

## EXTRACELULÁRNÍ DNA JAKO CÍLOVÁ MOLEKULA K NARUŠENÍ BIOFILMŮ

MARTINA BOHÁČOVÁ a JARMILA PAZLAROVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28, Praha 6 – Dejvice  
bohacovm@vscht.cz

Došlo 10.3.17, přepracováno 24.10.17, přijato 30.10.17.

Klíčová slova: extracelulární DNA, eDNA, adheze, horizontální genový transfer, rezistence, biofilm, narušení biofilmu

### Obsah

1. Úvod
  - 1.1. Metody studia eDNA
  - 1.2. Uvolňování eDNA
  - 1.3. Horizontální přenos genů
  - 1.4. Role eDNA v adhezi
  - 1.5. Regulační funkce eDNA
  - 1.6. Odolnost biofilmu vůči antimikrobiálním látkám a eDNA
2. Strategie narušení biofilmu
  - 2.1. Narušení eDNA a tvorby biofilmu pomocí DNasy
  - 2.2. Kombinované přístupy
3. Závěr

### 1. Úvod

Mikroorganismy interagují mezi sebou, ale i s prostředím, ve kterém žijí. Vytvářejí spolu dynamická společenstva přilnutá k biotickému či abiotickému povrchu, která označujeme jako biofilmy. Mikrobiální biofilmy jsou klíčové při patogenezi živočišných a rostlinných hostitelů. Biofilmy chrání bakterie před stresem, jakými jsou vysychání, působení antibiotik a imunitní reakce organismu, tím, že bakteriím napomáhají v uchycování, poskytují jim výživu a likvidují metabolické zplodiny v tekutém mikroprostředí. Přírodní biofilmy jsou zpravidla tvořeny více druhy mikroorganismů. Existence těchto společenstev nachází uplatnění v bioremediačních procesech, ale také významně negativně zasahuje do různých odvětví průmyslu a biomedicíny<sup>1–4</sup>.

Mikrobiální biofilm se tvoří poměrně předvídatelným způsobem od okamžiku prvotní adheze buněk k povrchu.

Kromě dělení buněk nastává tvorba extracelulární polymerní matrice, často řízená systémem „quorum sensing“. Důležitou součástí biofilmu tvoří i buňky obklopující matici obsahující vodu, extracelulární DNA (eDNA), proteiny a polysacharidy<sup>5</sup>. Komponenty matrice usnadňují kolonizaci povrchů v kontaktu s potravinami nebo tkáněmi. V potravinářství přítomnost dalších makromolekul na povrchu, např. bílkovin s negativním nábojem, urychluje kolonizaci hnilobnými mikroorganismy, kontaminaci produktu a usnadňuje proces kažení. Potíže způsobují mimo jiné kolonizací procesních nádob a potrubí, snižují účinnost tepelných výměníků či chladicích věží, ohrožují kvalitu výrobků, podílejí se na korozi kovů nebo zanáší membrány filtračních zařízení. V medicíně přítomnost biofilmu, např. na kloubních náhradách, způsobuje komplikované infekce vedoucí k jejich výměně, ale i potenciálně fatálním následkům pro pacienta<sup>6,7</sup>.

V posledních letech byla rozpoznána důležitost přítomnosti eDNA v matici biofilmů jako významného pojiva. Většina současného výzkumu eDNA se soustřeďuje na úlohu eDNA při vývoji biofilmu<sup>8–13</sup>. eDNA je částečně uvolňovaná dosud nepopsanými mechanismy, i když její značná část nepochybně pochází z odumřelých buněk v mikrobiální populaci. Matrice obsahující eDNA také vytváří prostředí s vysokou frekvencí přenosu genů. Ke studiu tohoto dynamického prostředí nepostačuje jediná metoda, proto je nutné využít kombinace více přístupů.

#### 1.1. Metody studia eDNA

Poté, co byly úspěšně zvládnuty různé techniky studia biofilmu, vývoj směřuje ke zdokonalování metod pro studium eDNA. Obecně můžeme tyto metody rozdělit na *in situ* a *ex situ*. K metodám *in situ* náleží hlavně postupy, které jsou nedestruktivní a založené na fluorescenci. Tyto metody využívají značky (fluoroforu), která se naváže na cílovou strukturu ve vzorku. Signál značky se využívá k detekci nebo kvantifikaci. K těmto metodám patří např. fluorometrie, konfokální laserová skenovací mikroskopie nebo hybridizace *in situ* (FISH)<sup>11,14,15</sup>. Jmenované metody jsou využívány ke studiu adheze, regulačních funkcí eDNA a rezistencí. K metodám *ex situ* patří především techniky molekulární biologie. Při použití těchto technik je nezbytné extrahovat eDNA z biofilmu. K těmto metodám patří restriční analýza, sekvenování nebo metody založené na PCR, např. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), MLST (Multi Locus Sequence Typing) a TFLP (Terminal Fragment Length Polymorphism) (cit.<sup>16–19</sup>). Sem patří techniky využívané ke studiu původu, funkce a uvolňování eDNA z buněk do matrice.

## 1.2. Uvolňování eDNA

Hlavním mechanismem uvolňování eDNA je nejspíš autolýza buněk, která nastává díky kontrolované buněčné lýze nebo aktivní sekreci eDNA<sup>20</sup>. Studie mutantů bakterií s mutovanými autolysiny odhalila, že autolysiny spouštějí uvolnění eDNA v biofilmech *Streptococcus* spp. Tato hypotéza byla podpořena i u biofilm tvořícího *Enterococcus faecalis* a jeho mutantů GelE a SprE, kteří eDNA neuvolňovali. U *Staphylococcus aureus* jako negativní regulátor uvolňování eDNA pravděpodobně slouží GdpS (cit.<sup>21</sup>). Autolysin (AltE) spouští autolýzu subpopulace *Staphylococcus epidermidis*<sup>22</sup>.

Autolýza buněk ovšem není jediným zdrojem eDNA a již byly demonstrovány i další mechanismy sekrece eDNA z buněk do matrice<sup>23</sup>. Uvolňování může být zprostředkováno přes vezikuly z membrány<sup>24</sup>. Bylo zjištěno, že vezikuly biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* obsahují eDNA spolu s faktory virulence a že po působení antibiotika gentamycinu se jich uvolňovalo i několikrát více<sup>25,26</sup>.

Řízená autolýza je typem programované buněčné smrti bakterií. Některé bakterie, jako *S. aureus*, páchají tímto typem altruistické sebevraždy. Menší skupina bakterií se obětuje ve prospěch biofilmu jako celku. Další strategií je „bratrovražda“, při které útočící bakterie uvolňuje smrtící faktory, které jsou cíleny na další bakterie. Tuto strategii využívají *E. faecalis*, *Bacillus subtilis* nebo *Streptococcus pneumoniae*<sup>8</sup>.

I když názor na původ eDNA ještě není jednotný, u několika druhů bylo prokázáno, že je pravděpodobně identická nebo velice podobná genomové DNA<sup>16,20</sup>. Je ovšem možné, že s použitím dokonalejších technik se rozdíl mezi oběma typy DNA ještě objeví, ať už v sekvenci nebo na úrovni epigenetické. V přirozeném prostředí se však eDNA různých mikroorganismů mísí a vzniká tak prostředí ideální pro horizontální přenos genů.

## 1.3. Horizontální přenos genů

Existence většího množství DNA v mimobuněčném prostoru bakterií skrývá velký potenciál využitelný k výměně genetického materiálu mezi bakteriemi. Tato výměna může vést k rozšíření metabolických kapacit kompetentních bakterií. Matrice s vysokým obsahem eDNA vytváří ideální prostředí pro přenos genů. Frekvence výměny materiálu je v biofilmu mnohem vyšší než u planktonních buněk<sup>27</sup>. Např. v biofilmu *Streptococcus mutans* je 10–600krát vyšší než v planktonní kultuře<sup>28</sup>. K výměně materiálu dochází prostřednictvím mobilních genetických elementů procesy transformace, transdukce a konjugace.

V případě transformace jsou kompetentní buňky schopny přijmout úseky DNA a začlenit je do svého genomu<sup>8,9</sup>. Ukázalo se, že buňky v kompetentním stavu uvolňují eDNA<sup>29</sup>. Někteří autoři dokonce věří, že eDNA je schopna navozovat kompetenci buněk<sup>27,28</sup>. V éře zvyšujícího se výskytu rezistencí k antibiotikům může být eDNA důležitou zásobárnou pro geny rezistence. Existují i studie, ve kterých již byla popsána transformace buněk přidanou

eDNA obsahující geny podmiňující rezistence vůči antibiotikům<sup>30,31</sup>.

Bakteriofágy a další genetické elementy tvoří až 20 % bakteriálního genomu<sup>32</sup>. Fágy začleňují svou informaci do bakterie mechanismem transdukce. Tyto fágy mohou sloužit jako vektory faktorů virulence, kterými jsou toxiny nebo geny kódující rezistence k antibiotikům a významně se podílí na šíření a rozvoji rezistence<sup>33</sup>. Lyzogenní bakteriofágy mohou také spontánně spouštět lýzu bakteriální subpopulace, a proto mohou být významným zdrojem eDNA. Ve studii provedené na kmenech *S. pneumoniae* bylo zjištěno, že kmen, který obsahoval lyzogenního fága, tvořil více biofilmu a zároveň i eDNA. Tento jev byl pozorován pro homologní eDNA stejného kmene i heterologní exogenně přidanou DNA z jiného organismu<sup>34</sup>.

Při běžné konjugaci dochází ke kontaktu dvou bakterií pomocí pilu. Aktivní uvolnění eDNA skrze mechanismus evolučně příbuzný konjugaci probíhá sekrečním systémem typu IV (cit.<sup>35</sup>). Jediným dosud popsaným mikroorganismem, který je schopen uvolnit DNA sekrečním systémem typu IV, aniž by byl vyžadován kontakt dvou bakterií přes pilus, je *Neisseria gonorrhoeae* obsahující konjugativní plasmidy<sup>36</sup>.

Zajímavou informací je, že schopnost tvořit biofilm u kmenů *Escherichia coli* a *P. aeruginosa*, které obsahovaly konjugativní plasmidy, byla vyšší než u kmenů bez plasmidů. Celkově frekvence jedno- i mezidruhového přenosu genů byla vyšší u bakterií vystavených stresovým podmínkám<sup>37,38</sup>. Horizontální přenos genů je komplexní multifaktoriální proces, jehož úskalí např. v souvislosti s eDNA zatím nejsou plně objasněny. V komplexnější studii konjugativních plasmidů obsahujících geny rezistence byla měřena účinnost a frekvence přenosu genů v různé starých biofilmech *E. coli*. Ačkoli tlustší a starší biofilmy obsahovaly menší počet transkonjugantů, delší inkubace donorů vedla k častější konjugaci. Úspěšnost přenosu byla závislá na druhu plasmidu, době expozice v biofilmu, ale i schopnosti donorového organismu přilnout k povrchu. Účinnost přenosu byla vyšší u kmenů, které lépe adherují k povrchu<sup>39</sup>. Toto pozorování by mohlo být spojováno se schopností kmene uvolňovat eDNA, vzhledem k důležité roli eDNA při adhezi bakterie na povrch.

## 1.4. Role eDNA v adhezi

eDNA se klíčově podílí na adhezi a zároveň slouží i jako důležité přírodní pojivo, které se významně účastní procesu koagregace<sup>23,40,41</sup>. V prvotních stádiích tvorby biofilmu slouží k iniciálnímu reverzibilnímu přichycení buněk k povrchu. Jelikož je eDNA schopná překonat odpudivě síly, prodlouží buňce vzdálenost kontaktu s povrchem až na 200–300 nm (cit.<sup>12</sup>). K adhezi přispívá i tvorba smyček DNA interagujících s členitým povrchem. Se zvyšujícím se množstvím smyček může spojení silit a vést k ireverzibilnímu spojení bakterie s povrchem<sup>9</sup>. Při tvorbě agregátů a na úrovni vzdálenosti kontaktu s povrchem v mezích několika nanometrů hrají hlavní roli acidobazické interakce povrchu s eDNA<sup>12</sup>. Adhezi eDNA

pravděpodobně zvyšuje při interakci s hydrofobními povrchy, i když se jedná o amfifilní molekulu<sup>13</sup>. Význam eDNA v iniciační fázi adheze byl demonstrován v biofilmech *Listeria monocytogenes*, kde působení DNasy vedlo k disperzi staticky i dynamicky rostoucího biofilmu<sup>20</sup>. Důležitá může být i interakce s dalšími komponenty matrice, jako je *N*-acetylglukosamin. Zde se ukázal i její strukturální význam při vytváření kapes eDNA, což jsou místa s vyšší koncentrací eDNA<sup>42</sup>. Na stabilizaci struktury se podílí interakce exopolysacharidu Pel propojujícího vlákna eDNA v biofilmu *P. aeruginosa*<sup>43</sup>. Podobnou roli hraje i DNA vazebný protein II (DNAB II) při tvorbě biofilmu uropatogenní *E. coli*<sup>44</sup>.

eDNA vykazuje specifickou prostorovou distribuci záviselou na stáří biofilmu a její množství se liší dokonce i u blízkých příbuzných druhů mikroorganismů. Např. *S. aureus* produkuje více eDNA než *S. epidermidis*<sup>45</sup>. V pozdějších fázích tvorby biofilmu je eDNA důležitou složkou, která se podílí na stabilizaci jeho struktury a na vazebných interakcích s účinkem na krátkou i dlouhou vzdálenost<sup>9</sup>. Zdá se, že pro stabilizaci struktury biofilmu a mezibuněčnou kohezi musí být eDNA dostatečně dlouhá a nepoškozená<sup>34</sup>.

### 1.5. Regulační funkce eDNA

Regulační procesy komplexních systémů jsou často podmíněny komunikací s prostředím. Jedná se o soubor mechanismů, který vede k realizaci určité biologické funkce. V biofilmu *P. aeruginosa* byl popsán význam eDNA jako molekuly řídící tok transportu buněk v biofilmu. Buňky tvořící biofilm se pohybují a stavějí další části struktury biofilmu. Buňky v první linii nazýváme rafty. Vedoucí buňky raftů jsou ihned doplňovány dalšími. eDNA umožňuje rozložit nápor buněk, díky kterým je zajištěn tok a uspořádání následujících buněk. Po aplikaci DNasy se tento tok narušil a buňky raftů se jevily najednou stacionární a byly roztroušeny náhodně<sup>41</sup>. Na rozdíl od většiny ostatních druhů se u *Caulobacter crescentus* ukázalo, že eDNA může pozastavit zrání biofilmu a umožnit tak únik buněk z biofilmu. Mohla by tedy eDNA mít funkci regulační? V tomto případě se jednalo o krátké úseky DNA a intaktní genomová DNA tento účinek neměla<sup>46</sup>.

### 1.6. Odolnost vůči antimikrobiálním látkám a eDNA

Spolu s dalšími extracelulárními polymerními látkami tvoří eDNA silnou vrstvu umožňující ochranu na několika úrovních. Rezistence a tolerance je způsobena jak vnitřními faktory, geneticky podmíněnými, tak vnějšími, např. vlastnostmi matrice. Konkrétně u eDNA byla popsána tolerance i rezistence biofilmu k antimikrobiálním peptidům a aminoglykosidům v souvislosti s jejím negativním nábojem a tvorbou penetrační bariéry. Exogenně přidaná DNA zvýšila toleranci biofilmu *P. aeruginosa* vůči aminoglykosidům<sup>40,47</sup>. I díky svému negativnímu náboji eDNA vyvazuje kationy v biofilmu *Salmonella enterica*, což

vede k aktivaci PhoPQ/PmrAB systému a následné expresi *prm* operonu zodpovědného za rezistenci k antimikrobiálním peptidům<sup>48</sup>. eDNA z biofilmu *Haemophilus influenzae* chrání buňky biofilmu proti účinku kationických antimikrobiálních peptidů lidského těla, defensinů. Stejný jev byl pozorován i u biofilmu *P. aeruginosa*<sup>49</sup>.

V přirozeném prostředí bakterie nejčastěji vytvářejí vícedruhové biofilmy. Tyto komunity mají obrovskou ekologickou výhodu oproti svým jednodruhovým protějškům především v hloubce a komplexitě mezidruhových interakcí, stratifikaci a pestré škále různých vlastností díky genetické plasticitě. V mnoha studiích bylo popsáno, že je tolerance k biocidům a antibiotikům v polymikrobiálních společenstvích ještě několikrát vyšší<sup>50–52</sup>.

## 2. Strategie narušení biofilmu

Vzhledem ke komplexitě bakteriální komunity, její celkové stratifikaci, tvorbě extracelulárních polymerních látek, a tedy i odolnosti vůči různým stresovým podmínkám jsou biofilmy často značně komplikující systémy v průmyslové, ale i zdravotní sféře. Dalekosáhlé důsledky přítomnosti biofilmu v reálných podmínkách technologií i medicíny vedly k rozvoji velice široké škály přístupů k odstranění biofilmu nebo alespoň rozvolnění jeho struktury<sup>2,53–55</sup>. Jedním z přístupů je působení na univerzální strukturální komponentu matrice eDNA. Touto molekulou a strategiemi vedoucími k rozrušení biofilmu se bude zabývat i druhá část tohoto příspěvku.

### 2.1. Narušení eDNA a tvorby biofilmu aplikací DNasy

Nukleasy jsou důležité enzymy aktivně rozkládající různé typy DNA včetně eDNA. Působení těchto enzymů vede k uvolnění bakterií z biofilmu. DNasa štěpí fosfodiesterovou vazbu jedno- i dvouřetězcové DNA. Ošetření biofilmu tímto enzymem rozvolní matrix a biofilmy jsou mnohem citlivější k dalšímu narušení.

Využití DNasy jako strategie k narušení biofilmu bylo demonstrováno již několikrát pro různé vzdáleně příbuzné patogeny např. pro *L. monocytogenes*<sup>20,56</sup>, *S. aureus*<sup>57</sup>, *Neisseria meningitidis*<sup>58</sup> nebo *P. aeruginosa*<sup>59</sup>. I když i mezi těmito mikroorganismy se najdou blíže nespécifikované skupiny kmenů, které na DNasu I citlivé nebyly<sup>58,60</sup>. Obecně se ukazuje, že aplikace DNasy je mnohem účinnější v raných fázích tvorby biofilmu, tedy hlavně během procesu adheze<sup>9,20</sup>. Pokusy o eradikaci biofilmu DNasou u některých zralých starších biofilmů již nebyly tolik účinné<sup>22,24</sup>.

Kombinace účinku DNasy a vybraných antibiotik vedla ke zvýšení permeability antibiotika do biofilmu, a proto i ke zvýšení účinku antibiotika na 24 hodin rostoucí biofilmy<sup>61</sup>. Mnohem účinnější formou antibiofilmových strategií je tedy kombinace různých přístupů.

## 2.2. Kombinované přístupy

Hledání alternativních přístupů k rozrušení biofilmů v době značného nárůstu množství rezistentních mikroorganismů vedlo k rozvoji různých antibiofilmových strategií. K slibným metodám budoucnosti náleží i postupy navozující reverzi mikroorganismů tvořících biofilm do disperzní nebo planktonní formy. K hlavním proudům antibiofilmové strategie patří využívání enzymů narušujících matrix, využití bakteriofágů, působení inhibitorů „quorum sensing“ nebo použití nanočástic (obr. 1)<sup>62,63</sup>. Zde bude uvedeno jen několik zástupců reprezentujících kombinaci několika přístupů a působení na eDNA pro narušení biofilmu.

Využívání enzymů narušujících matrix patří asi mezi nejstarší již v praxi vyzkoušené metody. DNasa spolu s antibiotiky je nasazována při léčbě cystické fibrózy a zároveň je podávána i u pacientů s endokarditidou<sup>64</sup>. Kombinace tkáňového aktivátoru plazminogenu a DNasy zlepšila léčbu u pleurálních infekcí<sup>65</sup>. V potravinářství je *L. monocytogenes* známá tím, že odolává i použití mnoha sanitačních strategií najednou. Aplikace DNasy I vedla sice k částečné disperzi zralého biofilmu *L. monocytogenes*, ale kombinovaný přístup s dalším enzymem narušujícím matrix, proteinasou K, vedl k úplné eradikaci zralého biofilmu<sup>66</sup>. Enzymů narušujících matrix je větší množství a několik dalších příkladů může být nalezeno v těchto publikacích<sup>66,67</sup>.

Alternativním přístupem je použití bakteriofágů spolu s enzymem narušujícím matrix. Tento přístup může narážet na úspěšnou propagaci bakteriofágů v přítomnosti enzymu, který není součástí bakteriálního genomu. Rekombinantní technologie by v budoucnu mohly tuto bariéru překonat. Existuje už i bakteriofág produkující DNasu účinnou proti biofilmu *S. pyogenes*<sup>68</sup>.

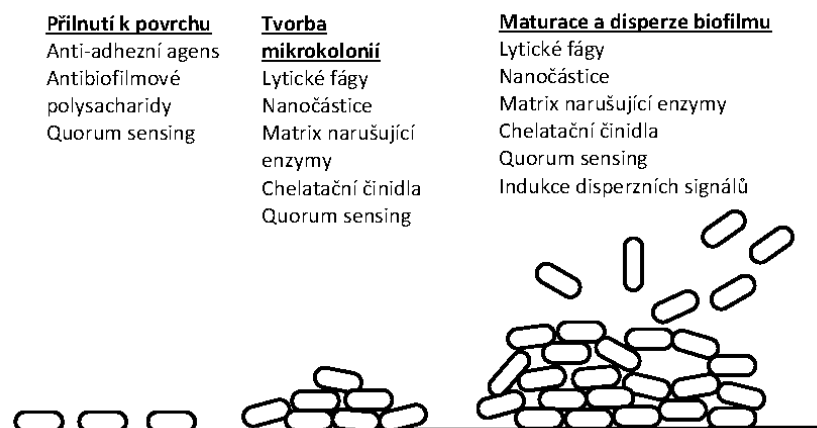
Dalším slibným přístupem jsou inhibitory „quorum sensing“ (IQS) narušující koordinované chování biofilmové komunity, které je značně ovlivněno buněčnou denzi-

tu. K IQS patří především analogy acetylovaných homoserinových laktonů pro gram-negativní bakterie nebo analogy autoindukčních peptidů u gram-pozitivních bakterií. Mezi tyto látky patří např. halogenované furanony, které jsou navíc schopny zvýšit citlivost bakterií k antibiotikům<sup>69</sup>. Největším omezením použití těchto látek je pravděpodobně jejich toxicita a případné účinky na přirozenou mikroflóru. K slibným látkám budoucnosti patří hamamelitanin, který ovlivňuje „quorum sensing“ přes TraP receptor. Interakcí hamamelitaninu s receptorem se změnila skladba buněčné stěny a snížila se i množství eDNA. Jeho působením došlo ke změně exprese *lrgAB* genu ovlivňujícího buněčnou lýzu a tedy i eDNA. Jeho efektivita na *S. aureus* byla potvrzena *in vitro* i *in vivo*<sup>19</sup>.

Relativní novinkou je neméně zajímavý přístup cílení DNAB II proteinů směsí monoklonálních protilátek. DNAB II proteiny doprovází řetězce DNA intra- i extracelulárně. Tyto proteiny se nachází u vrcholů křížících se vláken DNA a celkově zpevňují strukturu biofilmu<sup>70</sup>. Navázáním směsí protilátek dojde k blokadě strukturálně významných epitopů a k rozrušení biofilmu. I když jsou bakterie v podstatě jen rozvolněné, jsou více než čtyřnásobně citlivější k antibiotikům než jejich protějšky v biofilmu. Zároveň tímto rozvolněním nepřímo umožňují efektivnější „odstranění“ bakterií pomocí imunitního systému organismu<sup>70</sup>. Tento přístup se ukázal účinný *in vitro* i *in vivo* u více druhů bakterií<sup>71</sup>.

V posledních letech se také rozmáhají strategie, které využívají technologii nanočástic. Nanočástice představují velice slibný nástroj díky své velikosti (do 100 nm) a tedy i svým penetračním schopnostem. Jejich vlastnosti snižují problémy s biokompatibilitou a riziko vzniku rezistence u bakterií. Nanočástice mohou mít i biocidní a antiadhezivní účinky, které lze navíc ještě úspěšně modifikovat a vylepšovat<sup>72</sup>.

Materiálem nanočástic bývají většinou kovy, jako jsou typicky zlato, stříbro, zinek a jejich oxidy. K hlavním



Obr. 1. Hlavní strategie narušení tvorby biofilmu v různých fázích jeho vývoje

omezením použití nanočástic patří jejich akumulace v tkáních a toxicita. Výsledky testů toxicity jsou zatím různorodé a závisí na mnoha faktorech (dávka, velikost, tvar, materiál atd.), určité typy nanočástic mohou mít genotoxické, mutagenní či cytotoxické účinky, a proto je obezřetnost na místě<sup>73</sup>. Jisté je, že mechanismy působení nanočástic zatím nejsou plně popsány a pochopeny. Ačkoli se jedná o technologii s velkým potenciálem, její hlubší výzkum je naprosto nezbytný.

Využití pozitivně nabitých nanočástic obsahujících antibiotikum bylo testováno v biofilmu *Bulkhorderia cepacia*<sup>74</sup>. Kombinovaná terapie s DNAsou by mohla poskytnout slibnější výsledky u pozitivně nabitých nanočástic zvláště u tohoto patogena. Naproti tomu negativně nabitě nanočástice se zdály být vhodné pro cílený transport léčiv. K nadějným aplikacím patří léčba chronických infekcí, ale i intracelulárních patogenů. Nanočástice zlata plněné gentamycinem úspěšně eradikovaly biofilm gram-pozitivních i gram-negativních bakterií, navíc byly schopny penetrovat do makrofágů a tyto částice se jevíly v *in vitro* testech jako netoxické<sup>75</sup>.

V současnosti existuje mnoho různých strategií a jejich kombinací, které přesahují možnosti tohoto příspěvku. V případě hlubšího zájmu přidáváme odkaz na několik dalších review zabývajících se touto problematikou<sup>63,68,76–78</sup>.

### 3. Závěr

Extracelulární DNA představuje významný cíl z hlediska narušování struktury biofilmu různých mikroorganismů. Studium této komponenty povede k prohloubení znalostí o přilnutí buněk k různým povrchům, struktuře biofilmu, odolnosti biofilmu vůči stresovým faktorům, regulačním funkcím eDNA, ale i podmínkách umožňujících přenos genetické informace. Hlavně však odkryje nové možnosti v oblasti odstraňování biofilmů z povrchů v potravinářství i medicíně. I když se v posledních letech objevují různé postupy narušení biofilmu, velký potenciál vidíme v kombinaci přístupů narušujících jednotlivé komponenty matrix. Ačkoli v narušování eDNA vidíme jen jeden z možných postupů, věříme, že náleží k těm důležitějším.

#### Seznam symbolů

DNAB II	DNA vazebný protein II
eDNA	extracelulární DNA
GdpS	protein <i>S. epidermidis</i> podporující tvorbu biofilmu a virulenci
GeLE	metaloproteasa (gelatinasa) <i>Enterobacter faecalis</i> , spojená s tvorbou biofilmu a virulencí
IQS	inhibitory quorum sensing
<i>lrgAB</i>	operon modulující aktivitu hydrolasy mureinu a toleranci k penicilinu
PhoPQ/PmrAB	dvousložkový systém modifikující lipopolysacharidy vnější membrány

SprE serinová proteasa *Enterobacter faecalis* spojená s tvorbou biofilmu a virulencí

*Autoři děkují za finanční podporu projektu GAČR 17-15936S.*

#### LITERATURA

- Kokare C. R., Chakraborty S., Khopade A. N., Mahadik K. R.: Indian J. Biotechnol. 8, 159 (2009).
- Zuo R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 1245 (2007).
- Srey S., Jahid I. K., Ha S. D.: Food Control. 31, 572 (2013).
- Welliver R. C., Hanerhoff B. L., Henry G. D., Kohler T. S.: Curr. Urol. Rep. 15, 411 (2014).
- Flemming H. C., Neu T. R., Wozniak D. J.: J. Bacteriol. 189, 7945 (2007).
- Czaczyk K., Myszyk K.: Pol. J. Environ. Stud. 16, 799 (2007).
- Smirnova T. A., Didenko L. V., Azizbekyan R. R., Romanova Y. M.: Microbiology 79, 413 (2010).
- Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P., Arciola C. R.: Int. J. Artif. Organs 34, 824 (2011).
- Okshevsky M., Meyer R. L.: Crit. Rev. Microbiol. 7828, 1 (2013).
- Liu Y. Q., Liu Y., Tay J. H.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 65, 143 (2004).
- Tang L., Schramm A., Neu T. R., Revsbech N. P., Meyer R. L.: FEMS Microbiol. Ecol. 86, 394 (2013).
- Das T., Krom B. P., van der Mei H. C., Busscher H. J., Sharma P. K.: Soft Matter 7, 2927, (2011).
- Das T., Sharma P. K., Krom B. P., van der Mei H. C., Busscher H. J.: Langmuir : The ACS journal of surfaces and colloids 27, 10113 (2011).
- Guilbaud M., Piveteau P., Desvaux M., Brisse S., Briandet R.: Appl. Environ. Microbiol. 81, 1804 (2015).
- Dominiak D. M., Nielsen J. L., Nielsen P. H.: Environ. Microbiol. 13, 710 (2011).
- Steinberger R. E., Holden P. A.: Appl. Environ. Microbiol. 71, 5404 (2005).
- Wu J., Xi C.: Appl. Environ. Microbiol. 75, 5390 (2009).
- Bockelmann U., Janke A., Kuhn R., Neu T. R., Wecke J., Lawrence J. R., Szewzyk U.: FEMS Microbiol. Lett. 262, 31 (2006).
- Brackman G., Breyne K., De Rycke R., Vermote A., Van Nieuwerburgh F., Meyer E., Van Calenbergh S., Coenye T.: Sci Rep-Uk. 6, 20321 (2016).
- Harmsen M., Lappann M., Knøchel S.: Appl. Environ. Microbiol. 76, 2271 (2010).
- Fischer A., Kambara K., Meyer H., Stenz L., Bonetti E. J., Girard M., Lalk M., Francois P., Schrenzel J.: Int. J. Med. Microbiol. 304, 284 (2014).
- Qin Z., Ou Y., Yang L., Zhu Y., Tolker-Nielsen T., Molin S., Qu D.: Microbiology 153, 2083 (2007).
- Flemming H. C., Wingender J.: Nat. Rev. Microbiol.

- 8, 623 (2010).
24. Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C., Mattick J. S.: *Science* 295, 1487 (2002).
  25. Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J.: *J. Bacteriol.* 177, 3998 (1995).
  26. Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J.: *J. Bacteriol.* 178, 2767 (1996).
  27. Madsen J. S., Burmolle M., Hansen L. H., Sorensen S. J.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 183 (2012).
  28. Molin S., Tolker-Nielsen T.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 255 (2003).
  29. Steinmoen H., Knutsen E., Havarstein L. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7681 (2002).
  30. Mao D. Q., Luo Y., Mathieu J., Wang Q., Feng L., Mu Q. H., Feng C. Y., Alvarez P. J. J.: *Environ. Sci. Technol.* 48, 71 (2014).
  31. Hannan S., Ready D., Jasni A. S., Rogers M., Pratten J., Roberts A. P.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 345 (2010).
  32. Nanda A. M., Thormann K., Frunzke J.: *J. Bacteriol.* 197, 410 (2015).
  33. Balcazar J. L.: *PLoS Pathog.* 10, e1004219 (2014).
  34. Carrolo M., Frias M. J., Pinto F. R., Melo-Cristino J., Ramirez M.: *PloS One* 5, e15678 (2010).
  35. Vorkapic D., Pressler K., Schild S.: *Curr. Genet.* 62, 71 (2016).
  36. Zechner E. L., Lang S., Schildbach J. F.: *Philos. Trans. R. Soc., B* 367, 1073 (2012).
  37. Cook L. C., Dunny G. M.: *Microbiol. Spectr.* 2, 0012 (2014).
  38. Mc Mahon M. A. S., Blair I. S., Moore J. E., Mc Dowell D. A.: *J. Appl. Microbiol.* 103, 1883 (2007).
  39. Krol J. E., Wojtowicz A. J., Rogers L. M., Heuer H., Smalla K., Krone S. M., Top E. M.: *Plasmid* 70, 110 (2013).
  40. Jakubovics N. S., Shields R. C., Rajarajan N., Burgess J. G.: *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 467 (2013).
  41. Gloag E. S. a 16 spoluaautorû.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 11541 (2013).
  42. Thomas V. C., Thurlow L. R., Boyle D., Hancock L. E.: *J. Bacteriol.* 190, 5690 (2008).
  43. Jennings L. K. a 12 spoluaautorû.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 11353 (2015).
  44. Devaraj A., Justice S. S., Bakaletz L. O., Goodman S. D.: *Mol. Microbiol.* 96, 1119 (2015).
  45. Izano E. A., Amarante M. A., Kher W. B., Kaplan J. B.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 470 (2008).
  46. Kirkpatrick C. L., Viollier P. H.: *Mol. Microbiol.* 77, 801 (2010).
  47. Chiang W. C., Nilsson M., Jensen P. O., Hoiby N., Nielsen T. E., Givskov M., Tolker-Nielsen T.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2352 (2013).
  48. Johnson L., Horsman S. R., Charron-Mazenod L., Turnbull A. L., Mulcahy H., Surette M. G., Lewenza S.: *BMC Microbiol.* 13, 115 (2013).
  49. Lewenza S.: *Front. Microbiol.* 4, 21 (2013).
  50. Sanchez-Vizuete P., Orgaz B., Aymerich S., Le Coq D., Briandet R.: *Front. Microbiol.* 6, 705 (2015).
  51. Harriott M. M., Noverr M. C.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3746 (2010).
  52. Burmolle M., Webb J. S., Rao D., Hansen L. H., Sorensen S. J., Kjelleberg S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3916 (2006).
  53. Navarro A., Taylor Z. D., Matolek A. Z., Weltman A., Ramaprasad V., Huang S., Beenhouwer D. O., Haake D. A., Gupta V., Grundfest W. S.: *Proc. SPIE* 8214, 1028 (2012).
  54. Beloin C., Renard S., Ghigo J. M., Lebeaux D.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 18, 61 (2014).
  55. Jang H., Rusconi R., Stocker R.: *NPJ Biofilms Microbiomes* 3, 6 (2017).
  56. Nguyen U. T., Burrows L. L.: *Int. J. Food Microbiol.* 187, 26 (2014).
  57. Xu Q., Sun F., Feng W., Liu X., Liu Y.: *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 35, 1356 (2015).
  58. Lappann M., Claus H., van Alen T., Harmsen M., Elias J., Molin S., Vogel U.: *Mol. Microbiol.* 75, 1355 (2010).
  59. Mulcahy H., Charron-Mazenod L., Lewenza S.: *PLoS Pathog.* 4, e1000213 (2008).
  60. Zetzmann M., Okshevsky M., Endres J., Sedlag A., Caccia N., Auchter M., Waidmann M. S., Desvaux M., Meyer R. L., Riedel C. U.: *Front. Microbiol.* 6, 1 (2015).
  61. Tetz G. V., Artemenko N. K., Tetz V. V.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1204 (2009).
  62. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. J.: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a010306 (2013).
  63. Wu H., Moser C., Wang H. Z., Hoiby N., Song Z. J.: *Int. J. Oral Sci.* 7, 1 (2015).
  64. Okshevsky M., Regina V. R., Meyer R. L.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 73 (2015).
  65. Rahman N. M. a 22 spoluaautorû.: *N. Engl. J. Med.* 365, 518 (2011).
  66. Kaplan J. B.: *J. Dent. Res.* 89, 205 (2010).
  67. Lister J. L., Horswill A. R.: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 178 (2014).
  68. Harper D. R., Parracho H. M. R. T., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S., Morales S.: *Antibiotics* 3, 270 (2014).
  69. Brackman G., Coenye T.: *Curr. Pharm. Des.* 21, 5 (2015).
  70. Goodman S. D., Obergfell K. P., Jurcisek J. A., Novotny L. A., Downey J. S., Ayala E. A., Tjokro N., Li B., Justice S. S., Bakaletz L. O.: *Mucosal Immunol.* 4, 625 (2011).
  71. Novotny L. A., Jurcisek J. A., Goodman S. D., Bakaletz L. O.: *EBioMedicine* 10, 33 (2016).
  72. Allaker R. P.: *J. Dent. Res.* 89, 1175 (2010).
  73. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M.: *Iran. Biomed. J.* 20, 1 (2016).
  74. Messiaen A. S., Forier K., Nelis H., Braeckmans K., Coenye T.: *PloS One* 8, e79220 (2013).
  75. Mu H., Tang J., Liu Q., Sun C., Wang T., Duan J.: *Sci. Rep.* 6, 18877 (2016).
  76. Chung P. Y., Toh Y. S.: *Pathog. Dis.* 70, 231 (2014).

77. Taraszkievicz A., Fila G., Grinholc M., Nakonieczna J.: *Biomed. Res. Int.* 2013, 150653 (2013).  
78. Song Z., Borgwardt L., Hoiby N., Wu H., Sorensen T. S., Borgwardt A.: *Orthop. Rev.* 5, 65 (2013).

**M. Boháčová and J. Pazlarová** (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Extracellular DNA as a Target Molecule for Biofilm Disruption**

Biofilm matrix forms a dynamic microenvironment facilitating the resilience of the biofilm. Extracellular DNA

(eDNA) is one of the matrix components playing a crucial role in the cell adhesion, aggregation and structure stabilization. Its sticky nature and negative charge reduce the penetration of antimicrobials and further enable the biofilm tolerance or even resistance. The resistance can be encoded in the biofilm matrix genetic information. Moreover, the biofilm matrix with eDNA creates an ideal environment for gene transfer. For all above mentioned reasons, eDNA is a substance with a significant potential for the biofilm disruption in food processing, as well as in medicine. The combination of several different techniques successful in biofilm disruption could facilitate even eradication of the biofilm with various pathogens.