta cílená z cytoplazmy do vakuoly (z angl. cytoplasm-to-vacuole targeting)

DPAP B – dipeptidyl-aminopeptidáza B

ER – endoplazmatické retikulum

GA – Golgiho aparát

GCPII – glutamátkarboxypeptidáza II

GIT – gastrointestinální trakt

IAP – izoenzym alkalické fosfatázy

JIP – jednotka intenzivní péče

MRS – hlavní opakující se sekvence (z angl. major repeat sequence)

MTL – lokus páření (z angl. mating-type loci)

MVB – multivesikulární tělísko

NAA – N-acetylaspartát

NAAG – N-acetylaspartylglutamát

$OD_{600}$ – optická hustota při vlnové délce 600 nm

PA – spjatý s proteázami (z angl. protease-associated)

PAMP – molekulární vzory spojené s patogeny (z angl. pathogen-associated molecular patterns)

PCGP – plazmatická glutamátkarboxypeptidáza

PrA – proteináza A

PrB – proteináza B

PSMA – membránový antigen specifický pro prostatu

RNS – reaktivní formy dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

Sapp – protein Sap

SGAP – aminopeptidáza *Streptomyces griseus*

SNP – jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single-nucleotide polymorphism)

SOD – superoxiddismutáza

# Úvod

Pokrok ve zdravotnictví a vývoj antibakteriálních léčiv je velkým přínosem, zároveň však vytváří prostor pro dříve nezvyklé oportunní infekce. K jejich nejčastějším původcům patří oportunně patogenní kvasinky, kterými se v této práci zabývám. Jedná se především o kvasinky rodu *Candida*. Ty se v těle zdravého hostitele vyskytují jako běžný a neškodný komenzál. Pokud je ale hostitel imunokompromitován, stávají se tyto kvasinky příčinou mykotických infekcí s různou mírou závažnosti – od povrchových mykóz po život ohrožující systémová onemocnění, jejichž léčba je krajně obtížná.

Nejlépe prostudovanou kvasinkou je *Saccharomyces cerevisiae*. Molekulární mechanizmy, o něž se opírá, jsou podobné těm, které využívají kvasinky *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Přesto se v mnohém liší, a navíc dosud nebyly tak dobře prozkoumány. Ačkoliv byly genomy *C. albicans* a *C. parapsilosis* sekvenovány, jen malá část genů a odpovídajících proteinů byla podrobněji experimentálně charakterizována.

To se týká i enzymů klíčových pro funkci vakuol, které byly dosud studovány zejména u nepatogenní kvasinky *S. cerevisiae*. Vakuola přitom hraje velice významnou roli právě v životě patogenních kvasinek: bez ní by se nedokázaly přizpůsobit hostiteli a překonat jeho imunitní obranu. Znalosti týkající se vakuol patogenních kvasinek mohou napomoci budoucímu vývoji léčiv. Tato práce se zabývá především peptidázami lokalizovanými ve vakuolách patogenních kvasinek. Kromě literární rešerše pokrývající problematiku patogenních kvasinek, jejich vakuol a proteolýzy v širším smyslu slova, jsem se zabýval také přípravou jedné z vakuolárních peptidáz, aminopeptidázy Ape3p z kvasinek *C. albicans* a *C. parapsilosis* s cílem přispět k popisu tohoto dosud nestudovaného enzymu.

# 1. Patogenní kvasinky rodu *Candida*

Rod *Candida* je rod kvasinek, který běžně kolonizuje téměř všechny slizniční povrchy a gastrointestinální trakt a kůži (Manolakaki a kol., 2010). Kvasinky tohoto rodu jsou nejčastější příčinou oportunních plísňových infekcí na celém světě (Butler a kol., 2009). Jedná se tedy o oportunní patogeny (Kocková-Kratochvílová, 1982) vyvolávající onemocnění pouze u jedinců s oslabenou imunitou, nikoliv u zdravých jedinců (Votava, 2003). Dietní faktory, jako je nadbytek nebo nedostatek určitých živin a mechanické faktory, jako je trauma nebo okluzivní poranění, mohou změnit vnitřní mikroflóru a umožnit tak bujení patogenních kvasinek (Biswas a kol., 2007). Tyto kvasinky způsobují skoro 96 % všech oportunních mykóz (Meyers a kol., 1978), neboli onemocnění způsobených houbami. Přesnější označení mykóz vychází z místa účinku (dermatomykózy, otomykózy, onychomykózy atd.) nebo podle mikroorganismu, který ji způsobil (kandidózy, kryptomykózy, torulopsidózy a jiné). Nemoci způsobené kandidami se tudíž nazývají kandidózy (Kocková-Kratochvílová, 1982). Nejčastěji je způsobují druhy *C. albicans*, C. *tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* a *C. krusei* (Hazen a kol., 1995). Pacienti s traumatem často čelí náhlému narušení epiteliálních bariér, které umožňují hlubokou kontaminaci různými patogeny z prostředí nebo z jejich vlastní flóry, jako jsou právě kvasinky rodu *Candida*, které jsou tak významnou příčinou morbidity (nemocnosti) a mortality (úmrtnosti) u pacientů s traumatem, i když je v traumatických centrech intenzivně podávána profylaktická léčba antimykotikem flukonazolem (Manolakaki a kol., 2010). Pronikne-li infekce do organismu, hrozí nebezpečí vzniku abscesů, trombů anebo i zasažení orgánů (Meyers a kol., 1978). Patogenní druhy rodu *Candida* také vytvářejí dobře vyvinuté biofilmy, které se vyskytují na různých implantátech a jsou rezistentní vůči antimykotikům (Biswas a kol., 2007).

## 1.1. Vakuoly kvasinek

Vakuola je organela, která zabírá přibližně 20 % buněčného prostoru a hraje důležitou roli při degradaci makromolekul, uskladňování živin, proteinové homeostázi a při detoxikaci. Vakuola v kvasinkách je místem, kde se vyskytuje četné množství proteáz, lipáz, nukleáz a transportérů. Je dynamickou organelou, která prochází fúzními a štěpnými událostmi v reakci na buněčný cyklus a podněty prostředí. Logaritmicky rostoucí buňky mají vícedílnou vakuolu, zatímco ve stacionárních fázích buněk nebo u buněk hladovějících při nedostatku zdrojů uhlíku se tyto laloky fúzují, aby vytvořily jednu sférickou vakuolární strukturu. V logaritmické fázi

růstu je prostředí ve vakuole (pH cca 6,2) mírně kyselejší oproti cytosolu (pH cca 7,2) (Hecht a kol., 2014).

Funkčnost vakuoly kvasinek je významným faktorem při interakci kvasinka-fagocyt nebo když je kvasinka vystavena nepříznivým podmínkám (Hazel a kol., 1996). Funkci této organely definuje řada proteinů. 200 z 6000 kvasinkových genů je označováno jako kódující proteiny s vakuolovou lokalizací a 27 % z nich je popsáno jako mající transportní funkci. Zbývající proteiny mají funkce spojené s makromolekulární hydrolýzou, membránovou fúzí, tříděním proteinů a jejich zacílením na vakuolu a s okyselováním. Většina z těchto proteinů je nasměrována do vakuoly přes sekreční cestu (Hecht a kol., 2014) nebo prostřednictvím endozomu. Vakuolově cílené proteázy jsou na ně buď membránově vázané, nebo jsou ve formě rozpustných prekurzorů (Hazel a kol., 1996).

Tyto proteázy jsou syntetizovány jako prekurzory, které před generováním konečné aktivní formy podstoupí mnoho posttranslačních modifikací. Proteolytická aktivace odstraněním propeptidů je prováděna proteinázou A anebo proteinázou B komplikovaným kaskádovitým způsobem. Substráty vakuolárních proteáz jsou většinou importovány endocytózou nebo autofagocytózou, přičemž vakuolární proteolýza se zdá být hlavně důležitá při nutričním stresu a sporulaci (Hazel a kol., 1996).

Sekreční cesta kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byla studována velmi podrobně – geneticky i biochemicky. Tato cesta zahrnuje řadu funkčně odlišných organel. Přepravu mezi těmito organelami zprostředkovávají vezikuly (COPII) (Hazel a kol., 1996).

Několik buněčných kompartmentů, včetně ER, Golgiho aparátu ( dále jen GA) a mitochondrií obsahuje proteázy, které provádějí specifické procesy zpracování. Hladiny vakuolárních proteáz závisí na množství a typu zdrojů uhlíku a dusíku v růstovém médiu. Hladiny PrA, PrB a CPY jsou během exponenciálního růstu nízké, ale silně se zvyšují, když buňky vstupují do stacionárního stavu fáze. Regulace hladin vakuolární proteázy naznačuje, že vakuolární proteolýza je důležitá při nutričním stresu a při sporulaci (Hazel a kol., 1996).

### 1.1.1. Degradace proteinů ve vakuole

Ve vakuole se vyskytuje značné množství exopeptidáz a endopeptidáz, které přispívají k degradaci proteinů. Vakuola udržuje za fyziologických podmínek homeostázu proteinů degradací stárnoucích, přebytečných a poškozených proteinů a organel. Funkce vakuol je také životně důležitá za podmínek, když je růst buněk a proliferace snížena a proteiny musí být rozloženy, aby mohly být recyklovány jejich základní aminokyseliny. Při hladovění neboli nutričním stresu dosahuje degradace až 85% obsahu buněčných intracelulárních proteinů. Známé podněty způsobující nutriční stres jsou nedostatečný přísun uhlíku a dusíku a v menší míře nedostatek esenciálních aminokyselin, nukleotidů a sulfátů (Hecht a kol., 2014).

#### 1.1.1.1. Autofagie

Autofagie je proces, při kterém se hromadný cytoplazmatický materiál a organely izolují ve dvojvrstvé vezikule známé jako autofagozom, jehož obsah je následně ve vakuole degradován a zrecyklován. Tento mechanismus je zachován u eukaryot a používá se k udržování buněčné homeostázy (za fyziologických podmínek) tím, že vylučuje staré proteiny a poškozené organely. Autofagii lze také vyvolat za podmínek nutričního stresu a během specifických stádií buněčného cyklu, například ve stacionární fázi nebo během sporulace. Autofagie je zprostředkována více než 30 proteiny souvisejícími s autofagií, známými jako proteiny Atg. Proteiny Atg působí během řady po sobě jdoucích kroků: indukce autofagie, rozpoznávání dané složky, nukleace vezikul, expanze a kompletaci autofagozomu, recyklace Atg proteinu, fúze autofagozomu s vakuolou, štěpení vezikul a makromolekulární recyklace.

Pozoruhodný typ selektivní autofagie označuje cestu z cytoplazmy do vakuoly (Cvt – cytoplasm-to-vacuole targeting). Na rozdíl od makroautofagie je Cvt cesta využita během podmínek bohatých na živiny a je to podstatný proces. Cvt cesta reguluje selektivní transport homooligomerních vakuolárních proteinů. Je známo, že pouze tři substráty v kvasinkách jsou cíleny do vakuoly touto cestou: aminopeptidáza 1 (Ape1), alfa-mannosidáza 1 (Ams1) a aminopeptidáza 4 (Ape4). Ape1 a Ams1 jsou reziduální vakuolární proteiny, zatímco Ape4 je za fyziologických podmínek cytosolický, ale za podmínek nutričního stresu je cílený do vakuoly. Tyto substráty jsou syntetizovány v cytoplazmě, kde se homooligomerizují a vážou na Atg19. Atg19 působí jako receptor pro substráty Cvt (Hecht a kol., 2014).

#### 1.1.1.2. Endocytóza

Složení proteinu na buněčném povrchu je pečlivě regulováno. Proteiny, které se poškodí nebo které mohou být škodlivé, jsou odstraněny endocytózou a často přenosem do vakuoly, kde jsou degradovány. V poslední době vytvořila špičková mikroskopie podrobnou časovou a prostorovou mapu endocytózy zprostředkované klathrinem (CME). CME je zdaleka nejlépe charakterizovanou endocytární cestou zahrnující působení více než 50 proteinů v kvasinkách. Je důležité si uvědomit, že organizace a načasování endocytárních událostí popsaných u kvasinek se nyní u savců do značné míry zachovává. Kromě dobře charakterizované dráhy CME byla v kvasinkách také nedávno identifikována endocytární dráha nezávislá na klathrinu (CIE – clathrin-independent endocytic pathway), analogická k dráze RhoA CIE u savců.

Endocytóza a vakuolové třídění proteinů buněčného povrchu vyžaduje ubikvitinaci nákladu. Průkopnické studie receptorů vázaných na kvasinkové G-proteiny a nutričních permeáz ukázaly, že ubikvitinace indukovaná ligandem nebo živinami předchází endocytózu proteinu. Ubikvitinová ligáza Rsp5 je nutná pro ubikvitinaci, ale většina membránových nákladů (membrane cargos) neváže ligázu přímo. Místo toho adaptorové proteiny (např. alfa-arestiny) váží Rsp5 ke specifickému membránovému nákladu, často signálem indukovaným způsobem a stimulují endocytózu. Jakmile jsou ubikvitinované nákladní proteiny odstraněny z buněčného povrchu, jsou tříděny do endozomů a vstupují MVB způsobem závislým na ESCRT (proteinech ovlivňujících vchlipování váčků do endozomu).

### 1.1.2. Cesta proteinu na místo učení a jeho průběžná modifikace

Nově vzniklé proteiny jsou nejprve translokovány do endoplazmatického retikula (ER) (Hecht a kol., 2014). Translokace do ER je podporována hydrofobním signálem (signálním peptidem) nebo prepeptidy, které mohou být v ER odstraněny pomocí signální peptidázy. Signální peptid některých membránových proteinů není odstraněn a funguje jako membránová kotva. Jedním z důležitých procesů vyskytujících se v ER je skládání nově translokovaných proteinů. ER obsahuje řadu proteinů, jako jsou chaperony, které pomáhají skládat proteiny. Uskutečňuje se zde také Asn-vázaná glykosylace proteinů, která probíhá na akceptorových místech Asn-X-Thr nebo Asn-X-Ser (X je jakákoli aminokyselina kromě Pro) (Hazel a kol., 1996).

Poté jsou proteiny cílené do vakuol převezeny vezikulami COPII do GA, kde jsou uhlovodíkové zbytky sekrečních proteinů modifikovány a rozšířeny (Hecht a kol., 2014). Uhlovodíkové postranní řetězce vakuolárních proteáz obecně podléhají omezenějšímu prodloužení v GA, než jak je tomu u sekretovaných enzymů (Hazel a kol., 1996). V tomto bodě dosáhnou nákladní proteiny křižovatky v sekreční dráze; mohou být zadrženy v GA, přesměrovány na plazmatickou membránu nebo přeneseny do vakuoly (Hecht a kol., 2014).

Přeprava látek z GA na buněčný povrch je buď přímá, nebo nepřímá prostřednictvím endozomálního meziproduktu. Při nepřímém transportu z GA na buněčný povrch hraje důležitou roli komplex adaptorového proteinu 1 (AP-1). Skládání proteinu na buněčném povrchu je pak pečlivě regulováno. Proteiny, které se poškodí nebo které mohou být škodlivé, jsou odstraněny endocytózou a často transportem do vakuoly, kde jsou degradovány (Hecht a kol., 2014).

Obdobně funguje transport z GA do vakuol, a to buď přímo, vyžadující komplex adaptorového proteinu 3 (AP-3), nebo nepřímo prostřednictvím meziproduktu, kterým je multivezikulární tělísko (MVB). Tyto dva transportní intervaly označované jako dráhy alkalické fosfatázy (ALP) a karboxypeptidázy Y (CPY) jsou pojmenovány podle modelových přepravovaných látek (Hecht a kol., 2014).

### 1.1.3. Vakuolární proteázy

Kvasinková vakuola obsahuje sedm charakterizovaných vakuolárních proteáz, které zahrnují tři aminopeptidázy (Ape1, APY, Dap2), dvě karboxypeptidázy (CPY a CPS) a dvě endopeptidázy (PrA a PrB). Nejprve je mnoho vakuolárních proteáz, včetně CPY, CPS a Ape1, přeloženo jako prekurzory, které jsou proteolyticky štěpeny, aby se staly zralými, aktivními vakuolárními proteázami. Kromě proteolýzy jsou CPY a CPS glykosylovány v sekreční dráze, což mění jejich molekulovou hmotnost (Hecht a kol., 2014).

Signální sekvence CPY směruje rodící se protein do ER a následně je odstraněna. CPY endoplazmatického retikula má propeptid, který blokuje proteázovou aktivitu a napomáhá při skládání (foldingu) a glykosylaci CPY za vzniku p1-CPY. Další glykosylace v GA tvoří formy p2-CPY s vyšší molekulovou hmotností. Nakonec ve vakuole Pep4 štěpí CPY propeptid za vzniku zralé CPY. Defekty ve zpracování CPY byly nápomocné při identifikaci proteinů

zapojených do kontroly kvality proteinu, glykosylace a transportních cest mezi ER a vakuolou (Hecht a kol., 2014).

Na rozdíl od CPY, která vyžaduje Vps10 receptor pro obchodování GA s MVB, je karboxypeptidáza S (CPS) produkována jako prekurzor (pCPS), což je membránový protein typu II. Jakmile pCPS dosáhne vakuoly, Pep4 nebo Prb1 rozštěpí transmembránové ukotvení k vytvoření zralého CPS (mCPS), což je rozpustná peptidáza ve vnitřním prostoru vakuoly (Hecht a kol., 2014).

Aminopeptidáza I (označovaná jako Ape1 nebo API) nevstupuje do sekreční dráhy a postrádá signální sekvenci. Zatímco CPY a CPS trvá cesta do vakuoly přibližně 6 minut, Ape1 vyžaduje více než 40 minut. Jak je uvedeno výše, Apel používá Cvt dráhu. Cvt dráha vyžaduje podobné vybavení jako autofágová cesta a představuje de novo mechanismus pro tvorbu vezikul v cytoplazmě (Hecht a kol., 2014).

#### 1.1.3.1. Rozpustné vakuolární proteiny

Proteináza A (PrA), kódovaná genem *PEP4*, je monomerní aspartátová endoproteáza rodiny proteáz A1. PrA je cílená do vakuoly prostřednictvím sekreční cesty a je klíčovým enzymem v kaskádě aktivace vakuolární proteázy. Mnoho vakuolárních hydroláz, včetně PrA, je původně produkováno jako neaktivní prekurzorové formy, známé jako zymogeny. Zymogeny se neaktivují, dokud nejsou dodány do vakuoly, kde je inhibiční propeptid odstraněn proteolýzou, čímž dochází k ochráně ostatních proteinů sekreční dráhy před proteolytickým poškozením. Vakuolární proteázy, proteináza B (PrB), karboxypeptidáza Y (CPY) a aminopeptidáza I (API) jsou závislé na PrA, bez které by nebyly aktivovány (Hecht a kol., 2014).

Proteináza B (PrB) je serinová endoproteáza rodiny S8 a je kódována *PRB1* genem. Zymogenní preproPrB je zpočátku syntetizován jako polypeptid, který je translokován do ER, kde je odstraněn jeho signální peptid a výsledný polypeptid je modifikován jediným N-vázaným glykanem. PreproPrB podléhá autokatalytickému štěpení v ER, čímž se odstraní N-terminální propeptid. Aby se usnadnilo správné složení proPrB, působí zde ER-rezidentní protein, Pbn1, který během tohoto procesu působí jako chaperon, a proPrB se dále modifikuje O-vázanými glykany v GA. Předpokládá se, že N-koncový propeptid zůstává nekovalentně vázán s proPrB, což částečně inhibuje jeho enzymatickou aktivitu až do doby, než proPrB

dosáhne vakuoly. Zde je N-koncový propeptid degradován pomocí PrA. Ve vakuole je C-koncový propeptid proPrB štěpen pomocí PrA a vznikají 37kDa variace (species) PrB. Konečný štěpný krok je zprostředkován autokatalyticky pomocí PrB, odstraněním C-koncového peptidu modifikovaného jediným N-vázaným glykanem a poskytnutí zralého 31kDa PrB. Je zajímavé, že zatímco narušení PrA aktivity vede k akumulaci proPrB a N-terminálního propeptidu, proPrB si zachovává zbytkovou katalytickou aktivitu (Hecht a kol., 2014).

Karboxypeptidáza Y (CPY) je serinová karboxypeptidáza rodiny S10 a je kódována PRC1 genem v kvasinkách. Jak je uvedeno výše, CPY je zpočátku syntetizována jako prekurzor. Protein je translokován do ER, kde je signální peptidázou odstraněn signální peptid a jsou připojeny čtyři N-vázané glykanové zbytky, aby vytvořily formu zvanou p1-CPY. Skládání CPY v ER zahrnuje vytvoření pěti disulfidických můstků. Tento děj je podporován propeptidem, který působí jako intramolekulární chaperon. Protein p1-CPY je dodáván do GA, kde jsou glykanové zbytky prodlužovány za vzniku 69kDa variací (species), označovaných jako p2-CPY. V Golgiho aparátu je p2-CPY rozpoznáván pomocí Vps10 pro dodání do MVB prostřednictvím rozpoznávací sekvence Gln-Arg-Pro-Leu v propeptidové oblasti. Ve vakuole je propeptid CPY odstraněn sekvenčním působením PrA a PrB produkují aktivní CPY. Výsledný enzym je aktivní při nízkém pH a vysokých koncentracích solí, které jsou charakteristické pro vakuolární prostředí (Hecht a kol., 2014).

Karboxypeptidáza S (CPS) je zinkově závislá metalokarboxypeptidáza z rodiny M20 a je kódována genem CPS1. CPS je syntetizována jako prekurzor obsahující membránovou sekvenci (20–40 aminokyselin), která je vložena do ER membrány tak, že CPS je orientována svým C-koncem směřujícím do lumenu. CPS membránově-vázaný prekurzor je glykosylován a přechází přes GA, než je transportován do vakuoly cestou CPY. Jakmile je ve vakuole, CPS je zpracována PrB a je uvolněn do vnitřního prostoru vakuoly. Jsou pozorovány jak 74kDa, tak 77kDa zralé formy CPS, které představují CPS modifikované dvěma nebo třemi N-vázanými glykany. Je zajímavé, že membránově-vázaná forma CPS také vykazuje proteolytickou aktivitu. Bylo zjištěno, že CPS hraje také roli v účinnosti sporulace. Narušení aktivity PrB způsobuje částečný defekt ve sporulaci, ale když je aktivita PrB přerušena společně s aktivitou CPY a CPS, kvasinky nemohou sporulovat vůbec (Hecht a kol., 2014).

Aminopeptidáza 1 (Ape1) je kvasinková na zinku závislá metaloaminopeptidáza z rodiny M18, kódovaná genem *APE1*. Ape1 je syntetizována jako prekurzor preApe1, který

obsahuje 45-aminokyselinovou N-koncovou doménu, která je nutná pro vakuolární lokalizaci. PreApe1 homooligomerizuje v cytoplazmě a vytváří dodekamer, který poté využívá Cvt dráhu. PreApe1 komplex je rozpoznáván svým receptorem Atg19, který interaguje s Atg11, aby uvázal komplex preApe1 do místa tvorby autofagosomu (fagoforu), známého jako PAS (Phagophore Assembly Site). Dále je preApe1 komplex zapouzdřen do Cvt vezikuly, která se spojí s vakuolou. Vystavení kyselému pH vnitřního vakuolárního prostředí (lumenu) vede k demontáži komplexu preApe1 na preApe1 dodekamery. Nakonec PrB štěpí N-koncový propeptid preApe1 za vzniku aktivního 50kDa enzymu.Ape1 je také známý jako Lap4, protože byl zpočátku charakterizován jako Leu-aminopeptidáza ve screeningu kvasinkových mutantů defektních na schopnost hydrolyzovat syntetický substrát Leu β-naftylamid. Ape1 také bylo prokázáno, že zprostředkovává rezistenci vůči Cd2+, která je jinak toxická a indukuje oxidační stres. Kvasinky se ve vakuole zbavují Cd2+ stejně tak, jako glutathionového (GSH) S-konjugátu. GSH je recyklován z vakuoly působením gama-glutamyltranspeptidázy (Ecm38), která hydrolyzuje Glu, čímž zanechává Cys-Gly dipeptid, o kterém se předpokládá, že je dále degradován Ape1. Ape1 je tedy vyžadována pro homeostázu GSH a vady tohoto procesu vedou ke zvýšené citlivosti na Cd2+. Novější práce však identifikovala alternativní cestu degradace GSH zahrnující cytosolickou dipeptidázu Dugl, která je členem rodiny metaloproteáz M20. Tato studie prokázala, že Ape1 nebyl vyžadován pro růst kmene met15A na médiu, ve kterém byl GSH jediným zdrojem síry (Hecht a kol., 2014).

Aminopeptidáza Y (Ape3), kódovaná genem *APE3*, je metaloaminopeptidáza ze stejné skupiny proteáz M28 jako nedávno objevená, domnělá vakuolární proteáza, Ybr074w. Stejně jako YBR074w se lokus *APE3* nachází na chromozomu II *S. cerevisiae*. Globální párové seřazení sekvencí Ape3 a Ybr074w odhaluje 5,7% identitu aminokyselinové sekvence, zatímco srovnání domén proteázy M28 ukazuje přibližně 22% identitu sekvence včetně zachování katalytických zbytků. Ape3 je syntetizován jako prekurzor nesoucí 21 aminokyselinovou signální sekvenci směřující její translokaci do ER. Signální sekvence je štěpena v ER a prekurzor Ape3 je zaměřen na GA, kde je rozpoznán pomocí Vps10 pro cílení na vakuolu. Podobně jako u některých jiných proteáz je N-terminální propeptid štěpen PrB ve vakuole, čímž se získá zralý Ape3. Zralý protein Ape3 existuje jak v 70 kDa, tak 75 kDa formě, která se liší v rozsahu modifikace glykanu, protože Ape3 má osm akceptorových míst pro N-vázané glykany, ale používá se pouze 5-7 míst (Hecht a kol., 2014).

### 1.1.3.2. Membránově vázané vakuolární proteiny

Dipeptidylaminopeptidáza B (Dap2) je serinová proteáza v rodině S9. Dap2 má hydrofobní transmembránový segment umístěný 30 aminokyselin od N-konce, který slouží jak jako ER-cílící sekvence, tak jako membránová kotva. Dap2 je membránový protein typu II, který má cytosolický N-konec a prominentní C-konec, který směřuje do lumenu. Protein je zpočátku syntetizován jako 93kDa protein, dlouhý 818 aminokyselin, a je modifikován v endoplazmatickém retikulu pěti až osmi N-vázanými glykany, které podléhají minimálnímu prodloužení v GA. Výsledkem je konečný 120kDa produkt. Na rozdíl od jiných vakuolárních proteáz se Dap2 ve vakuole proteolyticky nezpracovává (Hecht a kol., 2014).

Nedávno byla identifikována proteáza související s FXNA rodinou 1 (Pff1) jako protein vakuolové membrány, u kterého se předpokládá, že má devět transmembránových segmentů. Ačkoli specifická funkce a substrátová specificita Pff1 dosud nebyla objasněna, celá genomická analýza proteinů, které reagují na nepřítomnost genového produktu PFF1 (YBR074w), je konzistentní s tím, že protein hraje roli ve vakuolární funkci. Překvapivě existuje domnělý savčí homolog Pff1. Bylo však zjištěno, že savčí protein zůstává v ER a zdá se, že se podílí na vývoji vaječníků (Hecht a kol., 2014). Vakuolární peptidázy *S. cerevisiae* jsou charakterizovány velmi podrobně, avšak u ostatních druhů kvasinek tomu tak není. Přitom například u patogenních kvasinek by bylo dobré vědět víc, uvážíme-li, jak je vakuola důležitá pro metabolické přizpůsobení a pro přežití v makrofágu (Hazel a kol., 1996).

## 1.2. Šíření kvasinek způsobujících kandidózu

Za přibližně 90 % případů infekce kvasinkami stojí především 5 druhů kandid. Jsou jimi *Candida albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis* a *C. krusei*. Distribuce těchto patogenních kvasinek způsobující kandidózu se v populačních studiích prováděných v různých zeměpisných oblastech liší. Kromě toho lze také pozorovat významné rozdíly mezi nemocničními jednotkami (JIP, onkologie). Frekvence patogenních kandid, které způsobují infekce je také závislá na predispozicích infikovaných pacientů, antimykoticích, které obdrží a na faktorech souvisejících s místní nemocnicí.

Kandidóza má za následek úmrtnost 15-35 % dospělých lidí a 10-15 % novorozenců. Míra brzké (7 dní po diagnóze) a pozdní úmrtnosti (30 dní po diagnóze) se liší (13 % vs. 30 %). Zatímco brzká úmrtnost je spojena s vhodnými faktory antifungální terapie a včasného

odstranění centrálních žilních katétrů, pozdní úmrtnost je spojena s faktory souvisejícími se základní (běžnou) kondicí hostitele (Guinea, 2014).

### 1.2.1. Geografický vliv

Existují značné rozdíly mezi počtem případů způsobených *C. glabrata* a *C. parapsilosis*. Studie ze severní Evropy a USA ohlásily vysoký počet případů způsobených *C. glabrata*, zatímco studie ze Španělska a Brazílie prokázaly nižší počet případů způsobených *C. glabrata* a vyšší počet případů připisovaných *C. parapsilosis*. Celosvětově klesá frekvence *C. albicans*, zatímco u *C. glabrat*a a *C. krusei* je stabilní a u *C. parapsilosis* a *C. tropicalis* frekvence roste (Guinea, 2004).

### 1.2.2. Vliv zdravotního stavu

Rozdílnou incidenci ovlivňuje i zdravotní stav pacienta. Odlišnosti v incidenci mezi dospělými a dětmi se projevují také v distribuci druhů. *C. albicans* je častější u pacientů ve věku do 18 let, frekvence *C. parapsilosis* klesá s věkem a *C. glabrata* je častější u starších lidí. Rozdíly byly také zjištěny při porovnání incidence u novorozenců a u dospělých pacientů. *C. albicans* a *C. parapsilosis* jsou častější u novorozenců. Oba druhy obvykle způsobují infekci související s katetry, které se u novorozenců často používají. Distribuce druhů je vysoce závislá na pacientově stavu. *C. glabrata* je nejčastěji detekovaným druhem u příjemců kmenových buněk. *C. krusei* je také relativně často zjištěna u těchto pacientů, a to pravděpodobně v důsledku rozšířeného používání azolů v tomto prostředí, které může podporovat infekci těmito dvěma druhy odolnými vůči azolům. Ostatní pacienti, například příjemci pevných orgánů, jsou však infikováni hlavně *C. albicans* a *C. glabrata* (Guinea, 2014).

### 1.2.3. Vliv nemocniční epidemiologie

Plísňové infekce se v nemocnicích staly hlavním problémem. Počet případů sepse způsobené houbami od počátku 90. let roste. Kandidóza je důsledkem pokroku ve zdravotnictví. Během posledních 20 let bylo pozorováno zlepšení v diagnostických postupech, ve vývoji a v komercializaci nových antimykotických agens a byly uskutečněny strategie pro prevenci před kandidózou, nicméně její výskyt se zvýšil. Kandidóza je obvykle diagnostikována pomocí

krevních kultur. Infekce může být způsobena kvasinkami, které se běžně vyskytují v těle. Při léčbě širokospektrálními antibiotiky dochází ke zvýšenému růstu kandid v GITu, které se díky tomu mohou snáze dostat do krevního řečiště a způsobit kandidózu. Pacienti však mohou být infikováni i exogenní cestou. Tyto exogenní izoláty mohou kolonizovat kůži, nitrožilní katetry, infúze a často jsou ohnisky vícečetné infekce. Většina hlášených ohnisek se týkala dospělých pacientů, pacientů na jednotce intenzivní péče (JIP), pacientů onkologicko-hematologických oddělení a novorozenců. Ukázalo se také, že častým způsobem přenosu této infekce na JIP je právě zdravotnický personál, kde byl zjištěn přenos *C. parapsilosis* na rukou, zejména tedy přenos na umělých nehtech. Díky tomu může být po přímém kontaktu infikována kůže pacienta anebo mohou tímto způsobem být kontaminovány katetry (Guinea, 2014).

### 1.2.4. Vliv antimykotické léčby

Míra úmrtnosti jasně koreluje s nepřítomností antifungální léčby, zpožděním při zahájení antimykotické léčby nebo použitím neúčinkujících agens. Proto by minimalizace těchto tří faktorů měla pomoci snížit úmrtnost na kandidózy. Znalost frekvence patogenních druhů by usnadnila vhodný výběr empirické antifungální léčby.

Procentuální výskyt onemocnění způsobených jednotlivými druhy je vcelku pohyblivý. Například značné změny v četnosti (její zvýšení) byly pozorovány u *C. glabrata* a *C. parapsilosis*, protože vykazují sníženou citlivost na azolová antimykotika a echinokandiny narozdíl od ostatních druhů kandid (Guinea, 2014).

## 1.3. Vývoj patogenity

Při porovnání genomové sekvence několika druhů kandid bylo zjištěno, že existují významné expanze buněčné stěny a sekrečních a transportních genových rodin patogenních druhů, naznačující adaptaci spojenou s virulencí. Velké genomické trakty jsou homozygotní ve třech diploidních druzích, což vyplývá nejspíš z nedávné rekombinační události. U několika druhů překvapivě chybí klíčové složky pohlavního rozmnožování a meiózy. Patogenní houby mohou omezit své sexuální cykly, aby maximalizovaly svou virulenci, a sekvenované druhy *Candida* vykazují obrovskou rozmanitost v jejich zjevné schopnosti se rozmnožovat. Patří mezi ně hlavní rozdíly v „mating-type“ lokusech (MTL = Mating-type loci), které u některých zástupců úplně chybí (například u *Lodderomyces elongisporus*). Všechny

kandidy kromě *C. glabrata* a *C. krusei* patří do odvětví, které je specifické překládáním kodonu CUG jako serin místo leucinu. Mimo to jsou haploidní a diploidní druhy ve dvou oddělených odvětvích (Butler a kol., 2009).

### 1.3.1. Sekvence genomu

Velikost a složení sekvenovaných genomů kandid jsou velmi odlišné. Při porovnání genomů *Candida albicans* WO-1, *Candida albicans* SC5314, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Lerdomyces elongisporus*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* a *Debaryomyces hansenii* činí rozdíl ve velikosti v některých případech až téměř 50 %. Rozdílné je taktéž i procentuální zastoupení CG párů, které se u těchto genomů pohybuje v rozmezí 33 až 45 %. Navzdory tomu jsou ale předpokládané počty protein kódujících genů podobné, a to v rozmezí 5733–6318 genů. Tato skutečnost však nesouvisí s různou velikostí. Například nejmenší genom, *C. guilliermondii*, obsahuje více genů než největší genom, kterým je *L. elongisporus*. Je to vysvětlováno až trojnásobnou variací mezigenových mezer. Mezi diploidními druhy *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a *L. elongisporus* a mezi haploidními druhy *D. hansenii* a *C. guilliermondii* byly detekovány velké syntenické bloky, které si navzdory lokálním inverzím a přesmykům v diploidních genech zachovaly své pořadí a své místo (Butler a kol., 2009).

### 1.3.2. Polymorfismus v diploidních genomech

Při porovnání dvou diploidních kmenů *C. albicans* SC5314 a WO-1 bylo zjištěno, že variace v karyotypech jsou primárně způsobeny translokacemi v MRS sekvencích. V každém kmeni jsou podobné míry jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) v každém kmeni a mezi sebou mají dvojnásobek míry SNP. To naznačuje relativně nedávnou divergenci.

Významné oblasti s rozšířenou homozygotností se nacházejí ve třech (ze čtyř) diploidních genomech, které mohou odrážet zlomem indukovanou replikaci nebo nedávný průchod parasexuálním nebo sexuálním cyklem. *Candida albicans*, *C. tropicalis* a *L. elongisporus* vykazují velké chromozomální oblasti postrádající SNP. Naproti tomu několik SNP v *C. parapsilosis* je náhodně distribuováno v celém genomu. Celkem 30 % genomu WO-1 je homozygotní pro SNP, což je 2x víc než u genomu SC5314. Na chromozomu je vždy alespoň jeden homozygotní region a pouze jeden začíná MRS sekvencí. Zatímco téměř

všechny homogenní oblasti jsou přítomny na diploidních úrovních a jsou tedy homozygotní, WO-1 ztratil jednu kopii více než 300kb oblasti na chromozomu 3, obsahující téměř 200 genů. Je zjevné, že během evoluce byl velký tlak na to, aby se tato oblast v obou kmenech homozygotní (Butler a kol., 2009).

### 1.3.3. Využití a evoluce kódování CUG kodonů

Všechny druhy kandid překládají CUG kodony jako serin namísto leucinu. Tato změna genetického kódu změnila pravidla dekódování kodonů CUN (CUU, CUC, CUA, nebo CUG) v rodu *Candida*. Zatímco *Saccharomyces cerevisiae* používá dvě tRNA, z nichž každá překládá dva kodony, druhy *Candida* používají vyhrazenou $tRNA_{CAG}^{Ser}$ pro CUG kodony a jedinou $tRNA_{IAG}^{Leu}$ pro CUA, CUC a CUU kodony, protože inosin se může párovat s A, C i U. Tato změna v dekódovacích pravidlech vynutila snížení použití CUG a také CUA (pravděpodobně v důsledku slabšího kolísání) v genech *Candida.* CUU a CUC kodony nevykazují stejné zkreslení, nejspíš kvůli jen občasnému použití. Dalším tlakem ovlivňujícím použití kodonu může být obsah GC, protože použití leucinových kodonů u druhů *Candida* je v korelaci s procentem složení GC. CUG kodony v *C. albicans* nejsou téměř nikdy (jen z 1 %) přiřazovány k orthologickým CUG kodonům v *S. cerevisiae*. Místo toho se CUG serinové kodony v *C. albicans* řadí primárně ke kodonům *Saccharomyces cerevisiae* pro serin (z 20 %) a pro další hydrofilní zbytky (z 49 %). Leucinové kodony CUG v *S. cerevisiae* se primárně přiřazují k leucinovým kodonům v kandidách (z 50 %) k dalším kodonům kódujícím hydrofobní zbytky (z 30 %). To naznačuje úplnou funkční náhradu kodonů CUG v kvasinkách rodu *Candida* (Butler a kol., 2009).

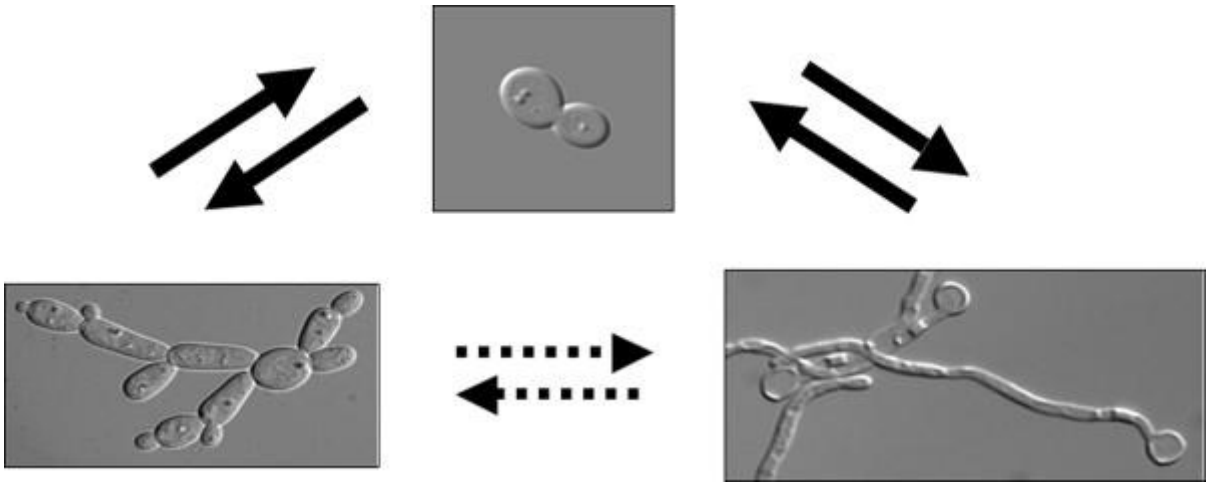
### 1.3.4. Páření a meióza

Některé složky meiózy (např. hlavní regulátor IME1) u kvasinek rodu *Candida* chybí, což naznačuje, že křížící se druhy kandid podléhají meióze bez nich. Naopak i zdánlivě nesouvisející druhy vykazovaly vysoce konzervované cesty odezvy feromonu, což naznačuje, že feromonová signalizace hraje alternativní roli, jakou je regulace tvorby biofilmu. Tato zjištění naznačují značnou plasticitu a inovaci meiotických drah v těchto kvasinkách. Kromě toho bylo zjištěno, že heterothalické (sexuální) druhy rodu *Candida* prošly v poslední době dramatickou změnou v drahách zapojených do meiotické rekombinace, se ztrátou

Dmc1-dependentní dráhy u heterothalických druhů *C. lusitaniae* a *C. guilliermondii*. Taktéž se přišlo na to, že mechanismy párování chromosomů a křížení se („crossover“) v poslední době změnily u těchto dvou druhů, protože ztratily několik složek synapstonemálních a synapsových iniciačních komplexů. Ztratili také složky hlavní cesty "crossoverové" formace v *S. cerevisiae* (MSH4, MSH5), ale zachovali si malou cestu (MUS81, MMS4). Celkově, pokud druhy *Candida* podléhají meióze, je to za redukovaného nebo jiného postupu, což naznačuje, že u mnoha druhů může existovat neznámý meiotický cyklus a že model meiózy vyvinuté v *S. cerevisiae* se výrazně liší, dokonce i mezi kvasinkami (Butler a kol., 2009).

## 1.4. *Candida albicans*

*C. albicans* je schopna měnit svou vnější strukturu (viz *Obrázek 1*) – je polymorfní. Roste ve formě blastospor (oválných kvasinkových buněk), pseudohyf (řetízkovitých kolonií tvořených protáhlejšími buňkami) a pravých hyf (dlouhých úzkých houbových vláken). Ve formě blastospory se vyskytuje, když nemá ideální podmínky, to znamená při nízké teplotě a nízkém pH. Ve formě hyfy se kvasinka nachází při pro ni ideálních podmínkách, což je optimálně při 37 °C a neutrálním pH. Schopnost změny morfologie pomáhá kvasinkám přežít a tím se zvyšuje jejich virulence (Berman a kol., 2007).



**Obrázek 1** Morfologické formy kvasinek. Nahoře je forma blastospory, vlevo pak forma pseudohyfy a vpravo forma pravé hyfy. Morfologický přerod mezi hyfou a pseudohyfou probíhá spíš jen výjimečně. (Berman a kol., 2007)

*C. albicans* je zodpovědná za drtivou většinu invazivních kandidóz, což pramení částečně z její schopnosti žít jako komenzál v různých místech těla. *C. albicans* vyjadřuje různé vlastnosti kritické pro existenci na mukózních površích, kde dochází k neustálé, ale dynamické souhře mezi vrozenými a získanými obrannými mechanismy hostitele. Povaha onemocnění, které je výsledkem invaze tohoto organismu do tkání, je složitá a závisí na různých fyzikálních a fyziologických podmínkách v hostiteli a na specifických vlastnostech *C. albicans*. Schopnost *C. albicans* rychle získat rezistenci na antimykotika (například amfotericin B, flucytosin a řada azolů) znamená, že pokračující vývoj nových antimykotik zůstává pro kliniky a farmaceutické společnosti důležitým zaměřením (Biswas a kol., 2007).

## 1.4.1. Strategie boje *C. albicans* s makrofágy

### 1.4.1.1. „Maskování se“ před imunitními buňkami

Imunitní fagocyty, včetně makrofágů, rozpoznávají *C. albicans* na základě molekulárních vzorců asociovaných s patogenem (PAMP), přičemž nejdůležitějším z nich jsou uhlovodíky buněčné stěny (např. β-glukany, manan nebo chitin). Tento druh kvasinek však překrývá vrstvu β-glukanů a chitinu vrstvou mannoproteinů. Díky tomu je pro receptory makrofágů zaznamenávající β-glukany do značné míry nemožné zjistit, že je patogenní kvasinka přítomna a imunitní reakce nenastane.

Vázání komplementových proteinů na buněčný povrch působí jak mikrobicidně, tak i imunostimulačně. Buněčný povrch *C. albicans* však váže řadu negativních regulátorů komplementové kaskády, aby inhiboval aktivaci komplementu. Pra1 (pH-regulovaný antigen) váže plazminogen a faktory H, FHL-1 a C4B (Jimenez-Lopez a kol., 2013). Faktor H a FHL-1 inaktivují komplement. Plazminogen je aktivován na plazmin, který degraduje extracelulární matricovou složku fibrinogen (Luo a kol., 2009), což usnadňuje jeho pronikání do tkání a následnou nekrózu (Crowe a kol., 2003).

### 1.4.1.2. Ochrana před antimikrobiálními látkami vylučovanými makrofágy

Když už makrofág zjistí přítomnost patogenu, začne do extracelulárního prostoru vypouštět ROS a RNS (reaktivní formy kyslíku a dusíku), které mají antimikrobiální účinek. Proti tomuto kroku se *C. albicans* umí bránit taky. Tyto kvasinky totiž kódují katalázu Cat1p, která je přítomná na buněčné stěně a šest superoxiddismutáz (*SOD*), z nichž jsou Sod4p, Sod5p

a Sod6p aktivně vypouštěny do extracelulárního prostoru. Superoxiddismutázy převádějí superoxidové radikály produkované makrofágy na peroxid vodíku, který je pro kvasinky také toxický, jenže ten je katalázou Cat1p ihned rozložen na $H_2O$. Tato část obrany probíhá mimo buňku a řeší tím nebezpečí toxických ROS ještě před tím, než vniknou do buňky (Jimenez-Lopez, C. a kol., 2013). Obrana proti RNS (především tedy proti oxidu dusnatému) probíhá v intracelulárním prostoru, a to díky třem flavohemoglobinovým enzymům Yhb1p, Yhb4p a Yhb5p, přičemž nejpodstatnější roli hraje Yhb1p (NO dioxygenáza), který přeměňuje NO na dusičnany (Ullmann a kol., 2004).

#### 1.4.1.3. Modifikace buněčné stěny na základě zdrojů živin

Důležitou roli u hub hrají i živiny, především zdroje uhlíku, jimiž je majoritně glukóza. *C. albicans* však umí využívat i jiné zdroje – například laktát. Bylo zjištěno, že kvasinky živící se především laktátem mají trochu jinak modifikovanou buněčnou stěnu a stávají se odolnějšími. Když takovou kvasinku pozře fagocytující buňka imunitního systému, kvasinka je schopna způsobit této imunitní buňce větší poškození a snáze pak uniknout (Jimenez-Lopez a kol., 2013).

#### 1.4.1.4. Ochrana v kyselém prostředí

Bylo zjištěno, že když se tento druh kvasinek dostane do kyselého prostředí, tak je schopen vypouštět do okolí $NH_3$ vzniklý při degradaci aminokyselin, kterou je v takovém prostředí kvasinka schopna urychlit, což má za následek požadované zvýšení pH. Tento děj probíhá ruku v ruce s defektem ATPázové pumpy blokující další okyselení (Jimenez-Lopez a kol., 2013).

#### 1.4.1.5. Regulace morfogeneze

Další obranou *C. albicans* je morfogeneze – schopnost měnit svou buněčnou formu. Pokud je kvasince nějakým způsobem narušena možnost využít svůj polymorfismus (schopnost měnit svou formu), tak její virulence klesá nebo přímo mizí. V případě, že však tato kvasinka není v tomto ohledu nijak omezena, je schopná se po pozření makrofágem přeměnit z kvasinkové formy na hyfu a fagocyt penetrovat a usmrtit (Jimenez-Lopez a kol., 2013).

Regulace morfogeneze je velice komplexní a zahrnuje několik indukčních signálů, kterými jsou zvýšení obsahu $CO_2$, sérum, fyziologická teplota, N-acetylglukosamin vyživující signální dráhy vystupující v mnoha transkripčních faktorech a v neposlední řadě je zapotřebí neutrální pH (Jimenez-Lopez a kol., 2013).

#### 1.4.1.6. Interakce kvasinka-fagocyt

Během interakcí kvasinka-fagocyt dochází ve vakuole k dynamickým změnám velikosti a k morfologickým změnám, které jsou nezbytné pro rezistenci kvasinky vůči právě nepříznivým vlivům. Je-li vakuola nefunkční, stává se kvasinka proti makrofágům a vůči kritickým okolním podmínkám prakticky bezbranná a tyto „duely" z drtivé většiny případů prohrává. U mutantů kvasinek *C. albicans vps11*Δ (vacuolar protein sorting), které měly fragmentovanou vakuolovou morfologii, což demonstrovalo zhoršenou funkci vakuol, byla zjištěna nižší rezistence proti osmotickému a teplotnímu stresu, stejně tak byla naměřena i snížená aktivita karboxypeptidázy Y, dále zhoršená schopnost přeměny z kvasinky na hyfu a snížená sekrece asparátových proteáz, což má za následek razantní snížení jejich virulence (Palmer, 2005).

## 1.5. *Candida parapsilosis*

Ačkoli nejrozšířenějším a nejinvazivnějším druhem při infekcích krve na JIP je *Candida albicans*, v poslední době přibývá počet invazivních infekcí ostatními druhy *Candida* a dominance *C. albicans* klesá. Z nich je obzvlášť důležitá *Candida parapsilosis*, protože je schopna vytvářet odolné biofilmy na žilních katetrech a dalších lékařsky implantovaných vybaveních, což ohrožuje pacienty, kteří podstoupili invazivní lékařský zásah. *C. parapsilosis* rovněž rychle roste při celkové parenterální výživě podávané pacientům na JIP, čímž ohrožuje především podvyživené děti a novorozence s nízkou porodní hmotností. Přestože infekce *C. parapsilosis* obecně vedou k nižší nemocnosti a úmrtnosti než infekce *C. albicans*, bylo ohlášeno, že několik klinických izolátů tohoto druhu je méně citlivých na určitá antimykotika (echinokandiny, azolová léčiva), což komplikuje výběr empirických antimykotik. *C. parapsilosis* často druhým nebo třetím nejčastěji izolovaným druhem *Candida* na JIP (Tóth a kol., 2019).

### 1.5.1. Incidence

Přestože je *C. albicans* hlavní příčinou kandidózy, je *C. parapsilosis* druhým nejčastěji izolovaným druhem kandid v jižní Evropě, některých regionech Asie a Latinské Ameriky. V Srbsku dosahuje téměř stejné incidence, jako právě *C. albicans*. Bylo také prokázáno, že víc než 60 % izolovaných kvasinek rodu *C. parapsilosis* je rezistentních vůči azolovým léčivům a v některých případech byla dokonce zjištěna odolnost i vůči více druhům léčiv, což zvyšuje obavy týkající se léčby infekcí způsobených tímto druhem kvasinek (Tóth a kol., 2019).

*C. parapsilosis* neohrožuje pouze dospělé pacienty na JIP, nýbrž i novorozence, kteří se narodili s nízkou porodní hmotností (Weems a kol., 1987). V těchto případech způsobuje *C. parapsilosis* drtivou většinu infekcí způsobených jinými druhy kandid než *C. albicans* („non-albicans“ druhy) (Tóth a kol., 2019).

### *1.5.2.* Genom *C. parapsilosis*

Je známá genomická sekvence kmene CDC317. Její velikost činí 13 Mbp. *C. parapsilosis* je diploidní s 8 páry chromozomů, které jsou na obou koncích zakončeny telomerickými repeticemi, které byly původně identifikovány analýzou RNA podjednotek telomerázy TER1 (Gunisova a kol., 2009).

Bylo také zjištěno, že lokus páření MTLa2 je pseudogen (Logue a kol., 2005) a byla zjištěna nízká míra heterozygozity s pouze jedním SNP na 15 553 bazí, což je až 25-70x nižší míra, než u ostatních druhů kandid. Takováto nízká genetická variabilita naznačuje relativně nedávnou globální expanzi virulentního klonu s poškozeným rozmnožovacím systémem (Tóth a kol., 2019).

Srovnávání 4 sekvenovaných druhů *C. parapsilosis* ukázalo určitou míru variace v obsahu genů kódujících fosfolipázy, efluxní pumpy a peptidázy. Především pak byly zjištěny významné rozdíly v genové rodině typu ALS (z angl. agglutinin-like sequence) kódující velkou skupinu glykoproteinů s velkým buněčným povrchem, které účinkují při interakci patogen-hostitel (Hoyer a kol., 2001). Přišlo se také na značné množství variací počtu kopií. Při srovnávání těchto 4 druhů bylo objeveno 40 takových variací. Předpokládá se i možná rekombinace různými kmeny *C. parapsilosis* (Tóth a kol., 2019).

Izoláty *C. parapsilosis* jsou rozděleny do tří různých druhů, a to *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis* (Tavanti a kol., 2005). Všechny analyzované kmeny *C. metapsilosis* získané z různých míst jsou výsledkem stejné hybridizační události dvou dosud neznámých nepatogenních rodičovských linií. Je zajímavé, že hybridy *C. metapsilosis* a *C. orthopsilosis* mají vyšší potenciál virulence u lidí než jejich rodičovské kmeny, protože z izolovaných vzorků byl zjištěn pouze jeden kmen homozygotní *C. orthopsilosis*, což naznačuje možnost, že virulentní druhy vznikají hybridizací nevirulentních nebo méně virulentních druhů (Tóth a kol., 2019).

Na rozdíl od *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* má *C. parapsilosis* neobvyklou molekulární stavbu mitochondriálního genomu, který se skládá z lineárních molekul DNA dlouhých 30,9 kbp končících na obou stranách specifickými telomerickými strukturami, které jsou trochu podobné s telomerami na konci eukaryotických jaderných chromozomů (Kovac a kol, 1984). Tyto lineární molekuly zahrnují geny pro zachované mitochondriální proteiny, dvě rRNA a sadu 24-tRNA. Kromě toho obsahují mitochondrie i extragenomické kruhové DNA, nazývané telomerické kruhy (t-kruhy). T-kruhy replikují autonomně prostřednictvím tzv. „rolling-circle“ mechanizmu, čímž se generují řady telomerických opakování, která se nakonec rekombinují s konci lineárních molekul DNA. V podstatě stejná molekulární architektura byla nalezena i u několika úzce příbuzných druhů *Loderromyces*, jako je *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* a *C. theae* (Kosa a kol., 2006). Je zajímavé, že mitochondrie několika druhů *C. metapsilosis* a *C. orthopsilosis* obsahují mutantní formu genomu. Tyto mutanty postrádají t-kruhy a jejich mitochondriální genomy cirkulovaly prostřednictvím fúzí typu „end-to-end“ (fúze konců genomů), což dále podporuje klíčovou roli t-kruhů v udržování telomer. Udržování mitochondriálních telomer v závislosti na t-kruhu může mít medicínský význam, protože vyrovnává alternativní prodlužování telomer na konci eukaryotických chromozomů a vzhledem k tomu, že mají lidské buňky kruhový mitochondriální genom, replikační strategie lineární mitochondriální DNA u *C. parapsilosis* byla navržena jako slibný molekulární cíl pro terapii (Tóth a kol., 2019).

### 1.5.3. Molekulární virulenční mechanizmy

Ve veterinární medicíně byly u různých živočišných druhů hlášeny infekce *C. parapsilosis*. Patogenita tohoto druhu je spojena s několika domnělými virulenčními faktory,

včetně tvorby biofilmu a produkce proteáz, fosfolipáz, lipáz a dalších hydrolytických enzymů atd. (Cordeiro a kol., 2017).

### 1.5.3.1. Adheze

Adheze k různým povrchům je klíčový předběžný krok tvorby biofilmu a následně kolonizace hostitele. *C. parapsilosis* ochotně kolonizuje například katetry nebo implantáty (Panagoda a kol., 2001). Vysokou schopnost přilnutí k takovým materiálům ovlivňuje hned několik proteinů. Například proteiny buněčné stěny, které jsou kovalentně vázány na buněčnou stěnu hub, účinně vážou extracelulární matricové proteiny hostitelské buňky (např. fibronektin, vitronektin a laminin) (Tóth a kol., 2019).

### 1.5.3.2. Morfologie

Morfologie kvasinek *Candida parapsilosis* je různorodá. Kolonie mohou být buď bílé nebo krémové, hladké nebo zkrabatělé, kráterovité nebo koncentrické. Kvasinky se v nich nacházejí ve formách blastospor nebo pseudohyf (Laffey a kol., 2005). Doposud není záznam o tom, že by kvasinky *C. parapsilosis* vytvořily pravé hyfy. Morfologický přechod z blastospory na formu pseudohyfy zatím není zcela objasněn, nicméně existuje skupina aminokyselin, u kterých tuší, že tuto morfologickou změnu podporují.

Fagocytující buňky sice nerozlišují, v jaké morfologické formě se *C. parapsilosis* nachází, ale kvasinka ve formě pseudohyfy je schopna způsobit fagocytu vyšší poškození, čímž přispívá k patogenitě. Proto jsou také zkoumány základní molekulární mechanizmy regulující morfologický přechod a byly identifikovány některé transkripční regulátory odpovědné právě za tuto morfologickou přeměnu. Jsou jimi například transkripční faktory a kinázy podílející se na adhezi a regulaci biofilmu (Tóth a kol., 2019).

### 1.5.3.3. Tvorba biofilmů

Kvasinkové buňky, které přilnou k povrchu rychle proliferují a vytváří tzv. monovrstvu. Následuje iniciace k přeměně formy z blastospor na pseudohyfy, které vytvářejí další vrstvy. Během tohoto děje vylučují buňky extracelulární matricové prvky, aby zajistili strukturální a funkční stabilitu. Jakmile je tento proces hotový, fungální buňky jsou chráněny a čekají

na vhodné podmínky pro zahájení disperze. Tento kompletní biofilm je pro hostitele velice nebezpečným, neboť chrání patogenní kvasinky před vlivem vnějších fungicidních prostředků i před vlivem imunitního systému hostitele (Silva a kol., 2009).

*C. parapsilosis* tvoří biofilmy obzvlášť ochotně v prostředí s vysokým obsahem glukózy nebo lipidů, což odráží vysoký výskyt kandidóz způsobených touto kvasinkou u pacientů, kteří dostávají parenterální výživu (Tóth a kol., 2019).

*C. parapsilosis* má vysokou přilnavost k biomateriálům díky tomu, jak snadno umí přilnout k různým typům povrchů používaných dlouhodobě nebo trvale. Jsou schopné přilnout i k měděným materiálům (obecně známým pro své antimikrobiální působení) a vytvářet biofilmy, což zvyšuje jejich virulenci. To naznačuje vysokou patogenitu tohoto druhu, který by pravděpodobně mohl mít významnou roli při používání měděných nitroděložních tělísek (Borges a kol., 2018).

### 1.5.3.4. Produkce hydrolytických enzymů

Během invaze jsou kvasinkami aktivně vypouštěny různé druhy hydroláz narušujících membránu hostitelských buněk a jejich extracelulární matrix za účelem snazší invaze. Dále tento proces podporuje adhezi buněk a tvorbu biofilmu. Tři hlavní skupiny sekretovaných enzymů této kvasinky jsou sekretované aspartátové proteázy (Sapp), lipázy a fosfolipázy (Németh a kol., 2013).

Je prokázáno, že sekretované aspartátové proteázy (konkrétně proteiny *SAPP1* a *SAPP2*) ovlivňují adhezi, poškození hostitelských buněk, fagocytózu, schopnost zabíjení a sekreci cytokinů hostitelskými makrofágy. Bylo také prokázáno, že purifikované Sapp1p a Sapp2p účinně štěpí složku 3b komplementu hostitele (C3b) a proteiny C4b a regulační faktor komplementu H. Kromě toho je Sapp2p schopen štěpit protein 5 související s faktorem H (FHR-5). Díky tomu jsou aspartátové proteázy v různých patogenních organizmech řazeny mezi hlavní faktory virulence (Singh a kol., 2019).

Lipázy jsou také klíčovými složkami zvyšujícími virulenci a patogenitu a jejich působení má téměř stejný účinek jako Sapp.

Sekretovaným lipázám zatím nebyl prokázán významný přínos kvasinkové virulenci a patogenitě, avšak diskutuje se o jejich přínosu při narušování membrán hostitelských buněk (Tóth a kol., 2019).

### 1.5.3.5. Stavba buněčné stěny

První kontakt při interakci hostitel-patogen je vždy mezi buněčnou stěnou patogenu a povrchovými receptory hostitelské buňky, ale zkoumání mechanizmu v tomto případě je poněkud náročné (Tóth a kol., 2019).

Buněčná stěna kandid se skládá z chitinové vrstvy potažené β-1,3-glukanů a β-1,6-glukanů, kterými pronikají vysoce glykované mannoproteiny pokryté relativně bohatou vrstvou mananu (Díaz-Jiménez a kol., 2012). V závislosti manosylace lze rozšířit mezi N-vázanými a O-vázanými manany, které ovlivňují adhezi a integritu buněčné stěny. Složení buněčné stěny u *C. albicans* a *C. parapsilosis* je podobné, avšak strukturně se liší. Zatímco u *C. albicans* jsou chitin a β-glukany blíž k plazmatické membráně, u *C. parapsilosis* jsou tyto proteiny exponovány na povrchu buňky, avšak u *C. parapsilosis* jsou N-vázané manany kratší než u *C. albicans*, což pomáhá zvýšit expozici vnitřních polysacharidů na buněčný povrch. Množství glykanu pod mananovou vrstvou je oproti *C. albicans* větší, což zase pomáhá zesílit a stabilizovat buněčnou stěnu. O-vázané manany jsou u *C. parapsilosis* přirozeně maskovány N-vázanými manany, což brání interakci s imunitními buňkami (Tóth a kol., 2019).

### 1.5.3.6. Metabolizmus mastných kyselin

Mastné kyseliny hrají nepostradatelnou roli při organizaci a údržbě buněčných membrán a různých intracelulárních kompartmentů. Jak nasycené mastné kyseliny, tak nenasycené mastné kyseliny udržují membránu pružnou, regulují metabolické procesy a slouží jako prekurzory pro širokou škálu komplexních makromolekul a jsou tedy pro kvasinku životně důležité.

Patogenní organizmy získávají mastné kyseliny *de novo* syntézou, která vyžaduje jak syntázy mastných kyselin (prodlužují mastné kyseliny), tak desaturázy (zavádějí dvojné vazby), nebo degradací vnějších zdrojů. Metabolismus mastných kyselin je nezbytný pro růst, patogenitu a virulenci kvasinek, neboť snižuje jejich citlivost na lidské sérum (Nguyen a kol., 2011).

Aby se zajistila ochrana proti gluko- a lipotoxicitě, vytvářejí buňky *C. parapsilosis* lipidové kapičky, které zabraňují hromadění mastných kyselin a volné glukózy v cytoplazmě v toxické koncentraci (Tóth a kol., 2019).

### 1.5.3.7. Produkce prostaglandinu

Mastné kyseliny také slouží jako prekurzory pro syntézu komplexních makromolekul, včetně imunomodulačních prostaglandinů. V hostiteli jsou prostaglandiny fyziologicky aktivní sloučeniny, které působí jako silné regulátory různých mechanismů, včetně zánětu, čímž zvyšují patogenitu (Noverr a kol., 2002). *C. parapsilosis* a *C. albicans* jsou schopny také produkovat prostaglandiny, a to z exogenních arachidonových kyselin (Tóth a kol., 2019).

# 2. Aminopeptidázy rodiny M28

## 2.1. Peptidázy

Peptidázy jsou obecně enzymy, které hydrolyticky štěpí peptidovou vazbu (Rawlings a kol., 2013).

Dělíme je podle místa štěpení, a to na endopeptidázy, které štěpí peptidový řetězec uprostřed a exopeptidázy, které působí na koncích peptidového řetězce. Exopeptidázy lze tudíž dělit na karboxypeptidázy štěpící peptid směrem od C-konce, aminopeptidázy štěpící peptid od N-konce a omegapeptidázy, které jsou schopné štěpit peptid z obou konců (James, 1994).

Dále je dělíme dle katalytických skupin v aktivním místě, a to na cysteinové (aktivní skupinou je -SH), serinové (-OH), aspartátové ($-COO^-$), threoninové peptidázy a metalopeptidázy ($Zn^{2+}$, $Co^{2+}$, …) (Kodíček, 2007).

Peptidázy jsou také děleny do klanů, jenž seskupují peptidázy mající jednoho společného evolučního předka. Klany jsou dále děleny do rodin, které tvoří podskupiny proteáz stejného klanu, které jsou si sekvenčně podobné buď v celé proteinové sekvenci, nebo pouze v katalytické doméně (Hecht a kol., 2014).

## 2.2. Metalopeptidázy

Metalopeptidázy jsou peptidázy obsahující dvojvazný kationt kovu (např. zinku, kobaltu, mědi, hořčíku nebo niklu), který aktivuje molekulu vody. Kovový iont je v molekule vázán několika aminokyselinovými ligandy, jimiž jsou His, Glu, Asp nebo Lys (Rawlings a kol., 2013).

Metalopeptidázy lze odlišovat počtem kovových iontů potřebných pro katalýzu. Běžně obsahují jeden katalytický kovový iont vázaný většinou třemi aminokyselinami. Méně často pak obsahují dva souběžně účinkující nebo „kokatalytické“ kovové ionty, které jsou vázány dohromady pěti aminokyselinami s tím, že jedna aminokyselina je vázána oběma kovovými ionty. Metalopeptidázy se dvěma katalytickými kovovými ionty jsou kromě HmrA exopeptidázy, zatímco metalopeptidázy obsahující pouze jeden katalytický kovový iont mohou

být exopeptidázy i endopeptidázy. HmrA peptidáza ze *S. aureus* je jedinou metalopeptidázou, která obsahuje dva kovové ionty a je endopeptidázou (Rawlings a kol., 2013).

Metalopeptidázy jsou rozčleněny do 14 klanů a zástupci jednotlivých klanů jsou pak rozděleni do rodin. Peptidázy klanů MA, MC, MD, ME, MJ, MM, MO, MP a MT obsahují jen jeden katalytický kovový iont. Peptidázy klanů MF, MG, MH, MN a MQ obsahují ještě kokatalytický kovový iont, kterým je v případě klanu MF iont $Zn^{2+}$ nebo $Mn^{2+}$ a v případě klanů MG a MQ je to iont $Mn^{2+}$ nebo $Co^{2+}$ (Rawlings a kol., 2013).

Vzdálenost ligandů kovových iontů metalopeptidáz vytváří tzv. „short–long" vzorec, kdy první dva ligandy jsou vždy blízko u sebe a ten třetí, směřující k C-konci, má od nich větší vzdálenost (Rawlings a kol., 2013).

### 2.2.1. Klan MH

Klan MH obsahuje metalopeptidázy mající kromě jednoho zinečnatého iontu ještě jeden kokatalytický $Zn^{2+}$. Peptidázy spadající do tohoto klanu jsou dále rozděleny do čtyř rodin, a to M18, M20, M28 a M42. V rodinách M18 a M42 jsou hlavně aminopeptidázy a v rodinách M20 a M28 aminopeptidázy a karboxypeptidázy (Vallee a kol., 1990).

Některé rodiny obsahují tak odlišné sekvence, že byly zprvu zařazeny samostatně, než se přišlo na jejich vzájemný vztah a byly sloučeny do společné rodiny. Například aminopeptidázy nynější rodiny M28 byly dříve zařazeny samostatně v různých rodinách, a až později se přišlo na spojitost s kvasinkovou aminopeptidázou rodu *Streptomyces* (Barrett a kol., 1990).

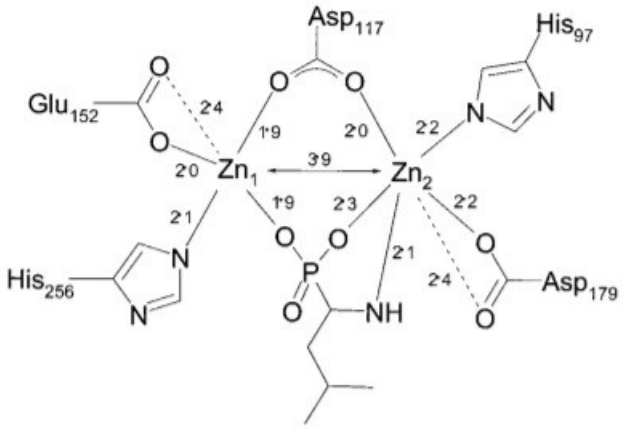
Terciární struktura byla stanovena u rodin M20 a M28. Ty zahrnují aminopeptidázy rodů *Vibrio* a *Streptomyces* z rodiny M28 a glutamátovou karboxypeptidázu rodu *Pseudomonas* z rodiny M20. Ligandy zinku se vyskytují ve shodných pozicích v HXD formaci (His-Xaa-Asp motiv) na konci řetězce, druhý zinkový ligand na začátku šroubovice a ostatní ligandy v neuspořádané oblasti. Pátý zinkový ligand je uvnitř dlouhé proměnlivé neuspořádané oblasti řetězce, díky čemuž je jeho identifikace u některých členů klanu MH obtížná (Rawlings a kol., 2013).

## 2.2.2. Rodina M28

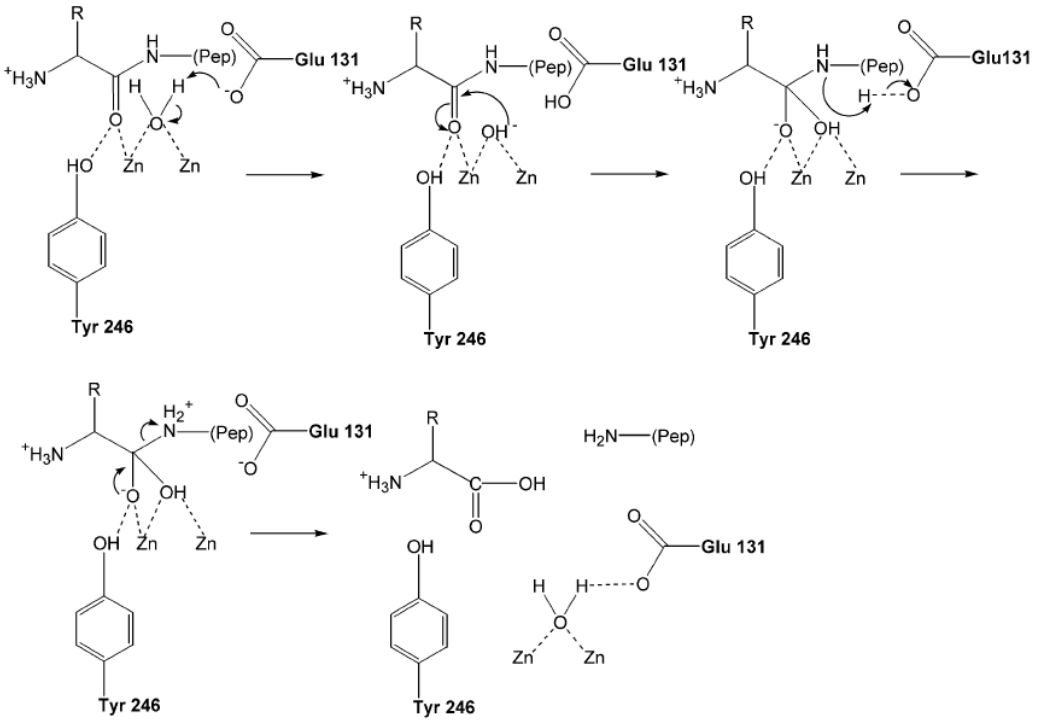
Tato rodina obsahuje aminopeptidázy druhů *Vibrio, Streptomyces, Escherichia* a *Saccharomyces* a je charakteristická přítomností dvou atomů zinku v aktivním místě a také tím, že do ní spadají jak aminopeptidázy, tak i karboxypeptidázy, což je neobvyklé (Ishito a kol., 1987).

Každý iont zinku je koordinován třemi ligandy – aminokyselinovými zbytky, které se podílejí na tvorbě aktivního místa – a aktivovanou molekulou vody. Atom zinku I a zinku II sdílí molekulu vody a kyselinu asparagovou (Asp). Na zinek I se dále váže histidin a kyselina glutamová. Na zinek II se váže histidin a kyselina asparagová nebo kyselina glutamová (viz *Obrázek 2*). Pravděpodobně hraje v katalýze roli ještě další molekula kyseliny asparagové a glutamové a tyrozin je zase pravděpodobně důležitý pro stabilizaci tranzitního stavu (viz *Obrázek 3*).

Aminopeptidázy v této rodině jsou popisovány jako aminopeptidázy štěpící leucin, nicméně jsou schopné odštěpit i další N-koncové aminokyseliny. Například aminopeptidázy IAP a Y odštěpují přednostně bazické aminokyseliny. Glutamátkarboxypeptidáza II zase štěpí přednostně kyselinu glutamovou a stejně tak jako plazmatická glutamátkarboxypeptidáza účinně štěpí dipeptidy (https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M28).




**Obrázek 2** Schéma aktivního místa metalopeptidáz rodiny M28 (Stamper a kol., 2001).




**Obrázek 3** Předpokládaná katalytická cesta aminopeptidázy kvasinky *Streptomyces griseus* (SGAP). Kyselý zbytek Glu131 aktivuje na zinek vázanou molekulu vody a další zbytek Tyr246 polarizuje karbonylový uhlík a stabilizuje tranzitní stav. Čárkované čáry označují stabilizační interakce a / nebo vodíkové vazby (Fundoiano-Hershcovitz a kol., 2004).

Obecnými inhibitory těchto enzymů jsou EDTA a 1,10-fenantrolin (https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M28), neboť se váží na zinečnatý iont, který je pro katalýzu nezbytný a vytváří s ním chelátový komplex (Hiršová, 2004). Aminopeptidázy jsou inhibovány bestatinem a amastatinem, zatímco glutamátová karboxypeptidáza II je inhibována substituovanými fosfonylglutamáty.

Co se týče terciární struktury, tak ta byla stanovena u aminopeptidázy S, glutamátkarboxypeptidázy II a aminopeptidázy Ap1, jejíž struktura je vzorová pro klan MH, do kterého patří právě rodina M28. Tyto peptidázy jsou poskládány do šestiřetězcového beta-skládaného listu obklopeného helixy (šroubovicemi). Tato struktura je podobná struktuře peptidáz v klanech MC a ML. Kvůli nestálému počtu a pozici kovových ligandů nelze předpokládat, že původním proteinem byla peptidáza, což bylo důvodem k dřívějšímu zařazení těchto peptidáz do různých klanů.

Rodina M28 je rozdělena na další podrodiny (viz *Tabulka 1*), jimiž jsou M28A, M28B, M28C, M28D, M28E a M28F. Do podrodin se řadí metalopeptidázy, které mají stejnou funkci jako reprezentativní peptidázy, nebo jejich homology (https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M28).

**Tabulka 1** Přehled rozřazení peptidáz rodiny M28 do jednotlivých podrodin. (převzato z https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M28 [online], upraveno, [cit. 2020-06-14])

| **Podrodina** | **Reprezentativní peptidáza příslušné podrodiny** | **Další vybrané peptidázy podrodiny** |
|---|---|---|
| **M28A** | Aminopeptidáza S (*Streptomyces cerevisiae*) | Aminopeptidáza Y, aminopeptidáza S |
| **M28B** | Glutamátová karboxypeptidáza II (*Homo sapiens*) | Glutamátová karboxypeptidáza III, CD71 |
| **M28C** | Aminopeptidáza IAP (*Escherichia coli*) | Aminopeptidáza AaaA |
| **M28D** | Aminopeptidáza ES–62 (*Acanthocheilonema viteae*) | Karboxypeptidáza Q |
| **M28E** | Aminopeptidáza Ap1 (*Vibrio proteolyticus*) | Aminopeptidáza AC |
| **M28F** | Peptidáza YwaD (*Bacillus subtilis*) | Aminopeptidáza AM-1 |

### 2.2.2.1. Aminopeptidáza Y

Aminopeptidáza Y, též označovaná jako APE3 nebo APY, spadá do podrodiny M28A. Její název značí to, že se jedná o aminopeptidázu kvasinek (aminopeptidase of yeast), v tomto případě konkrétně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Je vysoce účinnou peptidázou nacházející se ve vakuolách kvasinek (Jones a kol., 1984).

Strukturně se jedná o 70kDa jednořetězcový protein obsahující PA (protease-associated) doménu. Obsahuje celkem 537 aminokyselin. Prvních 21 aminokyselin N-konce tvoří hydrofobní úsek, který má funkci signálního peptidu. Dalších 35 pak tvoří propeptidovou část, po jejímž oddělení zůstane samotný protein tvořený sekvencí zbylých 481 aminokyselin (https://www.uniprot.org/uniprot/P37302; Rawlings a kol., 2013).

APE3 hydrolyzuje mnohem rychleji dipeptidyl-NHMec nebo oligopeptidy než aminoacyl-NHMec. Nejcitlivějšími substráty jsou Arg-NHMec a Lys-NHMec. Při testování se přidává kobalt, jakožto efektivní aktivátor, a to v koncentraci 0,25 mM. Je však zajímavé, že když je jako aktivátor hydrolýzy aminoacyl-NHMec použit právě kobalt, tak dochází k inhibici hydrolýzy substrátů větších, než jsou tripeptidy nebo delších, než dipeptidyl-NHMec při $IC_{50}$ okolo 0,1 mM (Yasuhara a kol., 1994).

Aminopeptidáza Y je aktivována cerevisinem (Yasuhara a kol., 1994), který zpracovává její propeptid na hydrolytickou (aktivovanou) formu (https://www.uniprot.org/uniprot/P09232).

Jako inhibitory jsou vhodné chelátotvorné látky jako 1,10-fenantrolin, EDTA a DDT nebo aminopeptidázově specifické inhibitory bestatin či amastatin (Ferraris a kol., 2012).

### 2.2.2.2. Glutamátkarboxypeptidáza II

Glutamátkarboxypeptidáza II (GCPII) je zinková metalopeptidáza, která hydrolyzuje N-acetylaspartylglutamát (NAAG) na N-acetylaspartát (NAA) a glutamát v nervovém systému. Inhibice GCPII má potenciál redukovat extracelulární glutamát a představuje vhodný cíl pro léčení neurologických poruch, u nichž je nadbytek glutamátu považován za patogenní (Ferraris a kol., 2012). GCPII se používá v protilátkově zaměřené enzymové léčebné terapii (ADEPT) ke katalýze tvorby aktivního léčiva z inertního proléčiva. Před podáním proléku musí být inhibován volný GCPII v krevním řečišti, aby se zabránilo systémové reakci u pacienta (Jeyaharan a kol., 2018). Bylo také zjištěno, že GCPII je identická s nádorovým markerem,

membránovým antigenem specifickým pro prostatu (PSMA), díky čemuž se stala významnou na poli diagnostiky v onkologii (Ferraris a kol., 2012).

Během posledních 15 let bylo vynaloženo obrovské úsilí při objevování silných inhibitorů GCPII, zejména inhibitorů se skupinami vázajícími zinek na bázi fosforu, močoviny a thiolu. Kromě toho bylo dosaženo významného pokroku v chápání trojrozměrných strukturních charakteristik GCPII v komplexu s různými ligandy (Ferraris a kol., 2012).

### 2.2.2.3. Glutamátkarboxypeptidáza III

Glutamátkarboxypeptidáza III (GCPIII) je nejlépe známá jako homolog glutamátkarboxypeptidázy II. V roce 2011 přišel Collard a spol. na to, že myší GCPIII štěpí β-citrylglutamát (BCG) na citrát a glutamát. Ke štěpení pomocí GCPII ovšem nedochází, což naznačuje, že GCPIII nepůsobí pouze jako komplementární enzym ke GCPII, ale pravděpodobně má i specifickou fyziologickou funkci související s metabolismem BCG v lidském těle. Je zajímavé, že účinnost štěpení NAAG (N-acetylaspartylglutamátu) vs. BCG pomocí GCPIII je závislá na typu kovu. Přítomnost iontů zinku nebo manganu usnadňuje štěpení NAAG a přítomnost iontů vápníku nebo manganu usnadňuje štěpení BCG. Předpokládá se, že schopnost GCPIII štěpit BCG v přítomnosti specifických kovových iontů může být způsobena nahrazením jednoho z jeho dvou aktivních iontů zinku těmito kovy (Navrátil a kol., 2016).

### 2.2.2.4. Aminopeptidáza S

Aminopeptidáza ze *Streptomyces griseus* (SGAP) je metalopeptidáza aktivovaná vápníkem, která obsahuje 2 molekuly zinku. Tato aminopeptidáza rychle hydrolyzuje peptidové vazby tvořené N-koncovými hydrofobními aminokyselinami, jako je leucin, methionin a fenylalanin. Byla stanovena primární struktura proteinu, jenž obsahuje 284 zbytků aminokyselin, což odpovídá molekulové hmotnosti 30 kDa (Maras a kol., 1996). Díky malé velikosti, vysoké aktivitě a tepelné stabilitě je SGAP velmi atraktivním enzymem pro různé biotechnologické aplikace, mezi něž patří zpracování rekombinantních DNA proteinů a fúzních proteinových produktů. Bylo zjištěno, že několik volných aminokyselin, jako je fenylalanin, leucin a methionin, působí jako slabé inhibitory SGAP, a proto byly vybrány pro strukturální studie. Tyto inhibitory lze potenciálně považovat za analogy produktů, protože jedním

z produktů získaných normální enzymatickou reakcí je odštěpená aminokyselina na konci substrátu (Gilboa a kol., 2001).

### 2.2.2.5. AaaA aminopeptidáza

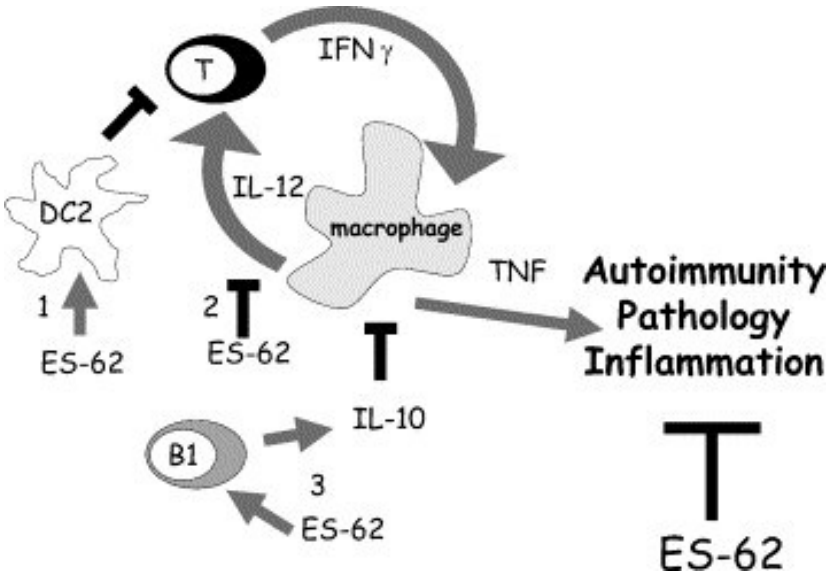
Aminopeptidáza AaaA (arginine-specific autotransporter of *P. aeruginosa*) je jiným názvem autotransportér PA0328. Autotransportéry patří do největší rodiny sekretovaných proteinů v gramnegativních bakteriích a jsou významnými virulentními faktory. Autotransportér PA0328 je kódovaný bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a je specifický pro arginin. AaaA poskytuje výhodu v prostředích, kde jsou jediným zdrojem dusíku peptidy s N–koncovým argininem, což by mohlo být důležité pro stanovení infekce, protože nedostatek AaaA vede k oslabení myší s chronickou infekcí rány, která korelovala s nižšími hladinami cytokinů TNFα, IL-lα, KC a COX-2. V důsledku toho je AaaA považována za důležitý faktor virulence, který hraje významnou roli při úspěšném stanovení infekcí *P. aeruginosa* (Luckett a kol., 2012).

### 2.2.2.6. Karboxypeptidáza Q

Karboxypeptidáza Q, nebo také lidská plazmatická glutamátkarboxypeptidáza (PGCP) je proteináza, která působí na nesubstituované N- a C-konce dipeptidů. Strukturně je tato karboxypeptidáza homodimerní glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 100 kDa. Předpokládá se, že se PGCP podílí ve štítné žláze na uvolňování hormonu tyroxinu z tyreoglobulinu (Zajc a kol., 2011). Tyroxin je významný hormon, který vychytává jód z organizmu, řídí oxidaci a látkovou přeměnu živin, má vliv na funkci nervového systému a pohlavních žláz a ovlivňuje tvorbu thyreotropního hormonu TSH (Trojan a kol., 2003). Dále bylo zjištěno, že je aktivita PGCP zvýšená u pacientů s hepatocelulárním karcinomem infikovaných virem hepatitidy C, díky čemuž se stává dobrým kandidátem na diagnostický marker. Kromě toho ukazují studie na laboratorních potkanech, že se PGCP podílí i na regeneraci jater (Zajc a kol., 2011).

### 2.2.2.7. Aminopeptidáza ES-62

Aminopeptidáza ES-62 je exkrečně–sekrečním enzymem, který vylučují hlístice *Acanthocheilonema viteae*. Tyto hlístice žijí ve tkáních a vylučují právě enzym ES-62, jenž nese na svých N-glykanových strukturách jeden až čtyři PC (fosfocholinové) zbytky, které mají silné imunomodulační schopnosti (van Die a kol., 2010) viz *Obrázek 4*.




**Obrázek 4** Imunomodulační účinky aminopeptidázy ES-62: 1) ES-62 je schopen indukovat zrání dendritických buněk, které indukují $T_H2$ (protizánětlivý fenotyp T-buněk) a odvádět imunitní odpovědi pryč od $T_H1$ (prozánětlivý fenotyp T-buněk); 2) makrofágy vystavené ES-62 jsou odolné vůči indukci prozánětlivé odpovědi následnými stimuly; 3) ES-62 indukuje produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 z B1 lymfocytů, což působí na potlačení zánětu a polarizaci imunitních odpovědí. *(Harnett a kol., 2004)*

## 2.3. PA doména

PA doména je část enzymu zodpovědná za vazbu rozpustných proteinů. To lze usuzovat díky několika důvodům: 1. Prostřednictvím PA domény jsou propojeny dva transportní receptory BP-80 a transferinový receptor, což naznačuje, že tato doména je zodpovědná za jejich zachování funkce, tj. vázání rozpustných proteinů. 2. Navrhovaný model vazby transferinu k jeho receptoru používá pro vazbu velký úsek PA domény. 3. Na subtilázách se ukazuje, že PA doména je určujícím faktorem pro proteázovou specificitu, nicméně její přítomnost není pro katalytickou aktivitu nezbytná. V delečním mutantu proteázy vnější obálky *Lactoccocus lactis* se relativní množství rozpadových produktů substrátů $\alpha_{s1}$ a $\beta$ kaseinu změnilo ve srovnání s molekulami „divokého typu“ (tzn. bez mutace), ale obecný vzorec štěpení zůstal stejný. To naznačuje, že mutant byl aktivní napříč všemi štěpnými místy v kaseinu, ale s odlišnou účinností (Mahon a kol., 2000).

# 3. Experimentální část

## 3.1. Materiál a přístroje

### 3.1.1. Buněčný materiál

- *Candida albicans*, laboratorní kmen SN78
- *Candida parapsilosis*, klinický izolát P69 z mykologické sbírky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
- *Escherichia coli* DH5α
- *Escherichia coli* BL21 (DE3)

### 3.1.2. Tekuté půdy a agary

- YPD (yeast extract, peptone, dextrose; Sigma Aldrich)
- LB (Lauria-Bertani) agar (Sigma)
- LB agar s kanamycinem
- LB tekutá půda
- LB tekutá půda s kanamycinem

### 3.1.3. Sady (kity)

- In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech)
- Zippy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymoresearch)

### 3.1.4. Přístroje

- analytická digitální váha
- Bunsenův kahan
- centrifuga
- digitální váha
- hmotnostního spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific)
- chladnička
- instrumentace na elektroforézu (zdroj)
- mikrovlnná trouba
- mraznička
- spektrofotometr
- Termocykler Biometra
- termostat
- termostatovaná třepačka BIOSAN
- třepačka VORTEX
- ultrazvukový sonikátor (homogenizátor)
- UV lampa
- výrobník ledu

### 3.1.5. Ostatní chemikálie a roztoky

- 1kb DNA Ladder marker
- 1x koncentrovaný TBE pufr
- 60% kyselina octová
- 70% a 95% etanol
- APS (persíran amonný)
- agaróza
- bis-akrylamid
- Coomassie Brilliant Blue
- EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina) Sigma Aldrich
- EmeraldAmp GT PCR Master Mix

- ethanol
- ethidium bromid
- glycin
- glycerol
- IPTG (isopropyl β-d-1-thiogalaktopyranosid)
- lysozym
- merkaptoetanol
- močovina
- NaCl
- NaOAc
- PCI (fenol-chloroform-isoamylalkohol 25:24:1, saturovaný 10 mM Tris-Cl pH 8 a 1 mM
- PPP Master Mix
- SDS (dodecylsíran sodný)
- TEMED (Tetramethylethylendiamin)
- Tris-Cl
- TRITON

### 3.1.6. Ostatní materiál

- 1,5 ml mikrozkumavky typu Eppendorf
- 200 µl tenkostěnné mikrozkumavky pro PCR
- dialyzační střevo (cut-off 8-10 kDa)
- elektroforetická vana
- Erlenmayerovy baňky
- jednorázové sterilní šroubovací zkumavky 15 ml a 50 ml
- kádinky
- latexové a nitrilové rukavice
- L-hokejky
- lžička
- odměrné válce
- pipety Eppendorf
- plastové Petriho misky
- skleněné korálky SIGMA (400-600 µm)
- skleněné Petriho misky

## 3.2. Metodika

### 3.2.1. Strategie přípravy vektorů pro expresi aminopeptidáz APE3

Požadované verze proteinu, který jsme chtěli rekombinantním způsobem připravit, jsou celkem čtyři. Jsou to verze aminopeptidázy Ape3. Náš cíl byl stanovit protokol pro přípravu rekombinantního proteinu Ape3 kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis.* Od každého organizmu jsme požadovali verzi s his-kotvou (histagem) a verzi bez his-kotvy, takže byly celkem 4 požadované varianty proteinu, a to CaApe3p obsahující his-kotvu, CpApe3p obsahující his kotvu, CaApe3p bez his-kotvy a CpApe3 bez his-kotvy. Po konzultaci se spolupracující laboratoří jsme se rozhodli pro umístění his-kotvy na N-konec a stop kodon na C-konec. V potaz jsme brali i přítomnost signálního peptidu, který je podle databáze SignalP kódovaný 19 aminokyselinami, což je však pouze predikce na základě podobností.

### 3.2.2. Design primerů

Nezbytnou součástí návrhu konkrétní polymerázové řetězové reakce (PCR) je navržení vhodných primerů. Rozdělujeme je na přímý („forward“) primer a reverzní („reverse“) primer. „Forward“ primer se čte od 5‘ konce k 3‘ konci. „Reverse“ primer se čte od 3‘ konce k 5‘ konci. Tyto primery by měly splňovat jakési základní podmínky. Měly by být ideálně 15-25 párů bazí dlouhé, zastoupení C≡G a A=T párů by mělo být přibližně 1:1 a pokud možno by primery neměly obsahovat části, které jsou mezi sebou komplementární, ať už uvnitř jednoho primeru nebo mezi oběma primery navzájem. Taktéž by neměl být ani jeden primer podobný jiné části DNA, než pro kterou je určen. Při zanedbání těchto podmínek by se totiž snížila pravděpodobnost navázání primeru na správném místě a mohlo by se stát, že PCR neproběhne správně.

Při navrhování primerů pro metodu in-fusion klonování (viz *obrázek 5*), kdy se vkládá inzert (určitá část jedné DNA) do vektoru (do jiné DNA), je třeba navrhnout primery tak, aby splňovaly výše uvedené podmínky a zároveň obsahovaly potřebné části shodné s inzertem i s vektorem. „Forward“ primer by měl obsahovat 3´ část linearizovaného vektoru a 5´ část inzertu, zatímco „reverse“ primer by měl obsahovat 3´ část inzertu a 5´ část linearizovaného vektoru. Přesahy by měly být ideálně 15 párů bazí z inzertu a 15 párů bazí z vektoru, tudíž

bychom měli primer o velikosti 30 párů bazí. Při kroku zvaném ligace pak lze vnést inzert dovnitř vektoru právě díky těmto shodným částem.

Pro náš experiment bylo zapotřebí vytvořit šest primerů. „Forward“ primer pro variantu CaAPE3 s his-kotvou, „forward“ primer pro variantu CaAPE3 bez his-kotvy, „forward“ primer pro variantu CpAPE3 s his-kotvou, „forward“ primer pro variantu CpAPE3 bez his-kotvy a po jednom „reverse“ primeru pro variantu CaAPE3 a variantu CpAPE3, neboť „reverse“ primery jsou stejné pro varianty s his-kotvou i bez něj.

Abychom mohli navrhnout primer, tak je třeba znát sekvence genů aminopeptidáz *APE3* jak pro *C. albicans*, tak i pro *C. parapsilosis*. Tyto sekvence jsme získali skrze databázi CGD. Dál je třeba mít vhodný vektor, ideálně plasmid, jehož sekvence DNA je známá a nacházejí se v něm restrikční místa, díky kterým ho budeme moci rozštěpit, čímž nám vznikne mezera pro vložení inzertu obsahující kódující sekvenci aminopeptidázy *Ape3*. Jako vektor jsme tudíž zvolili komerční vektor pET28b.

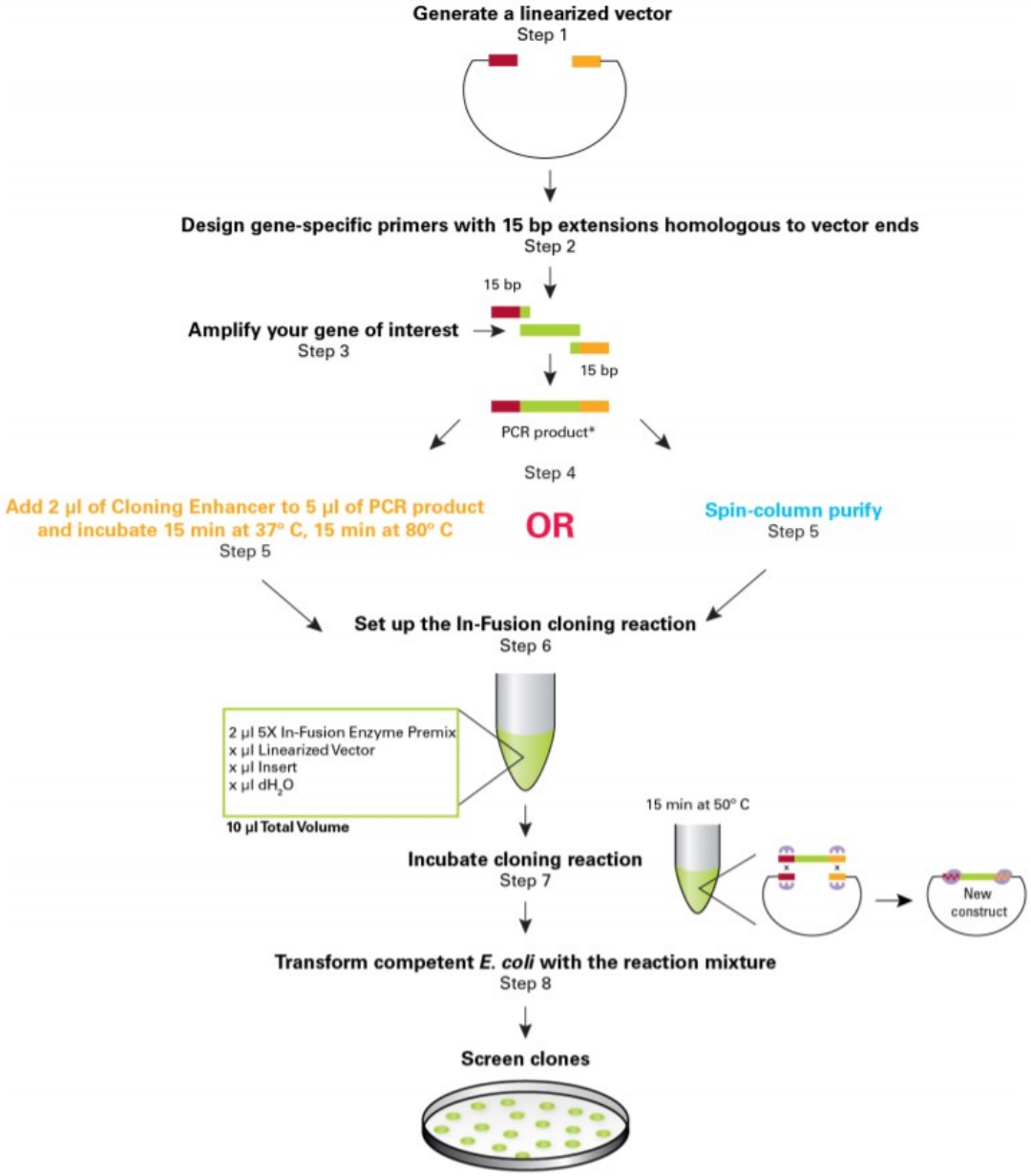
Při samotném navrhování primerů jsme zkusili použít aplikaci Primer BLAST, volně dostupnou na databázi NCBI, avšak tato aplikace nám vhodné primery nenašla. Ty, které nám tato aplikace nabídla byly buď velmi krátké nebo příliš dlouhé anebo byl délkový nepoměr mezi částmi shodnými s vektorem vůči těm obsaženým v inzertu. Proto jsme se rozhodli si primery navrhnout ručně pomocí programu Primer BLAST, jenž je jedním z nástrojů NCBI (National Center for Biotechnology Information) a pak jsme si výsledné návrhy pouze překontrolovali v aplikaci Multiple Primer Analyzer, volně dostupné na internetových stránkách Thermo Fisher Scientific (viz Tabulka 2 a 3).

**Tabulka 2:** Design primerů pro přípravu CaAPE3 *(černá část odpovídá polilinkeru pET28b, modrá část odpovídá genu CaAPE3).*

| Název | sekvence 5´-3´ | Tm |
|---|---|---|
| CaAPE3-His-F | CCGCGCGGCAGC**CAA**CCAACTTCTTTTGGAT | 84.8 |
| CaAPE3-His-R | AGTCATGCTAGC**CATA**TTACATAATCAACTTGG | 69.2 |
| CaAPE3-F | TAAGAAGGAGATATA***CATG***CCAACTTCTTTTGGAT | 70.8 |

**Tabulka 3:** Design primerů pro přípravu CpAPE3 *(černá část odpovídá polilinkeru pET28b, zelená část odpovídá genu CpAPE3).*

| Název | sekvence 5´-3´ | Tm |
|---|---|---|
| CpAPE3-His-F | CGCGCGGCAGC**CAGTTC**CCAACTTTAAAGT | 81.3 |
| CpAPE3-His-R | AGTCATGCTAGC**CATA**CTAAATCACATACAAA | 67.7 |
| CpAPE3-F | TAAGAAGGAGATATA***CATG*****TTC**CCAACTTTAAAGT | 67.5 |




**Obrázek 5** Schéma in-fusion klonování (převzato z návodu - http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/In-Fusion_HD_Cloning_Kit_121416.pdf)

### 3.2.3. Izolace DNA

Při získávání (izolaci) kandidí DNA jsem nechal jednotlivé kmeny přes noc kultivovat v tekutém YPD médiu. To jsem následně odstředil, promyl a rozpustil v extrakčním činidle, poté přidal PCI a nechal 5 minut kultivovat. Následně jsem přidal korálky firmy Sigma a zvortexoval. Vodnou fázi jsem odebral, přidal do ní octan sodný a ethanol, promíchal a nechal inkubovat v mrazničce. Vznikla sraženina, kterou jsem odstředil a peletu jsem promyl v ethanolu, nechal vyschnout a resuspendoval ve sterilní vodě, čímž jsem připravil požadovaný roztok obsahující rozpuštěnou kandidí DNA.

### 3.2.4. Amplifikace genů kódujících aminopeptidázy

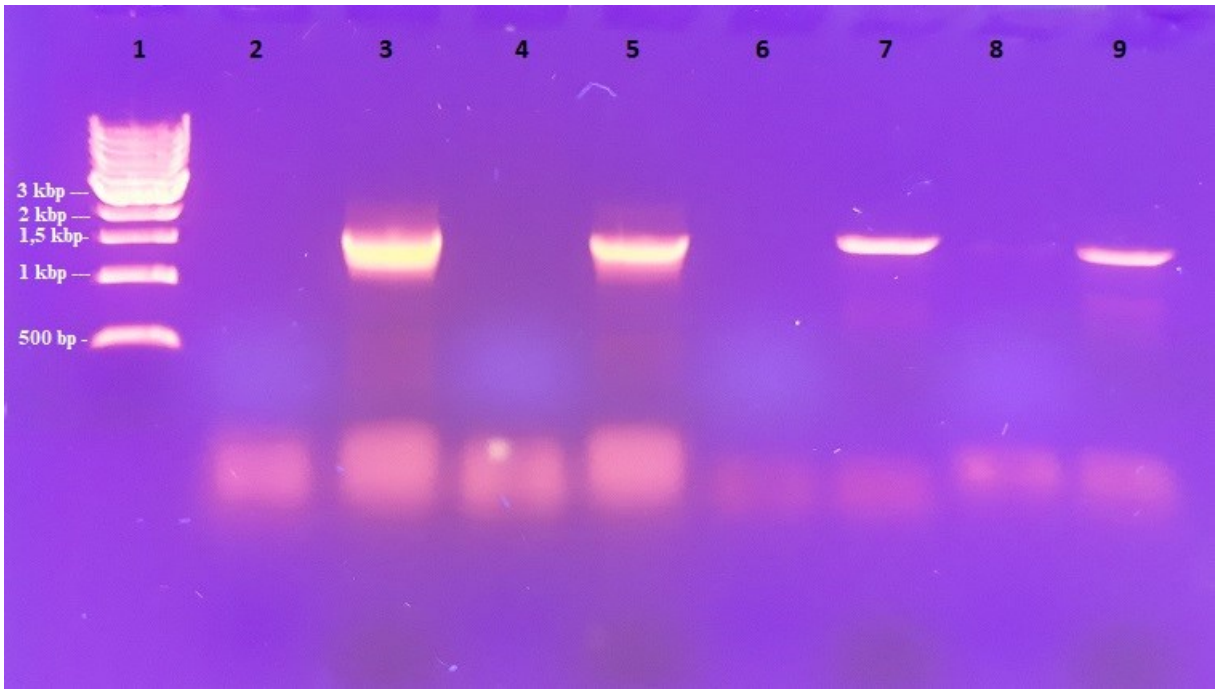
K amplifikaci genu slouží metoda PCR. Směs pro PCR jsem připravil tak, že jsem smíchal 20 µl PCR vody, 1 µl příslušné templátové DNA, příslušnou kombinaci primerů po 2 µl a 25 µl Master mixu pro PCR.

Amplifikaci genu *Ape3* jsem provedl pomocí námi navržených primerů metodou PCR. Byly provedeny dvě verze s použitím různých PCR master mixů – PPP Master mix a EmeraldAmp GT PCR Master mix.

Pro PCR jsme na termocykléru zvolili následující program:

| | | |
|---|---|---|
| 1. | 95 °C | 01:00 (m:s) |
| **35x** | 98 °C | 00:10 (m:s) |
| | 42 °C | 00:35 (m:s) |
| | 72 °C | 01:45 (m:s) |
| 5. | 72 °C | 02:00 (m:s) |
| 6. | 6 °C | 60:00 (m:s) |

Podle tohoto výsledku lze říct, že PPP Master Mix nebyl účinný, a tudíž ani vhodný pro tento experiment, a to ani při testování jiných PCR programů s upravenými teplotami (přesně podle návodu od výrobce PPP Master Mixu). Při použití EmeraldAmp GT PCR Master Mixu byl výsledek pozitivní.




**Obrázek 6** Elektroforéza APE3 na 1% agarózovém gelu. *1. Marker 1kb DNA Ladder, 2. CaAPE3his (PPP Master Mix), 3. CaAPE3his (EmeraldAmp GT PCR Master Mix), 4. CaAPE3 (PPP Master Mix), 5. CaAPE3 (EmeraldAmp GT PCR Master Mix), 6. CpAPE3his (PPP Master Mix), 7. CpAPE3his (EmeraldAmp GT PCR Master Mix), 8. CpAPE3 (PPP Master Mix), 9. CpAPE3 (EmeraldAmp GT PCR Master Mix)*

### 3.2.5. Konstrukce expresních vektorů a minipreparace plasmidové DNA

Školitelka provedla ligaci. Já následně provedl transformaci připravených vektorů do buněk DH5α, naočkoval je na LB agar obsahující kanamycin (1 μmol/l) a nechal přes noc při 37 °C kultivovat. Druhý den přeočkovala školitelka několik kolonií do jednotlivých zkumavek. V jedné zkumavce byla zaočkována vždy jen jedna kolonie. Znovu se nechaly kultivovat a následující den jsem provedl minipreparaci plasmidové DNA (dle návodu od výrobce kitu Z ippy™ Plasmid Miniprep Kit od firmy Zymoresearch. Jednotlivé Miniprepy jsem testoval pomocí PCR s použitím navržených primerů a následné elektroforézy. MINIprepy obsahující gen přibližně ve velikosti očekávaného produktu poslala školitelka na sekvenaci do firmy GATC.

### 3.2.6. Transformace a kultivace

Sekvenací potvrzené vzorky s plazmidy obsahujícími požadovaný gen jsem natransformoval do buněk BL-21 (DE3) a dal je přes noc kultivovat.

### 3.2.7. Exprese aminopeptidáz v *E. coli*

Pro expresi jsme zvolili systém v buňkách *Escherichia coli*, a to konkrétně systém T7 (*E. coli* BL-21 (DE3)), který obsahuje T7 promotor a gen kódující T7 polymerázu indukovanou IPTG. Vytvářený protein by se pak měl v tomto expresním systému ukládat do takzvaných inkluzních tělísek vznikajících uvnitř buňky.

Pro expresi při 27 °C jsem připravil buněčnou směs s $OD_{600}$ = 0,77. Pro expresi při 32 °C jsem připravil buněčnou suspenzi s $OD_{600}$ = 0,68 a pro expresi při 37 °C jsem připravil buněčnou suspenzi s $OD_{600}$ = 0,65.

Všechny exprese probíhaly v termostatované třepačce při 130 rpm. Koncentrace IPTG byla ve všech případech 1 μmol/l.

### 3.2.8. Izolace a solubilizace inkluzních tělísek

Po ukončení exprese jsem zcentrifugoval buněčnou suspenzi a získanou peletu jsem poté resuspendoval ve 30 ml lyzačního pufru (0,1M Tris-Cl; pH 7,4; 150mM NaCl; lysozym 1 mg/g pelety). Následně jsem suspenzi dal přes noc do mrazničky (-20 °C). Další den jsem po rozmražení suspenzi sonikoval v 15 intervalech 7-10 sekund a 15-ti sekundovou pauzou mezi jednotlivými intervaly. Poté jsem suspenzi zcentrifugoval (9000 g / 15 minut). Supernatant jsem odebral jako vzorek „CYTOSOL“, který by případně obsahoval rozpuštěný protein. Peletu vzniklou odstředěním jsem 2x promyl v promývacím pufru (100mM Tris-Cl pH 7,0; 2M urea; 5mM EDTA; 2% triton). Výslednou peletu jsem rozdělil na dvě stejně velké části, z nichž jsem jednu část resuspendoval v 10 ml dilučního pufru (50mM Tris-Cl pH 8; 8M urea; 1mM glycin; 1mM EDTA; 100mM merkaptoetanol) a dialyzoval v 500 ml dialyzačního pufru (20mM Tris-Cl pH 7,2; 150mM NaCl). Druhou část jsem resuspendoval v 10 ml 60% kyselině octové a následně dialyzoval v 500 ml destilované vody. V obou případech jsem dvakrát s odstupem 16 h vyměnil dialyzační roztoky.

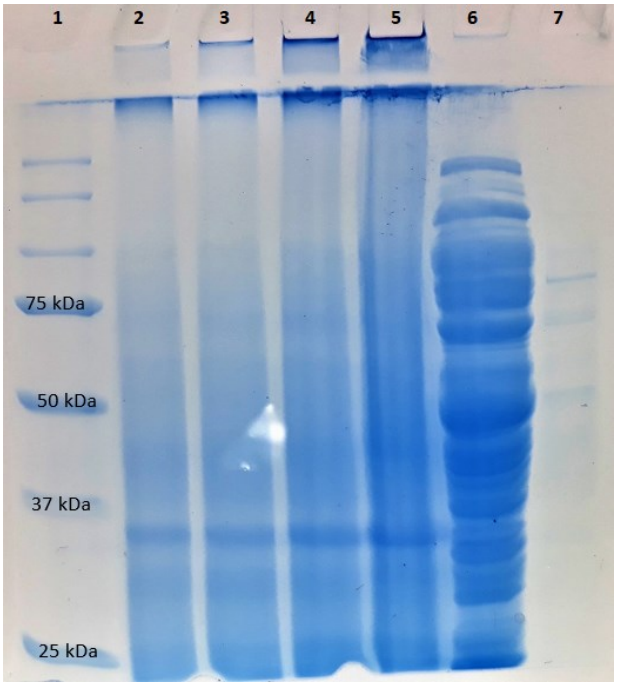
Během dialýzy se v dialyzačních střevech vytvořilo malé množství sraženiny, kterou jsem odstředil, vyvařil ve vzorkovacím pufru, obarvil gel barvou Coomassie Blue a následně jsem vizuálně porovnal obsah proteinu rozpuštěného v supernatantu (S) oproti vysráženému proteinu (P). Porovnával jsem také rozdíl efektivity při rozpouštění proteinu v 8M močovině (U) a v 60% kyselině octové (HAc) viz *Obrázek 11*.

### 3.2.9. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza

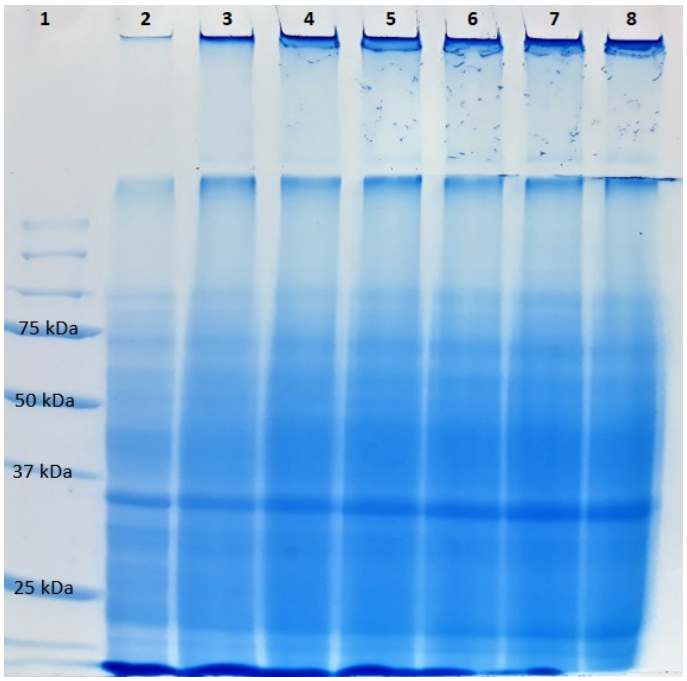
Pro zjištění přítomnosti nebo nepřítomnosti a lokalizace požadovaného proteinu je třeba provést elektroforézu. V tomto případě je nejvhodnější SDS gelová elektroforéza.

Připravil jsem 12% gel a použil jsem marker Precision Plus Protein$^{TM}$ Standards 10-250 kD od firmy BIO RAD. Vzorky jsem připravil povařením ve vzorkovacím pufru po dobu 6 minut.

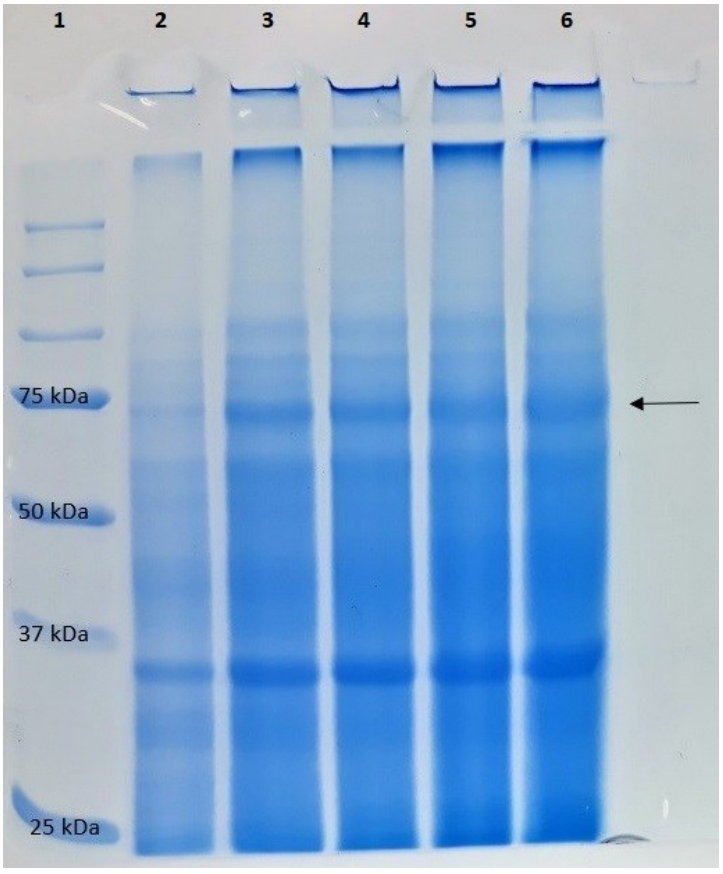
Na *Obrázku 7-10* jsou naneseny vzorky buněčných pelet rozvařených ve vzorkovacím pufru. Tyto vzorky prozrazují případnou přítomnost a efektivitu exprese rekombinantního proteinu.



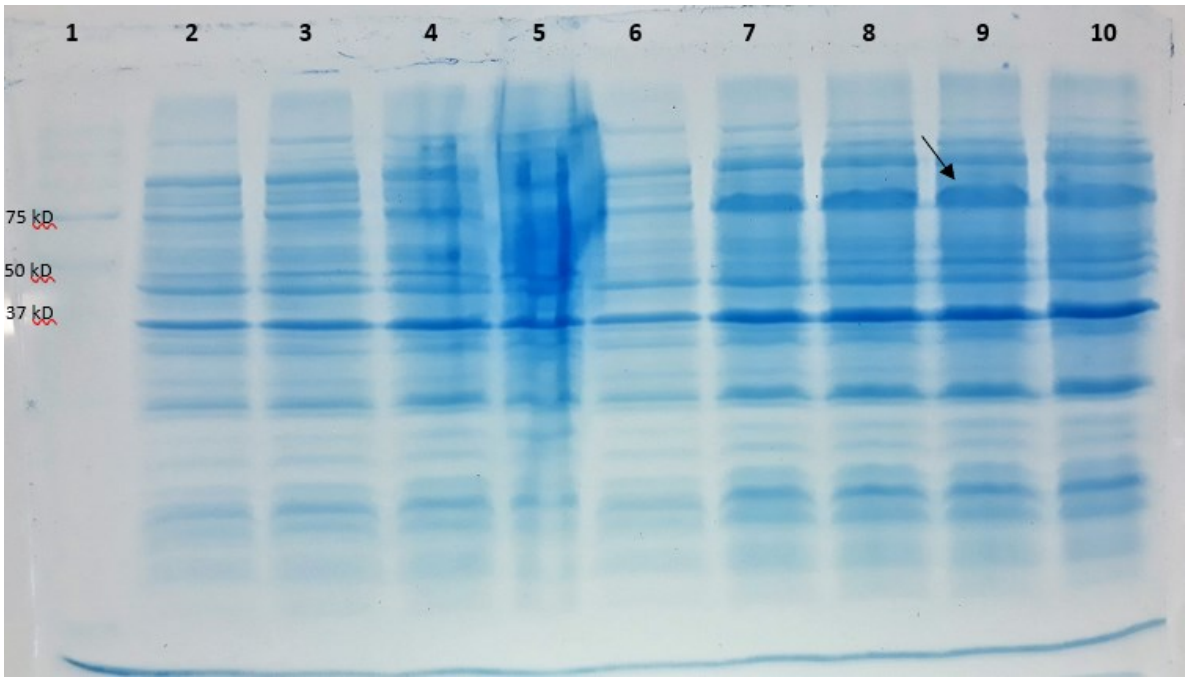

**Obrázek 7** SDS-PAGE CaApe3p – exprese při **27 °C**; 12% gel: *1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein$^{TM}$ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (3 h po indukci IPTG), 6. CaAPE3his (4 h po indukci IPTG), 7. CaAPE3his (vzorek CYTOSOL), 8. CaAPE3his (vzorek LB média), 9.-10. (prázdné jamky); (jamky číslovány zleva doprava)*



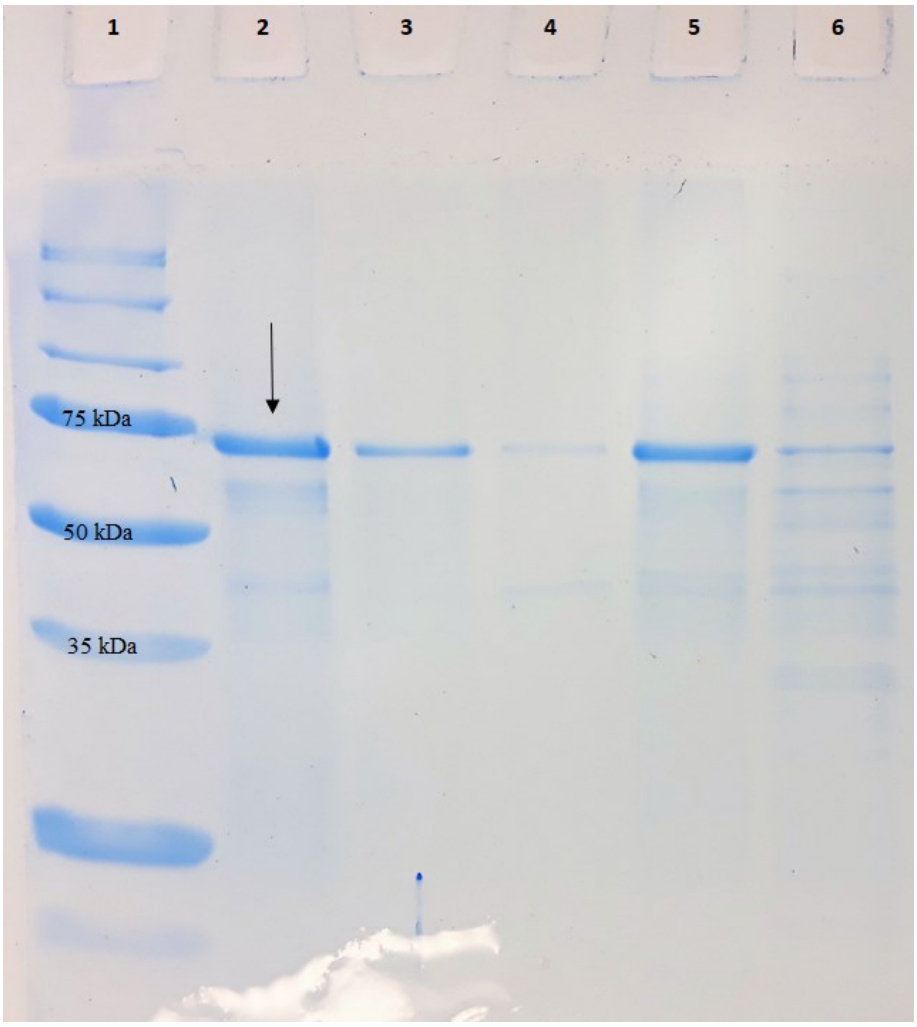

**Obrázek 8** SDS-PAGE CaApe3p – exprese při **32 °C**, 12% gel: *1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (3 h po indukci IPTG), 6. CaAPE3his (4 h po indukci IPTG), 7. CaAPE3his (5 h po indukci IPTG), 8. CaAPE3his (6 h po indukci IPTG)*




**Obrázek 9** SDS-PAGE CaApe3p – exprese při **37 °C**, 12% gel: *1. Marker 10-250kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (3 h po indukci IPTG), 6. CaAPE3his (4 h po indukci IPTG)*




**Obrázek 10** SDS-PAGE CaApe3p, 12% gel - Porovnání exprese při 27 °C a při 37 °C vedle sebe: *1. Marker 10-250kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (před indukcí), 3. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 4. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 5. CaAPE3his (18 h po indukci IPTG), 6. CaAPE3his (před indukcí), 7. CaAPE3his (1 h po indukci IPTG), 8. CaAPE3his (2 h po indukci IPTG), 9. (3 h po indukci IPTG), 10. CaAPE3his (4 h po indukci IPTG); (jamky číslovány zleva doprava); jamky 2-5 obsahují vzorky z průběhu exprese při 27 °C, jamky 6.-10 obsahují vzorky z průběhu exprese při 37 °C.*




**Obrázek 11** SDS-PAGE (12% gel) - Porovnání rozpouštění inkluzí v 60% kyselině octové (HAc) a v 8M močovině (U): *1. Marker 10-250kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. CaAPE3his (S, HAc), 3. CaAPE3his (P, HAc), 4. CaAPE3his (LB médium), 5. CaAPE3his (S, U), 6. CaAPE3his (P, U), 7. CaAPE3his (S, HAc)*

Na základě SDS-PAGE lze říct, že optimální teplota pro expresi je 37 °C, viz *Obrázek 10*, kde je porovnání exprese při 27 °C a při 37 °C. V oblasti odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 70 kDa, což je oblast, ve které by se měl nacházet požadovaný konstrukt APE3p, je zřetelný nárůst množství proteinu. Pro potvrzení, že se jedná opravdu o protein zájmu, byla provedena MS analýza.

### 3.2.10. MS analýza

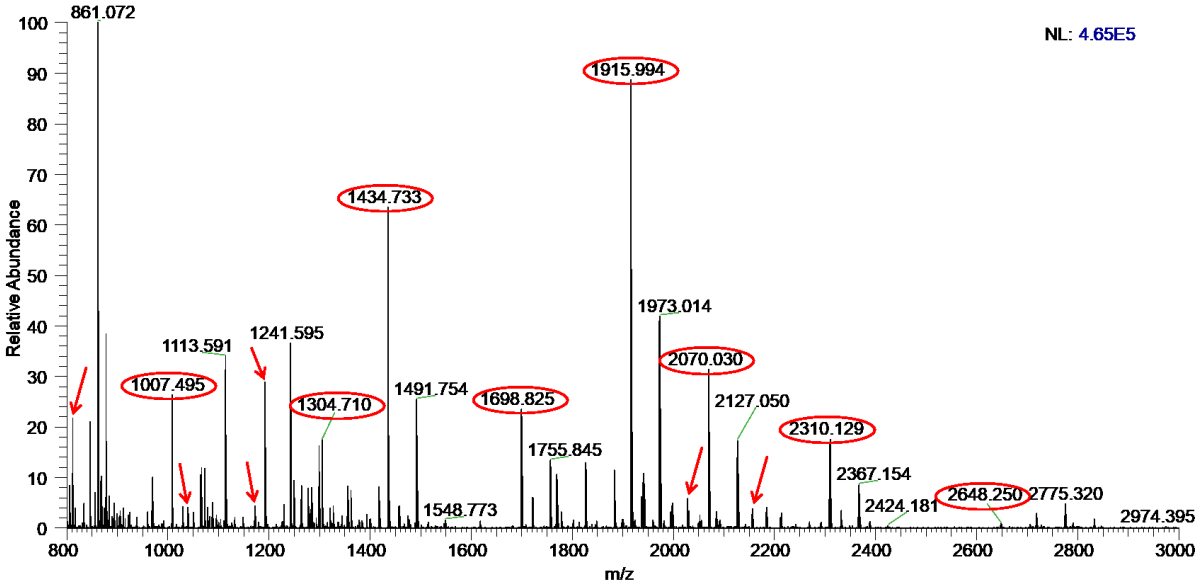
Příprava vzorku, analýza pomocí hmotnostní spektrometrie a vyhodnocení experimentálních dat bylo provedeno na Katedře biologických a biochemických věd (Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice). Výsledky byly následně poskytnuty do bakalářské práce.

Analýza vzorků enzymaticky naštěpených trypsinem přímo v gelu (SDS-PAGE) byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific). Naměřená hmotnostní spektra byla vyhodnocena pomocí techniky peptidového mapování k čemuž byl použit nástroj MS-Fit (Protein Prospector, v. 6.2.1). Hledání bylo provedeno s maximální tolerancí 10 ppm a k dohledání proteinu byla využita proteinová databáze UniprotProtKB (2017.11.01). Pro vlastní vyhledávání bylo použito nastavení: proteolytické štěpení proteinu pomocí trypsinu, možnost 2x vynechání štěpného místa enzymu a byla povolena konstantní modifikace karbamidomethylace cysteinu, variabilní modifikace acetylace na N-konci proteinu a oxidace methioninu.

Pro rychlé porovnání naměřených dat s daty v databázi byl zadán identifikátor proteinu A0A1D8PI95, který byl rekombinantně připraven. S tímto proteinem byla získaná data srovnána a následně manuálně anotována z fragmentačních spekter peptidů. Tímto způsobem se podařilo prokázat, že připravený protein odpovídá APE3p. Pokrytí sekvence proteinu činilo 32,0 %. Na *Obrázku č. 12* je vidět hmotnostní spektrum s vyznačenými peptidy odpovídajícími identifikovanému proteinu. Všechny peptidy jsou také zobrazeny v *Tabulce č. 4*.

**Tabulka 4** Přehled identifikovaných peptidů odpovídajících proteinu APE3 *C. albicans*

| m/z exp. | MH+ teor. | Intenzita | Správnost určení hmoty (ppm) | Začátek v sekvenci | Konec v sekvenci | Vynechaná štěpná místa | Sekvence |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 811,399 | 811,399 | 100718 | 1,04 | 516 | 522 | 0 | (K)SFEGFPK(R) |
| 1007,495 | 1007,495 | 122257 | 0,898 | 28 | 35 | 0 | (K)NWFNLGEK(L) |
| 1039,468 | 1039,463 | 17676 | 4,74 | 217 | 225 | 1 | (K)RGEC(Carbamidomethyl)AFGDK(S) |
| 1171,684 | 1171,683 | 19968 | 0,621 | 505 | 515 | 0 | (K)LIAHSVAVYAK(S) |
| 1191,600 | 1191,600 | 132436 | -0,0235 | 99 | 108 | 0 | (R)AEDLFEIAQR(S) |
| 1304,710 | 1304,710 | 80265 | -0,00458 | 159 | 170 | 0 | (K)SFSLLIDGVEPK(S) |
| 1434,734 | 1434,734 | 294380 | -0,046 | 97 | 108 | 1 | (R)SRAEDLFEIAQR(S) |
| 1698,825 | 1698,826 | 107237 | -0,937 | 280 | 293 | 0 | (K)YAFETTLYVDSYVK(Y) |
| 1914,991 | 1914,992 | 399071 | -0,708 | 228 | 246 | 0 | (R)NAGIAGALGAIIYDDEPVR(G) |
| 2027,089 | 2027,096 | 19601 | -3,68 | 119 | 137 | 0 | (R)VIGSPGHWGTIGYIISEIK(K) |
| 2069,027 | 2069,030 | 124868 | -1,33 | 527 | 544 | 1 | (K)KEVASASNSEKPNEFIYR(G) |
| 2155,187 | 2155,191 | 12332 | -1,72 | 119 | 138 | 1 | (R)VIGSPGHWGTIGYIISEIKK(L) |
| 2308,140 | 2308,146 | 25767 | -2,63 | 441 | 464 | 0 | (R)SDYVGFIENGIPGGGIATGAEGVK(D) |
| 2647,229 | 2647,246 | 2004 | -6,39 | 419 | 440 | 0 | (K)DLYIDWYTSHGLNYTLTPFDGR(S) |




**Obrázek 12** MALDI LTQ Orbitrap – MS spektrum analyzovaného proužku z gelové elektroforézy obsahující specifické peptidy odpovídající proteinu APE3 (značeny červeně).

# Závěr

Ve své práci jsem se věnoval hydrolázám štěpícím peptidy, konkrétně peptidázám lokalizovaným ve vakuolách patogenních kvasinek. Zatímco vakuolární peptidázy kvasinky *S. cerevisiae* byly v minulosti podrobně prozkoumány a staly se svého druhu modelovými enzymy, jejich orthology v patogenních kvasinkách zatím charakterizovány nebyly.

Součástí této práce byla tedy i experimentální část zaměřená na přípravu vakuolárních peptidáz Ape3p kvasinek *C. albicans* a *C. parapsilosis.* Podařilo se připravit vektory pro bakteriální expresi těchto proteinů, optimalizovat protokol exprese a zavést postup solubilizace takto získaných aminopeptidáz. Identita aminopeptidázy Ape3p získané expresí v bakteriích *Escherichia coli* byla potvrzena hmotnostní spektroskopií. Tím byly splněny cíle této práce a zároveň tak byla otevřena cesta k budoucí podrobné charakterizaci těchto aminopeptidáz, jak na úrovni enzymové kinetiky, tak na úrovni rentgenostrukturní analýzy.

## Seznam použité literatury


BARRETT, Alan J.; RAWLINGS, Neil D. Families and clans of serine peptidases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1995, 318.2: 247-250.

BERMAN, Judith. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, 2006, 9.6: 595-601.

BISWAS, Subhrajit; VAN DIJCK, Patrick; DATTA, Asis. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71.2: 348-376.

BORGES, Katia Regina Assunção, et al. Adhesion and biofilm formation of *Candida parapsilosis* isolated from vaginal secretions to copper intrauterine devices. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2018, 60.

BUTLER, Geraldine, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida genomes*. *Nature*, 2009, 459.7247: 657-662.

CROWE, Jonathan D., et al. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular microbiology*, 2003, 47.6: 1637-1651.

DÍAZ-JIMÉNEZ, Diana F., et al. Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. *Current Fungal Infection Reports*, 2012, 6.4: 275-282.

Family M28. *MEROPS The Peptidase Database* [online]. [cit. 2019-8-2]. Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M28

GILBOA, R., et al. Interactions of *Streptomyces griseus* aminopeptidase with amino acid reaction products and their implications toward a catalytic mechanism. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2001, 44.4: 490-504.

GUINEA, J1. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20: 5-10.

GUNISOVA, Stanislava, et al. Identification and comparative analysis of telomerase RNAs from *Candida* species reveal conservation of functional elements. *Rna*, 2009, 15.4: 546-559.

HARNETT, William; MCINNES, Iain B.; HARNETT, Margaret M. ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. *Immunology letters*, 2004, 94.1-2: 27-33.

HAZEN, Kevin C. New and emerging yeast pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 1995, 8.4: 462-478.

HECHT, Karen A.; O'DONNELL, Allyson F.; BRODSKY, Jeffrey L. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cellular logistics*, 2014, 4.1: e28023.

HIRŠOVÁ, Danuše. Chemické názvosloví: základní pravidla českého, tradičního latinského a mezinárodního latinského lékopisného názvosloví. *Karolinum*, 2004.

HOYER, Lois L., et al. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics*, 2001, 157.4: 1555-1567.

JAMES, M. N. G. Convergence of active center geometries among the proteolytic enzymes in Proteolysis and Protein Turnover (Bond, JS & Barrett, AJ, eds) pp. 1-8. 1993.

JEYAHARAN, Dhadchayini, et al. Characterisation of the carboxypeptidase G2 catalytic site and design of new inhibitors for Cancer therapy. *ChemBioChem*, 2018, 19.18: 1959-1968.

JIMENEZ-LOPEZ, Claudia; LORENZ, Michael C. Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages. PLoS Pathog, 2013, 9.11: e1003741.

JONES, Elizabeth W. The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches. *Annual review of genetics*, 1984, 18.1: 233-270.

KOCKOVÁ–KRATOCHVÍLOVÁ, ANNA. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Bratislava: *ALFA-SNTL*, 1982

KODÍČEK, M. *proteasy*. *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2019-08-03]. Dostupné z www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=proteasy

KOSA, Peter, et al. Complete DNA sequences of the mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*: insight into the evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. *Nucleic acids research*, 2006, 34.8: 2472-2481.

KOURKOUMPETIS, Themistoklis 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*, 2011, 171.2: 85-91.

KOVAC, L.; LAZOWSKA, J.; SLONIMSKI, P. P. A yeast with linear molecules of mitochondrial DNA. *Molec. gen*., 1984

KULLBERG, Bart Jan; ARENDRUP, Maiken C. Invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 2015, 373.15: 1445-1456.

LAFFEY, Sean F.; BUTLER, Geraldine. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 2005, 151.4: 1073-1081.

LOGUE, Mary E., et al. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTLa1 allele at its mating type locus. *Eukaryotic cell*, 2005, 4.6: 1009-1017.

LUCKETT, Jeni CA, et al. A novel virulence strategy for Pseudomonas aeruginosa mediated by an autotransporter with arginine-specific aminopeptidase activity. 2012.

LUO, Shanshan, et al. Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. Molecular immunology, 2009, 47.2-3: 541-550.

MAHON, Piers; BATEMAN, Alex. The PA domain: a protease-associated domain. *Protein Science*, 2000, 9.10: 1930-1934.

MANOLAKAKI, Dimitra, et al. *Candida* infection and colonization among trauma patients. *Virulence*, 2010, 1.5: 367-375.

MARAS, Bruno, et al. Aminopeptidase from *Streptomyces griseus*: primary structure and comparison with other zinc-containing aminopeptidases. *European journal of biochemistry*, 1996, 236.3: 843-846.

MEYERS, Frederick H., et al. *Review of medical pharmacology*. Lange Medical Publications, 1978.

NAVRÁTIL, Michal, et al. Comparison of human glutamate carboxypeptidases II and III reveals their divergent substrate specificities. *The FEBS Journal*, 2016, 283.13: 2528-2545.

NEJI, Sourour, et al. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *Journal of biomedical science*, 2017, 24.1: 67.

NÉMETH, Tibor, et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. *PloS one*, 2013, 8.7: e68704.

NGUYEN, Long Nam; GACSER, Attila; NOSANCHUK, Joshua D. Secreted lipases supply fatty acids for yeast growth in the absence of de novo fatty acid synthesis. *Virulence*, 2011, 2.6: 538-541.

NOVERR, Mairi C.; TOEWS, Galen B.; HUFFNAGLE, Gary B. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infection and immunity*, 2002, 70.1: 400-402.

PALMER, G. E.; KELLY, M. N.; STURTEVANT, JE1265890. The *Candida albican*s vacuole is required for differentiation and efficient macrophage killing. Eukaryotic Cell, 2005, 4.10: 1677-1686.

PANAGODA, G. J.; ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, 2001, 44.1-2: 29-35.

RAWLINGS, Neil D.; SALVESEN, Guy. *Handbook of proteolytic enzymes*. 3. Academic press, 2013.

SILVA, Sónia, et al. Biofilms of non-*Candida albicans Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Sabouraudia*, 2009, 47.7: 681-689.

SINGH, Dhirendra Kumar, et al. Functional characterization of secreted aspartyl proteases in *Candida parapsilosis. mSphere*, 2019, 4.4: e00484-19.

STAMPER, Carin, et al. Inhibition of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* by L-leucinephosphonic acid. Spectroscopic and crystallographic characterization of the transition state of peptide hydrolysis. *Biochemistry*, 2001, 40.24: 7035-7046.

TAVANTI, Arianna, et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis spp*. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of clinical microbiology*, 2005, 43.1: 284-292.

TÓTH, Renáta, et al. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clinical microbiology reviews*, 2019, 32.2.

TROJAN, Stanislav a kol. Lékařská fyziologie 4. vyd. Praha: Grada, 2003, 771 s. ISBN 80-247-0512-5

ULLMANN, Breanna D., et al. Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. Eukaryotic cell, 2004, 3.3: 715-723.

V FERRARIS, D.; SHUKLA, K.; TSUKAMOTO, Takashi, Structure-activity relationship of glutamate carboxypeptidase II (GSPII) inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 2012, 19.9: 1282-1294

VALLEE, Bert L.; AULD, David S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 1990, 29.24: 5647-5659.

VAN DEN HAZEL, H. Bart; KIELLAND-BRANDT, Morten C.; WINTHER, Jakob R. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*, 1996, 12.1: 1-16.

VAN DIE, Irma; CUMMINGS, Richard D. Glycomics in unraveling glycan-driven immune responses by parasitic helminths. In: *Handbook of glycomics*. Academic Press, 2010. p. 367-396.

VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vydání. Brno : Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5

WEEMS, J. J., et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25.6: 1029-1032.

YASUHARA, Toshimasa; NAKAI, Toshiki; OHASHI, Akira. Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, localization, and processing by protease B. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269.18: 13644-13650.

ZAJC, Tajana, et al. Baculoviral expression and characterization of human recombinant PGCP in the form of an active mature dimer and an inactive precursor protein. *Protein expression and purification*, 2011, 75.2: 119-126.