

QUORUM SENSING VE VZTAHU K VIRULENCI MIKROORGANISMŮ

MARTINA PALDRYCHOVÁ, EVA KVASNIČKOVÁ,
OLGA MAŽÁTKOVÁ a JAN MASÁK

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
paldrycm@vscht.cz

Došlo 10.2.17, přijato 9.5.17.

Klíčová slova: quorum sensing, signální molekuly, antibi-
otická rezistence, virulence

Obsah

1. Úvod
2. Quorum sensing
3. Quorum sensing ve vztahu k virulenci bakterií
4. Quorum sensing ve vztahu k virulenci kvasinek a vláknitých hub
5. Signální molekuly jako kooperační a kompetitivní agens vícedruhových mikrobiálních populací
6. Možnosti cíleného ovlivnění quorum sensing systémů
7. Přírodní inhibitory quorum sensing systémů patogenních mikroorganismů
8. Závěr

1. Úvod

Za jeden z největších úspěchů minulého století je považováno objevení specifických nástrojů dovolujících regulovat růst patogenních mikroorganismů. Aplikace látek, které mají za úkol inhibovat růst mikroorganismů či je usmrtit, se uplatnila nejvýrazněji při léčbě infekčních onemocnění způsobených patogenními kmeny, ale také např. v potravinářském průmyslu. Tato strategie má však jeden zřejmý nedostatek, kterým je vznik selektivního tlaku vedoucí nevyhnutelně k rezistenci přeživších. V novém tisíciletí se tak setkáváme s alarmujícím nárůstem výskytu multirezistentních mikroorganismů a dostáváme se do situace, kdy infekce kdysi snadno léčitelné mohou dnes končit fatálně. V současnosti je více než třeba vyvíjet alternativní strategie léčby, přičemž selektivní regulace řídicích mechanismů ovlivňujících patogenitu a virulenci mikroorganismů je jedním z nadějných směrů¹.

2. Quorum sensing

Regulační mechanismus quorum sensing (QS) byl v literatuře poprvé zmíněn v souvislosti s luminiscenční mořskou bakterií *Vibrio fischeri*. Tento mikroorganismus exprimuje geny řídící emisi světla (kódující enzym luciferasu) pouze, žije-li v symbióze se svými přirozenými hostiteli; v takovém případě je jeho buněčná hustota vysoká. Pokud se vyskytuje volně v oceánu, luciferasu neprodukuje². Hostitelé poskytují bakterii prostředí bohaté na živiny, zatímco přínos bakterie spočívá v produkci světla. Toto světlo využívají např. některé olivně jako ochranu před predátory (za měsíčního svitu, který proniká do mořské vody, totiž díky jeho produkci pod sebe nevrhají žádný stín, a tudíž nejsou vidět). Naproti tomu využívá ryba *Monocentris japonicus* toto světlo k přivábení partnera³. Obecně můžeme říci, že při nízké buněčné hustotě se mikroorganismus chová jako jednobuněčný, avšak pokud je dosaženo určitého stupně populační density, může „přepnout“ a chovat se jako mnohobuněčný⁴. Ačkoli byl tento jev pozorován nejprve u mořských symbiontů, systém QS využívají také potenciálně patogenní bakterie. *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia capacia*, *Serratia liquefaciens*, *Erwinia carotovora* a *Yersinia enterocolitica* regulují během procesu infekce expresi faktorů virulence (vlastností určujících stupeň patogenity), jako je např. tvorba biofilmu, produkce antibiotik, pigmentů, toxinů či enzymů, právě prostřednictvím QS (cit.³).

Celý proces QS je zprostředkován malými signálními molekulami, jejichž detekce vede ke změně genové exprese v reakci na výkyvy koncentrace buněk v daném prostředí. Nedávné studie ukázaly, že bakterie nejsou omezeny na komunikaci prostřednictvím signálních molekul pouze v rámci stejného druhu, ale jsou schopné i reakce na signály nepříbuzných druhů. Je také zřejmé, že proces QS není omezen pouze na bakterie⁵.

U bakterií byla identifikována řada strukturně odlišných skupin signálních molekul, přičemž mezi nejlépe prostudované patří *N*-acyl-homoserin laktony (AHL), jejichž biosyntéza byla nejprve prokázána u gramnegativních bakterií rodu *Vibrio*⁶.

QS systém bakterie *V. fischeri* ke své funkci obecně vyžaduje dva proteiny: *N*-acyl-homoserin laktón syntasu (I protein) a transkripční faktor (R protein). Se zvyšující se optickou hustotou *V. fischeri* roste i koncentrace *N*-(3-oxo-hexanoyl)-homoserin laktónu (3-oxo-C6-AHL) v prostředí. Ve chvíli, kdy tato koncentrace dosáhne určité mezní hodnoty, dojde k navázání AHL na R protein. Tento komplex poté aktivuje transkripci specifického úseku genetického kódu (operonu), který zodpovídá nejen za tvorbu luciferasy, ale také obou proteinů⁷. Díky systému pozitivní

zpětnovazební regulace, který je takto tvořen, nazýváme AHL autoinduktory (AI)².

3. Quorum sensing ve vztahu k virulenci bakterií

Gramnegativní bakterie *Vibrio cholerae* se přirozeně vyskytuje ve vodním prostředí, nechvalně je však známa jako původce cholery, závažného průjemového onemocnění. Pro vyvolání tohoto onemocnění je nezbytná produkce dvou faktorů virulence, cholera toxinu a pilusu potřebného ke kolonizaci střeva⁸. Tato produkce je řízena především prostřednictvím signální molekuly CAI-1 (*V. cholerae* autoinduktor-1)⁹. Molekula CAI-1, jejíž struktura byla popsána teprve v roce 2007 jako (S)-3-hydroxytridekan-4-on, je využívána bakteriemi *V. cholerae* a *Vibrio harveyi* také ke komunikaci v rámci jednoho rodu.

Syntéza této a dalších signálních molekul podléhá u rodu *Vibrio* společně regulaci skrze regulátor LuxO, který je při nízkých koncentracích AI fosforylován nebo naopak defosforylován při vysokých koncentracích AI. Při nízkých koncentracích AI tedy fosforylováný LuxO destabilizuje mRNA kódující R protein. Jakmile je dosaženo hraniční koncentrace AI, dojde k defosforylaci LuxO (namísto kinas jsou aktivovány fosfatasy), čímž je umožněna exprese R proteinu, a následně dojde k přepisu genů uložených v QS operonech^{10,11}.

Jedním z nejinvazivnějších a nejobávanějších oportunních patogenů způsobujících nosokomiální infekce je *P. aeruginosa*. Tato bakterie disponuje dvěma sadami QS proteinů a vytváří tudíž dva AI: *N*-(3-oxo-dodekanoyl) homoserin laktón (3-oxo-C12-AHL) a *N*-butanoyl homoserin laktón (C4-AHL). U pacientů s cystickou fibrózou významně zhoršuje průběh onemocnění, jelikož se tvorbou biofilmu spolupodílí na opakovaných zánětech plic². Pro správný průběh iniciační fáze tvorby biofilmu je vyžadován zejména 3-oxo-C12-AHL. C4-AHL hraje roli v anaerobní fázi vývoje biofilmu a během biosyntézy rhamnolipidů, které jsou důležité z hlediska architektury biofilmu¹². Zároveň obě tyto molekuly vazbou na příslušné receptory aktivují geny, kterými jsou kódovány další faktory virulence, proteiny usnadňující přežití v lidském hostiteli (např. exotoxin A potlačující imunitní reakci hostitele) a destrukci hostitelské tkáně během infekčního procesu (např. elastasa, proteasa, alkalická fosfatasa)². *P. aeruginosa* produkuje kromě dvou hlavních signálních molekul, které mají strukturu AHL, také signální molekulu 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon (PQS), která svou strukturou připomíná chinolonová antibiotika. PQS se podílí na sekreci exotoxinu pyocyaninu. Ačkoli tato bakterie produkuje více než 50 různých chinolonů, pouze PQS a jeho prekurzor 2-heptyl-4-chinolon (HHQ) zastávají signalizační funkci a významným způsobem ovlivňují patogenitu bakterie, např. během infekcí močových cest^{13,14}. Bala a spol.¹⁴ připravili mutanty klinických izolátů *P. aeruginosa* zbavené PQS QS systému, které na rozdíl od klinických izolátů nejsou schopny vyvolat akutní infekci močových cest.

Geny kódující virulenci u enterohemoragické *E. coli* jsou aktivovány nejen bakteriálním aromatickým autoinduktorem (AI-3), který je syntetizován běžnou gastrointestinální mikroflórou, ale také katecholaminy adrenalinem a noradrenalinem, které jsou produkovány hostitelem. Signalizační kaskáda AI-3/adrenalin/noradrenalin aktivuje geny, kterými je řízen proces přichycení bakteriálních buněk k povrchu a jeho následná kolonizace. Dále také geny potřebné k syntéze flagelly a sideroforu enterobaktinu. Tento systém je rozšířen u několika bakteriálních druhů (*Shigella* sp., *Salmonella* sp., *E. carotovora*, *Haemophilus influenzae*, *Chromobacterium violaceum*, *Coxiella burnetii*, *Yersinia* sp., a další). Není tedy omezen pouze na *E. coli*¹⁵.

U rostlinného patogenu *Agrobacterium tumefaciens* způsobujícího nádory rostlin řídí QS systém přenos Ti plasmidu. Ti plasmid obsahuje geny, které po začlenění do genomu hostitele podporují produkci rostlinných hormonů, čímž dochází ke stimulaci růstu části rostliny – tvorbě nádoru³.

Na rozdíl od gramnegativních bakterií, které převážně syntetizují AHL a detegují je prostřednictvím příslušných receptorů, využívají grampozitivní bakterie k signalizaci krátkých autoindukčních peptidů a k detekci kinasových detektorů¹⁰. Mechanismus signalizace spočívá ve fosforylační/defosforylační kaskádě. Kinasové detektory po interakci s peptidovým AI iniciují sérii fosforylačních reakcí, která vyústí ve fosforylaci regulátoru, což umožní jeho navázání na DNA a následný přepis genů, které jsou systémem QS řízeny.

Proces genetické transformace, poprvé popsán u grampozitivní bakterie *Streptococcus pneumoniae*, vyžaduje, aby recipientní bakterie byla kompetentní k přijetí exogenní DNA molekuly. Nastolení tohoto kompetentního stavu je řízeno právě prostřednictvím QS, konkrétně pomocí CSP (competence stimulating peptide – obsahuje 17 aminokyselin)³. Z bakterie *Bacillus subtilis* byl v roce 1996 Grossmanem a spol.¹⁶ izolován kompetenční a sporulační faktor (CSF), který má obdobnou funkci. Struktura autoindukčních peptidů (AIP) *Staphylococcus aureus* se liší kmen od kmene. Mohou být na základě strukturální variability a následně specifity k různým kinasám rozděleny do čtyř různých skupin. Za zmínku stojí, že zatímco každý AIP iniciuje zahájení virulenci kaskády ve vlastní skupině, dochází současně k potlačení virulenci kaskády u ostatních skupin. Struktura AIP vždy obsahuje thiolaktonový kruh, který je nezbytně nutný pro signalizační aktivitu³.

Přinejmenším 60 % kmenů rodu *Streptomyces* produkuje furanony neboli γ -butyrolaktony (GBL). A-faktor (2-isokapryloyl-3*R*-hydroxy-methyl-butylolaktón), syntetizovaný bakterií *Streptomyces griseus*, je prototypem GBL, který po vazbě na receptorový protein spouští biosyntézu antibiotika a sporulaci¹⁷.

Obecně je ale mezi všemi bakteriemi nejrozšířenější LuxS QS systém, který byl popsán nejprve u *V. harveyi*. Tímto systémem disponují nejen gramnegativní bakterie (*V. cholerae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*)¹⁵, ale také

řada bakterií grampozitivních (*B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*)³. Prostřednictvím tohoto systému je tvořen autoinduktor 2 (furanosyl-borát diester), který bakteriím umožňuje univerzální inter-druhovou komunikaci¹⁵. Bassler⁶ hovoří v souvislosti s AI-2 o bakteriálním esperantu. U bakterie *V. harveyi* řídí tato signální molekula produkci sideroforů, u bakterie *V. cholerae* biosyntézu cholera toxinu a u bakterie *C. perfringens* řady toxinů poškozujících měkké tkáně během infekčního procesu¹⁸.

Z výše uvedených informací je patrné, že QS systémy neslouží pouze k regulaci exprese faktorů virulence, ale obecně poskytují bakteriím evoluční výhodu. Je zcela evidentní, že bakterie syntetizují celou řadu strukturně nepříbuzných komunikačních molekul. Jeden druh bakterie může syntetizovat více těchto molekul a jednotlivé biosyntézy signálních molekul podléhají společné regulaci.

4. Quorum sensing ve vztahu k virulenci kvasinek a vláknitých hub

V eukaryotních systémech je QS spojován s morfologickými změnami, tedy přechodem kvasinkové formy na vláknitou nebo naopak¹⁹. QS systém byl, co se týče kvasinkových buněk, nejdůkladněji prostudován u oportunně patogenního druhu *Candida albicans*, který je čtvrtou nejčastější příčinou nosokomiálních infekcí²⁰. Hlavní signální molekulou *C. albicans* je seskviterpen farnesol, který je vylučován kontinuálně a jeho akumulace při vysoké buněčné hustotě blokuje morfologickou přeměnu kvasinkové formy na vláknitou²¹. Druhou signální molekulou je tyrosol (2-(4-hydroxyfenyl)ethanol) odvozený od aminokyseliny tyrosinu, který je stejně jako farnesol uvolňován do okolního prostředí v průběhu růstu²². Jeho funkcí je však v časně fázi tvorby biofilmu stimulace tvorby vláken²³. Kvasinka *C. albicans* je nejčastějším původcem vulvo-vaginální kandidózy. Přítomnost 17- β -estradíolu nebo ethynylestradiolu vede u této kvasinky k navýšení počtu buněk tvořících vlákna, tedy změně fenotypu, která u této kvasinky představuje významný faktor virulence. Jelikož je vulvo-vaginální kandidóza způsobována vláknitou formou, častěji se objevuje u žen v průběhu těhotenství, kdy je hladina estrogenů v těle vysoká. U mužů je nízká hladina estrogenů jedním z důvodů téměř nulového výskytu této infekce²⁴. U jiného dimorfního patogenu *Paracoccidioides brasiliensis* naopak za virulenci zodpovídá kvasinková forma, a proto je pozorován častější výskyt této infekce u mužů než u žen, které mají v těle více estrogenů²⁵.

Vláknité houby využívají ke komunikaci převážně γ -butyrolaktonů. Přidání butyrolaktonu I do rostoucí kultury *Aspergillus terreus* významně zvyšuje produkci lovastatinu, známého inhibitoru biosyntézy cholesterolu²⁶. Statiny, jejichž zástupcem je lovastatin, kromě hypocholesterolemické aktivity disponují silnou antifungální aktivitou zejména vůči kvasinkám²⁷. U *Aspergillus flavus* byly jako komunikační molekuly označeny oxylipiny (skupina polynenasycených mastných kyselin), které i u mnoha dalších

druhů *Aspergillus* sp. regulují rovnováhu mezi asexuálním a sexuálním životním cyklem²⁸. Produkce sekundárního metabolitu sklerotiorinu je u *Penicillium sclerotiorum* spojena s indukcí morfologických změn a je rovněž podporována γ -butyrolaktony²⁹.

5. Signální molekuly jako kooperační a kompetitivní agens vicedruhových mikrobiálních populací

V přirozených ekosystémech koexistuje velký počet organismů. Bakterie komunikují v první řadě za účelem kooperace nebo kompetice s ostatními organismy. Tyto vztahy jsou většinou realizovány prostřednictvím široké škály sloučenin, které jsou schopné interference mimo jiné s QS systémy⁴.

Např. bakterie *P. aeruginosa* a kvasinka *C. albicans* se běžně vyskytují ve smíšených biofilmech. Oba mikroorganismy se prostřednictvím signálních molekul, které produkují, zapojují do řady interakcí. *P. aeruginosa* může např. inhibovat růst kvasinek rodu *Candida* nebo vláknitých hub rodu *Aspergillus*. Tvorba vláken *C. albicans* může být vyvolána peptidoglykanem, který je hlavní součástí buněčné stěny bakterií a který je uvolňován během růstu. Jiné bakteriemi vylučované faktory, např. AHL *P. aeruginosa*, působí opačně³⁰. Farnesol produkovaný *C. albicans* inhibuje biosyntézu PQS, v důsledku čehož snižuje produkci faktoru virulence pyocyaninu. Zároveň má schopnost inhibovat tvorbu biofilmu *S. aureus*^{30,31}.

Gramnegativní bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* syntetizuje difuzní signální faktor (DSF), který byl poprvé identifikován u *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (původce černé hniloby, která postihuje brukvovité rostliny). Tento faktor, který je strukturním analogem kyseliny farnesové, slouží k inter-druhové komunikaci, řídí produkci extracelulárních polymerních látek (EPS) a inhibuje tvorbu vláken u *C. albicans*^{10,32}.

Furanony, syntetizované vláknitými bakteriemi z rodu *Streptomyces*, inhibují QS řízenou produkci pigmentu violaceinu u bakterie *C. violaceum*. Jsou totiž z hlediska struktury velice podobné *N*-acyl-homoserinovým laktonům. Furanony jsou produkovány také celou řadou mořských řas³³. Např. *Delisea pulchra* produkuje halogenované furanony, které ovlivňují motilitu bakterií *V. fischeri* a *V. harveyi* a také *S. liquefaciens* nebo *Serratia ficaria*¹.

Produkce dvou proteinů: gelatinasy a serinové proteasy, které představují faktory virulence u bakterie *E. faecalis*, může být narušena přítomností bakterií rodu *Streptomyces*. Produkce siamycinu I tímto rodem vede k narušení tvorby biofilmu *E. faecalis*³⁴.

Rasmussen a spol.¹ identifikovali sloučeniny produkované rodem *Penicillium* interferující s QS systémem *P. aeruginosa*. Analýzou DNA bylo zjištěno, že mykotoxin patulin a penicilinová kyselina snižují expresi genů *P. aeruginosa*, které jsou kontrolovány systémem QS o 60 %, resp. o 45 %.

6. Možnosti cíleného ovlivnění quorum sensing systémů

V předchozí kapitole bylo uvedeno několik příkladů přirozené interference s QS systémy mikroorganismů.

U gramnegativních bakterií bylo popsáno několik teoretických možností ovlivnění jejich QS systému za účelem potlačení jejich virulence. Část výzkumu je věnována screeningu sloučenin, které zabírají syntézu AHL. Pokud není bakterie schopná produkce AHL, nejsou aktivovány ani geny, které jsou prostřednictvím QS molekul kontrolovány. Jestliže nelze zabránit generaci signálu, může být degradována samotná komunikační molekula, a to buď chemickým nebo enzymovým rozkladem. A konečně, nejdůležitější část výzkumu zabývajícího se touto problematikou, je věnována blokádě R proteinu, který poté nemůže působit jako regulátor transkripce.

Prekurzory pro syntézu AHL, acyl-ACP a *S*-adenosyl-methionin (SAM), jsou využívány v centrálním metabolismu aminokyselin a mastných kyselin. Analoga těchto sloučenin účinně inhibují AHL syntasu *P. aeruginosa*. Tyto inhibitory zahrnují sloučeniny jako Holo-ACP, *L/D-S*-adenosyl-homocystein, sinefungin nebo butyryl-SAM. Nejúčinnější inhibitor *L/D-S*-adenosyl-homocystein snižuje aktivitu AHL syntasy *in vitro* o 97 % (cit.¹). Pro syntézu PQS je kondenzace anthranilátu a β -keto-mastné kyseliny velice důležitým krokem. Bylo zjištěno, že kondenzace analoga anthranilátu (methyl-anthranilátu) a β -keto-mastné kyseliny potlačuje produkci PQS a tím snižuje produkci elastasy bez ovlivnění růstu *P. aeruginosa* PAO1 (cit.³⁵). Synteticky může být modifikován také prekurzor AI-2 napojením alkylového řetězce, čímž dojde k inhibici tvorby AI-2. Tato inhibice je tím výraznější, čím je delší alkylový řetězec³⁶.

Rozklad signální molekuly může být vzhledem k tomu, že AHL obsahují ve své molekule laktonový kruh, umožněn vyšším pH. Při vyšším pH dochází k jeho otevření a ztrátě biologické aktivity AHL molekul. Tohoto jevu využívají některé vyšší rostliny, které v případě napadení bakteriemi produkujícími AHL molekuly (např. *E. carotovora*) zvýší pH na infikovaném místě. Mořská řasa *Laminaria digitata* používá zcela odlišnou strategii. Vytváří a vylučuje deriváty chlorných a bromných kyselin. Tyto sloučeniny se používají v průmyslu ve velké míře jako dezinfekční látky. Jejich přidaná hodnota však spočívá rovněž v období strategie výše jmenované řasy, tedy schopnosti reakce s oxo formami AHL signálních molekul, jako je např. 3-oxo-C12-AHL. U bakterií byly nalezeny čtyři typy enzymů, které jsou schopné rozkládat AHL molekuly. Zatímco AHL-laktonasy a dekarboxylasy hydrolyzují laktonový kruh, AHL-acylasy a deaminasy štěpí acylový postranní řetězec⁴. Enzymy degradující AHL byly identifikovány nejprve u několika zástupců rodu *Bacillus*. Produkce enzymů, které jsou schopné degradovat AHL, není omezena pouze na tento rod, ale byla potvrzena také u *A. tumefaciens*, *Arthrobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Comamonas* sp. nebo *Rhodococcus* sp.¹, přičemž každý mikroorganismus disponuje buď AHL-acylasou nebo

AHL-laktonasou. Výjimku představuje bakterie *Rhodococcus erythropolis*, která produkuje oba tyto enzymy a stejně tak bakterie *Deinococcus radiodurans* R2 (cit.⁴). I přesto, že použití těchto enzymů je omezeno pouze na lokální aplikaci, stále se drží v popředí obchodního zájmu. Transgenní rostliny tabáku vytvořené vložením plasmidu, který obsahuje gen kódující laktonasu, jsou méně náchylné k infekcím, které způsobuje *E. carotovora*. Schopnost degradace AHL není omezena pouze na bakterie. Lidské epitelové buňky dýchacích cest jsou rovněž schopné deaktivace některých AHL (3-oxo-C12-AHL a C6-AHL).

Postranní řetězec molekul AHL přímo nabádá k úpravě této části molekuly za účelem získání potenciálních QS inhibitorů (QSI), jelikož je důležitý pro aktivaci R proteinu. Blokádou receptoru pro AHL pomocí AHL analogu představuje učebnicový příklad antagonismu. Antagonistickou aktivitu vykazují AHL analoga s postranním arylovým řetězcem. Alternativou může být také nahrazení karbonylové skupiny v postranním řetězci AHL sulfonylovou skupinou. Další možností je náhrada laktonového kruhu jinou alternativní strukturou. Charakter inhibitorů QS systému mají např. molekuly obsahující ve své struktuře benzylový kruh¹. O honaucinech (honaucin A je tvořen *S*-3-hydroxy- γ -butyrolaktonem a 4-chlorkrotonovou kyselinou spojenými esterovou vazbou) produkovaných cyanobakterií *Leptolyngbya crossbyana* je známo, že inhibují bakteriální QS. Jejich syntetická analoga jsou v této inhibici ještě účinnější⁴. U *S. aureus* jsou zprostředkovateli mezibuněčné komunikace autoindukční peptidy (AIP). Jestliže je AIP-2 zkrácen, je sice schopen dále se vázat na příslušný receptor, ale již nedochází k aktivaci odpovědi – dochází k regulaci (atenuaci) virulence³⁷.

7. Přírodní inhibitory quorum sensing systémů patogenních mikroorganismů

Objevem systémů QS, pomocí kterých je regulována virulence bakterií, se naskytla alternativní možnost léčby infekčních chorob. Mechanismus účinku inhibitorů QS (QSI) spočívá v ovlivnění virulence bakterií bez dopadu na jejich životaschopnost, tudíž nedochází k vytváření selektivního tlaku a vzniku rezistence³⁹.

Řada výzkumných studií uvádí schopnost rostlinných extraktů zasahovat do mezibuněčné komunikace mikroorganismů. Ve skutečnosti může schopnost rostlin interferovat s QS systémy mikroorganismů v přírodě sloužit jako obranný mechanismus v boji rostlin proti invazi patogenů. Přírodní zdroje bohužel neobsahují biologicky relevantní množství QSI, které by bylo dostatečné pro léčebné účely. QSI ale mohou sloužit jako preventivní terapeutické látky. Mechanismus antivirulentní aktivity rostlinných extraktů byl popsán poměrně nedávno. Od té doby bylo identifikováno nepřeberné množství QSI pocházejících z ovoce, zeleniny, čerstvých bylin či koření³⁸.

Významným způsobem interferuje s QS systémem bakterie *P. aeruginosa* např. extrakt z česneku⁴⁰. Jakobsen a spol.⁴¹ zjistili, že za tento mechanismus účinku zodpoví-

dá sirmá sloučenina ajoene (4,5,9-trithiadodeka-1,6,11-trien-9-oxid) vznikající enzymově během drcení česneku z allicinu (diallyl-thiosulfínát). Vlivem použité koncentrace 80 mg l⁻¹ docházelo k down-regulaci genů kontrolovaných systémem QS a faktorů virulence *P. aeruginosa* (např. syntézy rhamnolipidů). Kdybychom však chtěli dosáhnout stejného terapeutického účinku u pacientů trpících infekcí způsobenou *P. aeruginosa*, jakého bylo dosaženo působením extraktu z česneku na myším modelu, museli bychom jim za den podat 5 kg čerstvého česneku. Česnek totiž obsahuje pouze 172 µg g⁻¹ E-ajoenu a 476 µg g⁻¹ Z-ajoenu⁴⁰. Tvorbu AHL ovlivňuje u *P. aeruginosa* např. kyselina salicylová, která působí na produkci faktorů virulence proteasy IV a elastasy⁴².

Cinnamaldehyd, vonná látka původně izolovaná ze skořicovníku používaná v potravinářství a kosmetickém průmyslu, interferuje s QS systémem bakterie *V. harveyi*. Stejně jako halogenované furanony ovlivňuje motilitu této bakterie snížením DNA-vazebné aktivity R proteinu. Na rozdíl od furanonů je ale netoxická⁴³. Cinnamaldehyd inhibuje také tvorbu faktorů virulence (tvorbu biofilmu a exotoxinu pyocyaninu) *P. aeruginosa*⁴⁴.

Extrakty z bylin, jako je bazalka, oregano, tymián, rozmarýn nebo zázvor, inhibují QS řízenou produkci violaceinu u bakterie *C. violaceum* a ovlivňují motilitu bakterií *E. coli* O157:H7 a *P. aeruginosa* PAO (cit.⁴⁵).

Furanokumariny bergamotin a dihydroxybergamotin, přirozeně se vyskytující v grapefruitu, zodpovídají za více než 95% inhibici AI-1 a AI-2 aktivit QS systému *V. harveyi*. Tyto látky rovněž ovlivňují tvorbu biofilmu gramnegativních bakterií *E. coli* a *S. typhimurium*⁴⁶.

Truchado a spol.⁴⁷ zjistili, že cinnamaldehyd, ellagová kyselina, extrakt z granátového jablka, resveratrol a rutin snižují produkci C6-AHL a 3-oxo-C6 AHL u bakterií *E. carotovora* a *Y. enterocolitica* v koncentracích, které byly nižší než jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC). Ve stejném roce publikovali Truchado a spol.⁴⁸ také úspěšnou studii týkající se účinku extraktu z pomerančů obsahujících glykosylované flavanony (naringin, neohesperidin a hesperidin) na *Y. enterocolitica*.

Esenciální oleje z *Eucalyptus globulus* a *Eucalyptus radiata* jsou již po řadu let známy svými antioxidačními a antibakteriálními účinky. Ve studii autorů Luís a spol.⁴⁹ byla potvrzena také jejich QSI aktivita. Tyto oleje inhibují produkci violaceinu u bakterie *C. violaceum*.

Luciardi a spol.⁵⁰ ve své studii demonstrují snížení produkce AHL o 33 %, snížení životaschopnosti buněk biofilmu o 41 % a také snížení aktivity enzymu elastasy o 75 % vlivem monoterpenů (limonen, γ-terpinen, myrcen a α-pinen) obsažených v esenciálním oleji *Citrus reticulata* (mandarinka).

Almasoud a spol.⁵¹ prokázali vliv kyseliny jablečné a mléčné na tvorbu AI-2 u bakterií *E. coli* O157:H7 a *S. typhimurium*.

QSI je rovněž možné použít pro posílení účinku antibiotik. Jakobsen a spol.⁴¹ prokázali, že QSI ajoene značným způsobem zvyšuje antimikrobiální účinek tobramycinu. QSI aktivita esenciálních olejů z *E. globulus*

a *E. radiata* také zvyšuje účinnost konvenčních antibiotik s ohledem na synergický efekt dosažený jejich společnou aplikací⁴⁹.

8. Závěr

Možností aplikace QSI, pomocí kterých je regulována virulence bakterií, se otevírá nový přístup k léčbě infekčních chorob. Přestože již byla identifikována řada látek interferujících s QS systémy patogenních mikroorganismů, je tato problematika poměrně novým tématem a naráží na některá omezení. Hlavní omezení přirozených QSI spočívá v jejich dostupnosti. Proto jsou nynější studie často soustředěny na totální syntézu QSI nebo jejich kombinaci s antibiotiky, která jsou v klinické praxi již využívána⁵².

Seznam zkratk

3-oxo-C12-AHL	<i>N</i> -(3-oxo-dodekanoyl) homoserin lakton
3-oxo-C6-AHL	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl) homoserin lakton
ACP	acyl carrier protein, univerzální přenašeč acylových meziproductů při biosyntéze mastných kyselin
AHL	<i>N</i> -acyl-homoserin laktony
AI	autoinduktor
AI-2	autoinduktor 2
AI-3	autoinduktor 3
AIP	autoindukční peptid
C4-AHL	<i>N</i> -butanoyl homoserin lakton
C6-AHL	<i>N</i> -hexanoyl homoserin lakton
CAI-1	<i>Vibrio cholerae</i> autoinduktor-1
CSF	kompetenční a sporulační faktor
CSP	kompetenční a sporulační peptid
DSF	difuzní signální faktor
EPS	extracelulární polymerní látka
GBL	γ-butyrolaktony
HHQ	2-heptyl-4-chinolon
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl koenzym A
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PQS	<i>Pseudomonas</i> chinolon signal
QS	quorum sensing
QSI	quorum sensing inhibitor
SAM	<i>S</i> -adenosyl-methionin

LITERATURA

1. Rasmussen T. B., Givskov M.: Int. J. Med. Microbiol. 296, 149 (2006).
2. Suga H., Smith K. M.: Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 586 (2003).
3. Miller M. B., Bassler B. L.: Annu. Rev. Microbiol. 55, 165 (2001).
4. Kalia V. C.: Biotechnol. Adv. 31, 224 (2013).
5. Atkinson S., Williams P.: J. R. Soc., Interface 6, 959 (2009).
6. Bassler B. L.: Curr. Opin. Microbiol. 2, 582 (1999).

7. Schauder S., Bassler B. L.: *Genes Dev.* 15, 1468 (2001).
8. Zhu J., Miller M. B., Vance R. E., Dziejman M., Bassler B. L., Mekalanos J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3129 (2002).
9. Kelly R. C., Bolitho M. E., Higgins D. A., Lu W., Ng W.-L., Jeffrey P. D., Rabinowitz J. D., Semmelhack M. F., Hughson F. M., Bassler B. L.: *Nat. Chem. Biol.* 5, 891 (2009).
10. Yajima A.: *Tetrahedron Lett.* 55, 2773 (2014).
11. Martín-Rodríguez A. J., Ticona J. C., Jiménez I. A., Flores N., Fernández J. J., Bazzocchi I. L.: *Phytochemistry* 117, 98 (2015).
12. Favre-Bonté S., Köhler T., Van Delden C.: *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 598 (2003).
13. Bala A., Gupta R. K., Chhibber S., Harjai K.: *J. Chromatogr. B* 930, 30 (2013).
14. Bala A., Chhibber S., Harjai K.: *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 1199 (2014).
15. Walters M., Sperandio V.: *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 125 (2006).
16. Solomon J. M., Lazizzera B. A., Grossman A. D.: *Genes Dev.* 10, 2014 (1996).
17. Ohnishi Y., Yamazaki H., Kato J.-Y., Tomono A., Horinouchi S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 431 (2005).
18. Xavier K. B., Bassler B. L.: *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 191 (2003).
19. Han T.-L., Cannon R. D., Villas-Bôas S. G.: *Fungal Genet. Biol.* 48, 747 (2011).
20. Kruppa M.: *Mycoses* 52, 1 (2009).
21. Hornby J. M., Jensen E. C., Lisek A. D., Tasto J. J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2982 (2001).
22. Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5048 (2004).
23. Alem M. A., Oteef M. D., Flowers T. H., Douglas L. J.: *Eukaryotic Cell* 5, 1770 (2006).
24. Cheng G., Yeater K. M., Hoyer L. L.: *Eukaryotic cell* 5, 180 (2006).
25. Borges-Walmsley M. I., Chen D., Shu X., Walmsley A. R.: *Trends Microbiol.* 10, 80 (2002).
26. Raina S., De Vizio D., Palonen E. K., Odell M., Brandt A. M., Soini J. T., Keshavarz T.: *Process Biochem.* 47, 843 (2012).
27. Demain A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 455 (1999).
28. Amare M. G., Keller N. P.: *Fungal Genet. Biol.* 66, 11 (2014).
29. Raina S., Odell M., Keshavarz T.: *J. Biotechnol.* 148, 91 (2010).
30. Méar J.-B., Kipnis E., Faure E., Dessein R., Schurtz G., Faure K., Guery B.: *Med. Mal. Infect.* 43, 146 (2013).
31. Cugini C., Calfee M., Farrow J. M., Morales D. K., Pesci E. C., Hogan D. A.: *Mol. Microbiol.* 65, 896 (2007).
32. de Rossi B. P., García C., Alcaraz E., Franco M.: *Rev. Argent. Microbiol.* 46, 288 (2014).
33. Martinelli D., Grossmann G., Séquin U., Brandl H., Bachofen R.: *BMC Microbiol.* 4, 25 (2004).
34. Nakayama J., Tanaka E., Kariyama R., Nagata K., Nishiguchi K., Mitsuhata R., Uemura Y., Tanokura M., Kumon H., Sonomoto K.: *J. Bacteriol.* 189, 1358 (2007).
35. Calfee M. W., Coleman J. P., Pesci E. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 11633 (2001).
36. Lowery C. A., Abe T., Park J., Eubanks L. M., Sawada D., Kaufmann G. F., Janda K. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15584 (2009).
37. Lyon G. J., Mayville P., Muir T. W., Novick R. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13330 (2000).
38. Truchado P., Larrosa M., Castro-Ibáñez I., Allende A.: *Trends Food Sci. Technol.* 43, 189 (2015).
39. Hentzer M., Wu H., Andersen J. B., Riedel K., Rasmussen T. B., Bagge N., Kumar N., Schembri M. A., Song Z., Kristoffersen P.: *The EMBO Journal* 22, 3803 (2003).
40. Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Rasmussen T. B., Christophersen L., Calum H., Hentzer M., Hougen H.-P., Rygaard J., Moser C., Eberl L.: *Microbiology* 151, 3873 (2005).
41. Jakobsen T. H., van Gennip M., Phipps R. K., Shanmugham M. S., Christensen L. D., Alhede M., Skindersoe M. E., Rasmussen T. B., Friedrich K., Uthe F.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2314 (2012).
42. Bandara M. B., Zhu H., Sankaridurg P. R., Willcox M. D.: *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 47, 4453 (2006).
43. Brackman G., Defoirdt T., Miyamoto C., Bossier P., Van Calenbergh S., Nelis H., Coenye T.: *BMC Microbiol.* 8, 149 (2008).
44. Kim Y.-G., Lee J.-H., Kim S.-I., Baek K.-H., Lee J.: *Int. J. Food Microbiol.* 195, 30 (2015).
45. Al-Hussaini R., Mahasneh A. M.: *Molecules* 14, 3425 (2009).
46. Girenavar B., Cepeda M. L., Soni K. A., Vikram A., Jesudhasan P., Jayaprakasha G., Pillai S. D., Patil B. S.: *Int. J. Food Microbiol.* 125, 204 (2008).
47. Truchado P., Tomás-Barberán F. A., Larrosa M., Allende A.: *Food Control* 24, 78 (2012).
48. Truchado P., Giménez-Bastida J.-A., Larrosa M., Castro-Ibáñez I., Espín J. C., Tomás-Barberán F. A., García-Conesa M. T., Allende A.: *J. Agric. Food Chem.* 60, 8885 (2012).
49. Luís Â., Duarte A., Gominho J., Domingues F., Duarte A. P.: *Ind. Crops Prod.* 79, 274 (2016).
50. Luciardí M. C., Blázquez M. A., Cartagena E., Bardón A., Arena M. E.: *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 373 (2016).
51. Almasoud A., Hettiarachchy N., Rayaprolu S., Babu D., Kwon Y. M., Mauromoustakos, A.: *LWT-Food Sci. Technol.* 66, 560 (2016).
52. Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H. J., Coenye T.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2655 (2011).

M. Paldrychová, E. Kvasničková, O. Mařátková, and J. Masák (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Quorum Sensing in Relation to Microbial Virulence**

Microorganisms do not live alone, but rather they communicate using diverse „languages“. In general, each bacterial species produces and responds to a unique auto-inducer signal. Gram-negative bacteria use *N*-acylated homoserine lactones and gram-positive bacteria use oligopeptides as autoinducers. Function of autoinducer 2 is bac-

terial interspecies cell-to-cell communication. The structure and function of two main signaling molecules (farnesol and tyrosol) in the *C. albicans* quorum sensing (QS) system were also already described. Signaling molecules control the behavior of the whole population (especially virulence factors expression). That's why QS systems represent a new therapeutic target, especially because of an increasing worldwide antibiotic resistance. Quorum sensing inhibitors are a promising direction in the treatment of infection caused by pathogenic microorganisms.