

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Biologie



Pavla Novotná

Extracelulární matrix u kvasinkových populací

Extracellular matrix in yeast populations

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Martin Kuthan, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.5.2014

.....

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Martinu Kuthanovi, Ph.D. za ochotnou pomoc a cenné připomínky při psaní této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala mé rodině za trpělivost, podporu a zázemí při mém studiu.

Abstrakt

Mikroorganismy se v přírodním prostředí nejčastěji vyskytují v mnohobuněčných formách, nejčastěji v biofilmech. Biofilm je charakterizován jako společenství buněk, žijících na rozhraní prostředí, uzavřených v extracelulární matrix. ECM tvoří významnou složku biofilmů u kvasinkových populací. Extracelulární matrix funguje jako ochranná bariéra a umožňuje buňkám přežít v nepříznivých podmínkách i lépe kompetovat o prostředí s ostatními mikroorganismy. Tvoří také účinnou bariéru proti antibiotikům či jiným škodlivým látkám, což dělá z biofilmů velký problém ve zdravotnictví a průmyslu. Tvorba matrix může být ovlivněná morfologickými formami kolonií. U některých mikroorganismů dochází ke zvýšené tvorbě ECM při fenotypovém přepínání jako reakce na změnu životních podmínek. Složení ECM je rodově i druhově specifické. Hlavní složku matrix tvoří polysacharidy a proteiny.

Klíčová slova: kvasinky, extracelulární matrix, kolonie, biofilmy

Abstract

The microorganisms in a natural environment are frequently found in multicellular forms, most commonly in biofilms. Biofilm is characterized as a community of cells living at the interface of two environments, embedded in the extracellular matrix. ECM is a significant component of biofilms in yeast populations. Extracellular matrix acts as a protective barrier and allows cells to survive under adverse conditions and better compete with other microorganisms. It also forms an effective barrier against antibiotics and other harmful substances, what makes biofilms a serious problem in medicine and industry. Formation of the matrix may be influenced by the morphological forms of colonies. Increased formation of ECM is commonly connected in phenotypic switching in response to changes of their living conditions. The composition of the ECM is a genus- and species-specific. The main component of the matrix consists of polysaccharides and proteins.

Keywords: yeast, extracellular matrix, colonies, biofilms

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD..... | 1 |
| 2. PŘEPÍNÁNÍ FENOTYPŮ U KVASINEK..... | 2 |
| 2.1 Přepínání fenotypů u patogenních kvasinek..... | 2 |
| 2.1.1 Přepínání fenotypů u kvasinek rodu <i>Candida</i> | 2 |
| 2.1.1.1 Charakteristika hladkých kolonií rodu <i>Candida</i> | 2 |
| 2.1.1.2 Charakteristika vrásčitých kolonií rodu <i>Candida</i> | 3 |
| 2.1.2 Přepínání fenotypů u kvasinky <i>Cryptococcus neoformans</i> | 3 |
| 2.1.2.1 Morfologické formy <i>Cryptococcus neoformans</i> | 4 |
| 2.2 Přepínání fenotypů u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 4 |
| 2.2.1 Charakteristika vrásčitých kolonií <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5 |
| 2.2.2 Charakteristika hladké kolonie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5 |
| 3. VÝSKYT ECM | 7 |
| 3.1 Výskyt extracelulární matrix u <i>Candida albicans</i> | 7 |
| 3.2 Výskyt extracelulární matrix u <i>Cryptococcus neoformans</i> | 8 |
| 3.3 Výskyt extracelulární matrix u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 3.3.1 Tvorba extracelulární matrix u vrásčité kolonie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 10 |
| 4. SLOŽENÍ ECM..... | 12 |
| 4.1 Polysacharidy | 12 |
| 4.1.1 Polysacharidy u rodu <i>Candida</i> | 13 |
| 4.1.2 Polysacharidy u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 13 |
| 4.2 Proteiny | 14 |
| 4.2.1 Als proteiny <i>Candida albicans</i> | 14 |
| 4.2.2 Flo proteiny <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 15 |
| 4.3 eDNA | 16 |
| 4.4 Dvojmocné kationty | 17 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5. | VÝZNAM EXTRACELULÁRNÍ MATRIX | 18 |
| 5.1 | Kompetice | 18 |
| 5.2 | Zdroj energie | 18 |
| 5.3 | Rezistence a ochranná funkce..... | 19 |
| 5.4 | Adheze a agregace buněk v biofilmu | 19 |
| 5.5 | Zásobárna vody | 19 |
| 6. | ZÁVĚR..... | 21 |
| 7. | POUŽITÁ LITERATURA | 22 |

1. Úvod

Mikroorganismy se v přírodě vyskytují v jednobuněčné formě jako volné planktonní buňky, nebo tvoří mnohobuněčné útvary například povlaky, či tzv. maty, floky, kolonie a biofilmy (Flemming & Wingender, 2010). Nejstudovanějším typem mnohobuněčných útvarů jsou biofilmy vyskytující se prakticky ve všech prostředích. Jako biofilmy je možné označovat mnohobuněčná společenstva mikroorganismů žijící na rozhraních prostředí, která jsou pevně přichycena k povrchu a uzavřena v extracelulární hmotě (Blankenship & Mitchell, 2006; Costerton, 1995).

Mnohobuněčné struktury a zejména biofilmy ovlivňují náš každodenní život, protože se usazují na různých průmyslových zařízeních, ale i na zubních implantátech, cévkách, katetrech, infúzích a dalších zdravotnických pomůckách. Dále se ukázalo, že předejít vzniku biofilmu nebo jej zničit je velmi obtížné. Navíc mohou biofilmy sloužit jako zdroj planktonních buněk pro další šíření (Douglas, 2003; Hawser et al., 1998). Na mnohé mikroorganismy v biofilmech mají antibiotika, která lépe působí na jednobuněčné formy, pouze malý účinek, a tím se biofilmy stávají velmi obtížně odstranitelnými. Nejnovější výzkumy však ukazují na možnost eliminace biofilmů pomocí jiných typů látek jako například kyseliny kávéové, esterových derivátů (De Vita et al., 2014) a arachidonové kyseliny (Mishra et al., 2014), které jsou účinnější než mnohá antibiotika.

Již v počátcích výzkumu byla v biofilmech prokázána existence hmoty označené jako extracelulární matrix (ECM) tvořící účinnou bariéru proti mechanickým i fyzikálním vlivům (Costerton, 1995).

ECM lze definovat jako materiál produkovaný buňkami, který vyplňuje mezibuněčný prostor mezi nimi a tvoří vrstvu pokrývající a obalující buňky. ECM je charakteristickým rysem většiny přírodních populací mikroorganismů, kde může tvořit až 90% veškeré hmoty biomasy (Donlan, 2002). Složení ECM je druhově specifické, hlavními složkami jsou polysacharidy a proteiny (Flemming & Wingender, 2010; Flemming et al., 2007; Hawser et al., 1998; Costerton, 1995). Na tvorbě ECM se podílí i samotný povrch daného organismu (Branda et al., 2005).

Většina studií zabývajících se extracelulární matrix je zaměřena na bakterie (Flemming & Wingender, 2010; Flemming et al., 2007), kde je ECM velmi dobře charakterizována četnými vědeckými publikacemi. Výskyt ECM je prokázán i u kvasinkových populací (Joshi et al., 1973). Nejvíce studované rody kvasinek spojené s ECM jsou rody *Candida* a *Cryptococcus*. U těchto druhů bylo prokázáno také fenotypové přepínání spojené s produkcí extracelulární hmoty. Tvorba ECM byla ale prokázána u mnoha dalších rodů kvasinek, dokonce i u nepatogenní *Saccharomyces* (Reynolds & Fink, 2001; Kuthan et al., 2003; Soll, 2014).

Cílem této bakalářské práce je přiblížit současný stav znalostí o extracelulární matrix u kvasinkových kolonií.

2. Přepínání fenotypů u kvasinek

Přepínání fenotypů je mechanismus, při kterém některé druhy mikroorganismů kontrolovaně mění své fyziologické a morfologické charakteristiky. Změna fenotypu pravděpodobně nemá původ v náhodných mutacích, protože k ní dochází ve velké frekvenci a je reverzibilní.

Molekulární mechanismus není zcela objasněn a zdá se, že každý mikroorganismus má jiné mechanismy zprostředkující přepínání. Na přepínání se mohou podílet mobilní genetické elementy, umlčování genové exprese či aktivace mutátorových genů (Goldman & Fries, 1998; Fries et al., 2002).

Přepínání fenotypů pravděpodobně indukuje změna životních podmínek (Brown et al., 1999).

2.1 Přepínání fenotypů u patogenních kvasinek

2.1.1 Přepínání fenotypů u kvasinek rodu *Candida*

Při pozorování kolonií různých druhů rodů *Candida* jsou pozorovány morfologické změny, které jsou pravděpodobně výsledkem přepínání fenotypů. U *Candida albicans* byly identifikovány 3 druhy přepínání fenotypů. První z nich 3153A přepínací systém byl objeven Slutským a jeho spolupracovníky (Slutsky et al., 1985). Dochází při něm s poměrně vysokou frekvencí ke změnám tvarů kolonií na různě strukturované morfotypy. Dále Pomés a kolektiv (1985) popsal přepínání z hladké do vrásčité morfologie (viz dále). Jako poslední byl popsán „white-opaque“ přechod, kdy dochází ke změně bílé kolonie s hladkým povrchem na šedou a vrásčitou kolonii (Slutsky et al., 1987). „White-opaque“ přepínání má souvislost s pohlavním rozmnožováním a podstupují ho pouze homozygoti. Význam tohoto přepínání je pravděpodobně ve vytváření genetické diverzity u patogenních kvasinek (Lockhart et al., 2002; Soll, 2004). U většiny variant morfotypů je dokázaná reverzibilita těchto fenotypových změn (França et al., 2011).

Z hlediska studia ECM nás nejvíce zajímá přepínání z hladké do vrásčité morfologie. Pomés s kolektivem (1985) popsal, že při působení vnějších vlivů (v jeho případě UV záření) dochází u *Candida albicans* k přepnutí fenotypu z původně hladké kolonie na vrásčitou. Při opakovaném působení UV záření dochází k dalším změnám morfologie, včetně přepnutí zpět na hladkou morfologii (Pomés et al., 1985).

2.1.1.1 Charakteristika hladkých kolonií rodu *Candida*

U rodu *Candida* dochází nejčastěji k přepínání z hladké morfologie na vrásčitou, nebo jinak strukturovanou morfologii. Původní rodičovské hladké kolonie *Candida* nevykazují výraznou strukturovanost a jejich povrch je nečleněný. Kolonie jsou tvořeny převážně z blastopor, které pučí a společně s ECM tvoří propojenou síť (Radford et al., 1994). Obsah ECM je ale výrazně

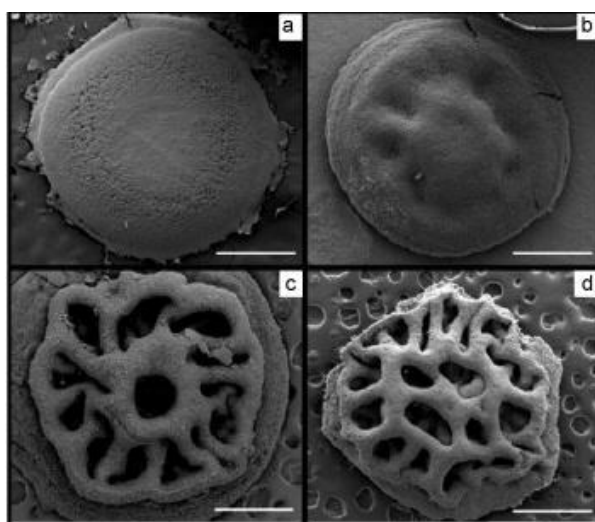
nižší než u vrásčitých kolonií. Mohou se vyskytovat i hladké kolonie s mírnými poklesy (Obr. 1). Tyto kolonie jsou označovány za tzv. polo-hladké (França et al., 2011).

2.1.1.2 Charakteristika vrásčitých kolonií rodu *Candida*

Povrch vrásčité kolonie je výrazně strukturovaný a existují různé morfotypy s odlišně členitými okraji a povrchem kolonie (Radford et al., 1994). Kolonie mohou být například výrazně vrásčité, či prstencovité (Obr. 1). Vrásčité a prstencovité kolonie tvoří komplexní architekturu, s výskytem typických hlubokých centrálních a periferních oblastí s poklesem hmoty, tvořící jakési důlky. U vrásčitých kolonií jsou tyto poklesy a důlky jasněji charakterizovány a nachází se jich na povrchu kolonie větší množství než u prstencovitých (França et al., 2011).

Buňky v kolonii tvoří převážně pseudohyfy nebo pravé hyfy, blastopor se vyskytuje jen malé množství (Radford et al., 1994).

Bylo prokázáno, že vrásčité kolonie tvoří velké množství extracelulární hmoty. ECM se ve větší míře nachází v důlcích strukturovaných kolonií (França et al., 2011).



Obr. 1: Architektura různých morfotypů kolonií *Candida tropicalis* pořízena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Vysvětlivky: a-hladká morfologie; b-polo-hladká morfologie; c-prstencovitá morfologie; d-vrásčitá morfologie. Převzato z França et al., 2011.

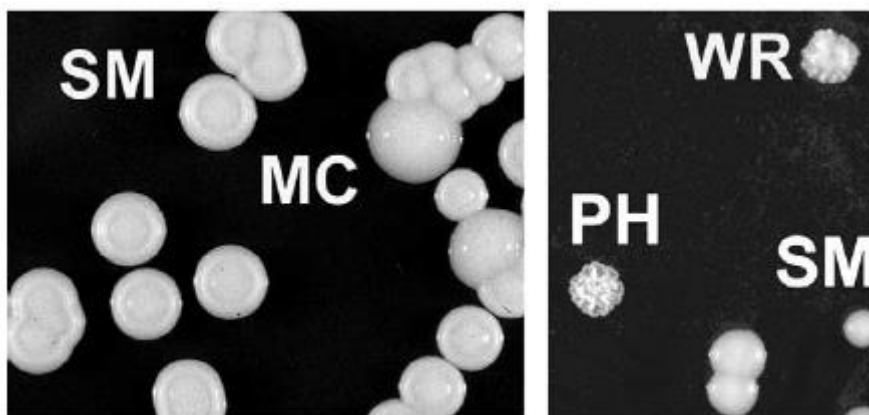
2.1.2 Přepínání fenotypů u kvasinky *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans je patogenní kvasinka, které způsobuje závažné zdravotní problémy a chronické infekce. Na povrchu kvasinek je unikátní polysacharidové pouzdro, které je také hlavním virulentním faktorem. Toto pouzdro chrání buňky před fagocytózou imunitním systémem hostitele (Bulmer & Sans, 1968).

Bylo prokázáno, že *Cryptococcus neoformans* přepíná z hladké morfologie do vrásčité podobně jako *Candida albicans*. Různé rody *Cryptococcus* přepínají fenotyp do odlišně strukturovaných morfologických forem, například do zoubkované, pseudohyfální a hlenovité. Nejčastěji dochází k přepnutí do hlenovité morfologie (Fries et al., 2002).

2.1.2.1 Morfologické formy *Cryptococcus neoformans*

Hladká morfologie se vyznačuje jednotným povrchem bez filametnárních úvarů a hladkými hranami kolonie. Vrásčité mají strukturovanější povrch a okraje kolonie jsou členité. Pseudohyfální jsou výrazně vrásčité jak na povrchu, tak i po okrajích kolonie (Obr. 2). Vrásčité kolonie jsou schopné i zpětného přepnutí do hladkého fenotypu.



Obr. 2: Jednotlivé druhy morfologie kolonií *Cryptococcus neoformans*. SM-hladké, MC-hlenovité, PH-pseudohyfální, WR-vrásčité. Převzato z Fries et al., 2002.

Přepínání fenotypů doprovází změny mikroarchitektury kolonie a také změny tvaru buněk. Například pseudohyfální kolonie mají buňky výrazně prodloužené na rozdíl od hladkých, které jsou tvořeny převážně symetrickými kulovitými buňkami.

Změnu morfologie kolonie také doprovází změny v adhezi buněk k agaru. Dochází pravděpodobně k cílené sekreci polysacharidů na povrch buněk, které umožňují lepší adhezi k podkladu. Další změny jsou ve velikosti kapsulárních útvarů (pouzder). Buňky ve vrásčitých a hlenovitých koloniích mají mnohem větší pouzdra oproti rodičovským hladkým kmenům. Naopak pseudohyfální buňky mají o poznání menší pouzdra. To zřejmě souvisí s faktem, že při přepnutí fenotypu se mění též virulentní schopnost (Fries et al., 1999; Goldman & Fries, 1998; Fries et al., 2002).

2.2 Přepínání fenotypů u *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je primárně nepatogenní kvasinka. Byly ale pozorovány i formy, které mohou způsobovat vážné infekce u dlouhodobě hospitalizovaných a oslabených jedinců (Byron et al., 1995).

V Laboratoři biologie kvasinkových kolonií byly studovány divoké kmeny *Saccharomyces cerevisiae* izolované z přírodního prostředí vykazující tzv. vrásčitou morfologii. Pěstováním na bohatém mediu za stálých laboratorních podmínek dochází ve zvýšené frekvenci přepnutí na hladký fenotyp. Mění se tvar buněk, prodloužené buňky vrásčitých kolonií jsou nahrazeny kulovitými v hladkých koloniích.

Přepínání z vrásčité morfologie na hladkou se nezdá být výsledkem mutací, ale cílenou adaptací na stále podmínky a dostatek živin (Kuthan et al., 2003).

2.2.1 Charakteristika vrásčitých kolonií *Saccharomyces cerevisiae*

Vrásčité kolonie vykazují strukturovanou morfologii a navíc obsahují velké množství ECM. Označení „vrásčité“ souvisí s tvorbou různých záhybů a fibrilárních struktur, které jsou navzájem propojené a tvoří vrásčitý povrch kolonie. U vrásčitých kolonií se vyskytuje typický tvar buněk, které jsou oválné až prodloužené (Obr. 3). Tyto prodloužené buňky mohou tvořit krátké pseudohyfy. Vrásčité kolonie jsou v průměru větší než hladké a obsahují až 3x větší obsah vody.

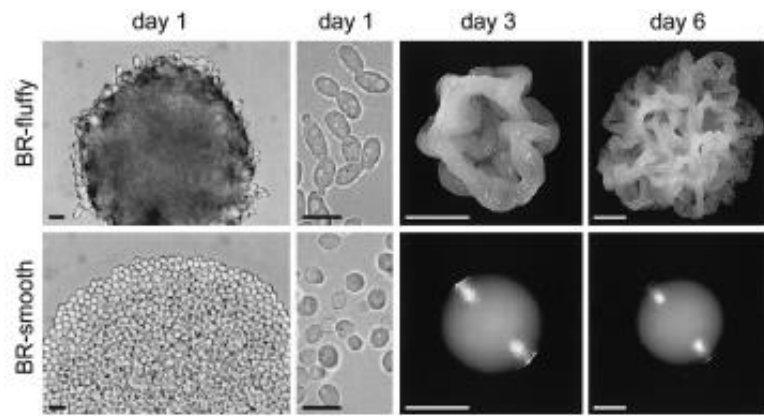
Po opatrném smytí kolonie z živné půdy je možné vidět stopy kolonií zanechané v agaru (Šťovíček et al., 2010). V kolonii je významná exprese genu *FLO11* a to se projevuje silnější adhezí k povrchu. *FLO11* je také zodpovědný za pseudohyfální a invazivní růst. Vykazují také vyšší expresi genu *AQY1* (Kuthan et al., 2003), který kóduje aquaporin, jehož hlavní funkce je zprostředkovávat transport vody (Bonhivers, 1998).

Vrásčité kolonie zahrnují například kmeny BR-F, BR-99-F, BR-88-F a BR-103-F odvozené z divokých kmenů BR-99, BR-88 a BR-103 izolovaných z různých přírodních prostředí. Je možné také pozorovat přechod mezi vrásčitými a hladkými koloniemi, tzv. polo-vrásčité kolonie. Tyto kolonie jsou méně strukturované a obsahují i menší množství ECM než vrásčité (Šťovíček et al., 2010).

2.2.2 Charakteristika hladké kolonie *Saccharomyces cerevisiae*

Hladké kolonie zahrnují například kmeny BR-S, BR-99-S, BR-88-S a BR-103-S. Hladké kolonie nemají výrazně strukturovaný povrch ani okraje. Buňky hladké kolonie jsou kulovitého tvaru a jsou umístěny blízko u sebe bez propojení pomocí ECM (Obr. 3). Ačkoliv kolonie hladkého kmene zabírají menší teritorium, vyskytuje se v nich více buněk na jednotku biomasy než u vrásčitých kolonií (Šťovíček et al., 2010).

Kolonie BR-S vykazují jinou genovou expresi než vrásčité kolonie kmene BR-F. Změny genové exprese se týkají hlavně genů, jejichž proteinové produkty hrají roli v metabolismu a transportu sacharidů, transportu inositolu, homeostázy železa, reakci na environmentální stres a u genů kódujících proteiny buněčné stěny a aquaporiny (Kuthan et al., 2003).



Obr. 3: Porovnání vrásčité (BR-fluffy) a hladké (BR-smooth) morfologie kolonií různého stáří rostoucích na GM mediu. Dobře patrná je odlišná morfologie buněk u hladkých a vrásčitých kolonií. Převzato z Kuthan et al. 2003.

3. Výskyt ECM

Změna fenotypu kolonií je spojena se změnami obsahu extracelulární matrix, která obaluje kolonii. Výskyt ECM byl mimo jiné prokázán u vrásčitých a prstencovitých kolonií *Candida albicans* (França et al., 2011), *Cryptococcus neoformans* (Martinez & Casadevall, 2006) a u vrásčitých kolonií *Saccharomyces cerevisiae* (Šťovíček et al., 2010; Kuthan et al., 2003). Pro vrásčité kolonie je charakteristický výskyt extracelulární hmoty, která se nachází mezi jednotlivými buňkami a obaluje celou kolonii (Douglas, 2003). U hladkých kolonií ECM nebyla pozorována.

To může např. u *Saccharomyces* souviset s tzv. domestikací divokých kmenů, kdy vrásčité kolonie přecházejí do hladké morfologie a mění schopnost tvorby ECM (Kuthan et al., 2003). Jeden z důvodů proč hladké kolonie neprodukují ECM, může být fakt, že samotná tvorba je velmi energeticky náročná a ve stálých životních podmínkách laboratoře zřejmě není ochrana kolonií a biofilmů nutná.

3.1 Výskyt extracelulární matrix u *Candida albicans*

Candida albicans je kvasinka vyskytující se v přírodním prostředí, ale i jako komenzál trávicího traktu. Za určitých podmínek (jako je např. oslabení imunitního systému, léčba antibiotiky) se však z neškodného komenzála může stát nebezpečný patogen, který způsobuje vážné zdravotní potíže a dokonce i smrt (Hawser et al., 1998; Douglas, 2003).

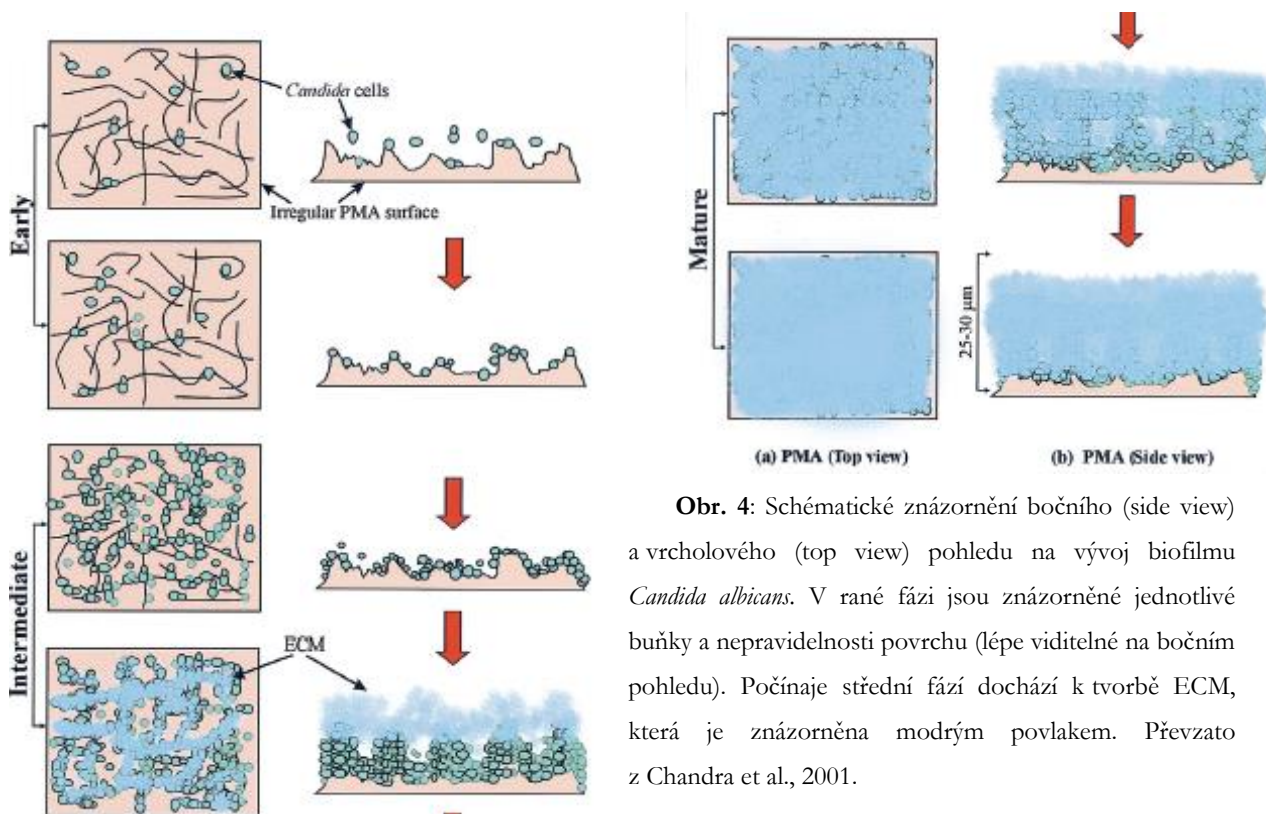
Ultrastrukturní analýzou bylo objeveno, že většina buněk je prakticky překryta vrstvou extracelulární matrix. Zejména v místech, kde dochází k různým poklesům u prstencovitých a vrásčitých kolonií, se hojně vyskytuje ECM (França et al., 2011).

V časových údajích o počátku tvorby ECM se jednotliví autoři liší. Rozdílnost může být dána faktem, že jsou srovnávány časové údaje tvorby ECM u kolonií a u biofilmů, u kterých může dojít k dřívějšímu nástupu tvorby ECM.

Zajímavé je, že podle Franço (2011) je výskyt ECM, na rozdíl od biofilmů, prokázán až u kolonií starších 2 dny, u mladších kolonií se ECM netvoří. Při postupném vývoji biofilmu se množství extracelulární matrix zvětšuje a z původně malých úseků mezi buňkami se tvoří ucelená vrstva matrix nejen v místech, kde jsou výrazné poklesy hmoty kolonie. Nejvíce ECM se vyskytuje v centrálním důlku kolonie (França et al., 2011).

Podle Chandry a kolektivu (2001) *Candida albicans* vykazuje 3 rozdílné stupně vývoje biofilmu, které souvisí s vývoje extracelulární hmoty. Je to raná fáze, kterou charakterizuje vývoj od prvotní adheze k povrchu až po pár hodin starého biofilmu. Střední fázi je přibližně první den vývoje biofilmu. Poslední fázi vývoje biofilmu je maturace, která probíhá u jeden až tři dny

starého biofilmu (Obr. 4). V počáteční fázi vývoje se většina buněk vyskytuje ve formě blastospor, které adherují k povrchu. Již u pár hodin starého biofilmu jsou zřetelné mikrokolonie přichycené k povrchu, které následně tvoří tenkou vrstvu agregovaných buněk. Tyto buňky netvoří ECM. Ve střední fázi vývoje, se začíná tvořit extracelulární materiál, který je pozorovatelný jako film na povrchu mikrokolonií. V období maturace vzrůstá množství extracelulárního materiálu v čase, až kompletně uzavře kolonii (Chandra et al., 2001).



Obr. 4: Schématické znázornění bočního (side view) a vrcholového (top view) pohledu na vývoj biofilmu *Candida albicans*. V rané fázi jsou znázorněny jednotlivé buňky a nepravidlosti povrchu (lépe viditelné na bočním pohledu). Počínaje střední fází dochází k tvorbě ECM, která je znázorněna modrým povlakem. Převzato z Chandra et al., 2001.

Jednotlivé fáze vývoje biofilmu a jejich výsledné morfologie se významně neliší za různých podmínek. Například při změně media na živnou půdu podporující přednostně pseudohyfální růst namísto růstu blastospor nedochází ke změně metabolické aktivity kolonií ani se nemění hmotnost suché biomasy. Z toho vyplývá, že tvorba biofilmu není závislá na morfologii buněk. Experimenty *in vivo* bylo dokázáno, že biofilmy mají stejnou strukturu na intravenózních katetech. Přes všechny tyto podobnosti jsou biofilmy velmi heterogenní, co se týče architektury a uspořádání buněk (Chandra et al., 2001).

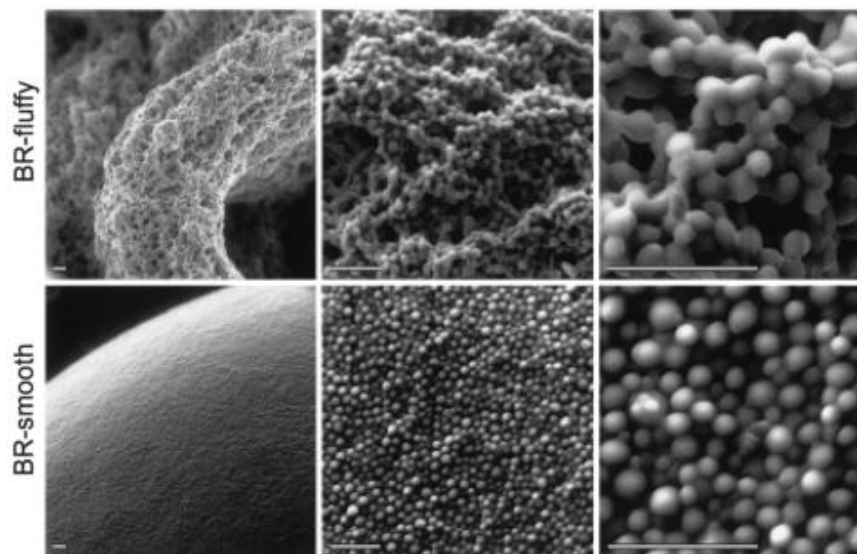
3.2 Výskyt extracelulární matrix u *Cryptococcus neoformans*

Podobně jako u *Candida albicans* byl sledován vývoj biofilmu a tvorba ECM u *Cryptococcus neoformans*. Byly dokonce pozorovány podobné fáze vývoje biofilmu. Extracelulární hmota se začala objevovat ve fázi maturace u jedno až dvoudenních biofilmů. Biofilmy se s vývojem ECM stávají komplexnější, kompaktnější a mají i větší adhezi (Martinez & Casadevall, 2006).

3.3 Výskyt extracelulární matrix u *Saccharomyces cerevisiae*

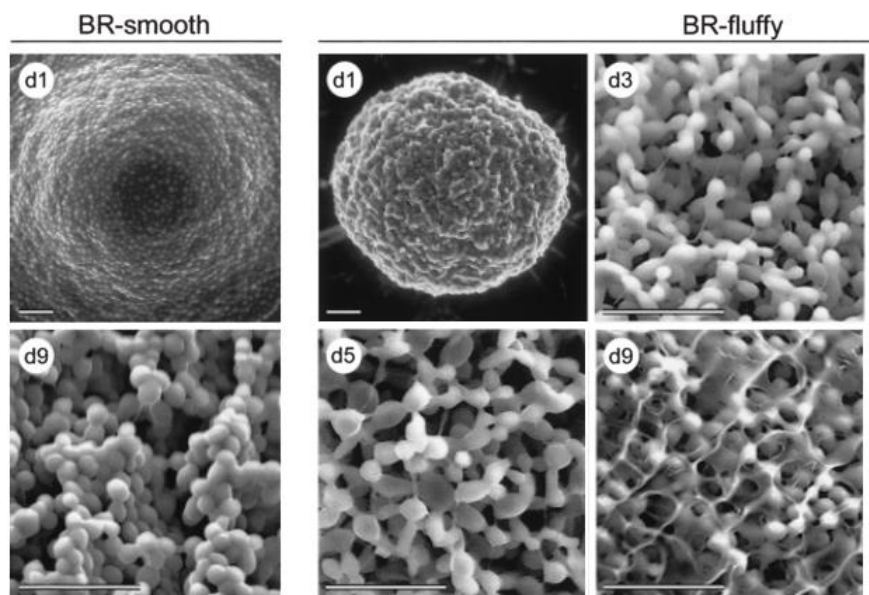
Při sledování divokých a domestikovaných kolonií *Saccharomyces cerevisiae* byly pozorovány výrazné rozdíly. Již u velmi mladých (1 den starých) kolonií je vidět rozdíl v strukturovanosti kolonie vrásčité a hladké morfologie (Obr. 3).

U hladkých kolonií nebylo pozorováno propojení buněk pomocí ECM. Buňky jsou spíše nahloučené u sebe bez spojovacího materiálu a prázdných prostor (Obr. 5). U vrásčitých kolonií bylo pomocí environmentální skenovací elektronové mikroskopie detekováno velké množství extracelulární matrix jako spojovacího materiálu mezi jednotlivými buňkami (Obr. 6). ECM tvoří vláknitou síť, která propojuje jednotlivé buňky (Kuthan et al., 2003).



Obr. 5: Povrch vrásčité (BR-fluffy) a hladké (BR-smooth) kolonie studovaný pomocí environmentální skenovací elektronové mikroskopie při různém zvětšení. Převzato z Kuthan et al., 2003.

Při studiu propojení pomocí ECM bylo objeveno, že hmota je pozorována u mladých vrásčitých kolonií a její množství stoupá se stářím kolonií (Obr. 6). Ve starších koloniích lze pozorovat vrstvu extracelulárního materiálu, která uzavírá kolonii (Kuthan et al., 2003).



Obr. 6: Ultrastruktura vrásčitých (BR-fluffy) a hladkých (BR-smooth) kolonií rostoucích na GM mediu v rozdílných fázích jejich vývoje (d označuje stáří kolonií v dnech). Zkoumáno pomocí environmentální skenovací elektronové mikroskopie. Převzato z Kuthan et al., 2003.

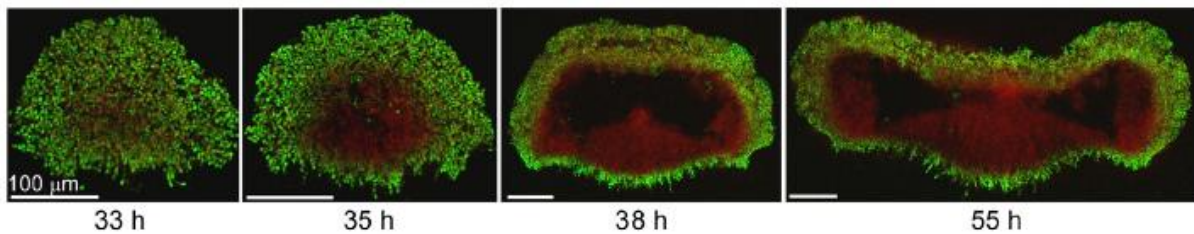
V extracelulární matrix se nachází velké množství proteinů, které nejsou kovalentně vázané na buněčnou stěnu kvasinek. To dokazuje například možnost jednoduchého vymytí proteinů pomocí fosfátového pufru (PBS). Neukotvené proteiny jsou smyty a zachyceny v použitém PBS pufru. Hlavní složkou extraktu z kolonií kmene BR-F vymytých pomocí PBS pufru, je materiál proteinové povahy o molekulové hmotnosti nad 200 kDa. To, že se jedná o materiál proteinové povahy, bylo prokázáno jeho štěpitelností pomocí proteinázy K (Kuthan et al., 2003), která má silnou proteolytickou aktivitu (Ebeling et al., 1974).

Ukázalo se, že proteiny obsažené v ECM jsou bohatě glykosylovány. To znamená, že u nich proběhla posttranslační modifikace v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu, kde na ně byly navázány oligosacharidové zbytky. Glykosylace proteinů byla ověřena barvením gelu pomocí concanavalinu A (Kuthan et al., 2003). Concanavalin A je znám silnou vazbou na glykosidy (Hawkes, 1982).

3.3.1 Tvorba extracelulární matrix u vrásčité kolonie *Saccharomyces cerevisiae*

Při sledování exprese fúzních genů s GFP a indukibilním promotorem bylo pomocí induktorů dodávaných do media pozorováno, že existují určité úseky v kolonii, kam se induktor nemůže dostat a fúzní protein s GFP se neexprimuje. Pravděpodobná příčina může být nepropustná ECM, která brání průchodu induktoru k buňkám uvnitř kolonie (Váchová et al., 2011).

Pomocí těchto induktorů byl sledován postupný vývoj a tvorba ECM v rostoucí kolonii. U 33-35 hodin staré kolonie se začíná tvořit málo propustná vrstva ECM v centrální oblasti blízko agaru a tvorba této ECM se rozšiřuje postupně do celé kolonie (Obr. 7, Obr. 8). V této oblasti se buňky dělí a dále produkují matrix, která brání prostoupení molekul induktorů, jako je galaktóza a měďnaté ionty. Stejným principem brání i propouštění jiných škodlivých molekul (Váchová et al., 2011).



Obr. 7: Vývoj ECM v různých časech vývoje kolonie. Zeleně: buňky, ke kterým se dostal induktor, který spustil expresi genu s fúzaným GFP ve formující se kolonii. Červeně: autofluorescence všech buněk v kolonii, které jsou v přímém kontaktu s ECM kolonie. Převzato z Váchová et al., 2011.



Obr. 8: Schématický model rozmístění nepropustné ECM (žlutě) a buněk v kolonii (šedě) u 3 dny staré kolonie Váchová et al., 2011.

4. Složení ECM

Majoritní složkou extracelulární matrix jsou polysacharidy, jejichž nejhojnější složkou je glukóza. Neméně významnou složkou jsou proteiny. Dále se v hmotě vyskytuje fosfor, voda, dvojmocné kationty a nukleové kyseliny. Některé analýzy prokázaly přítomnost acetylových zbytků, kyseliny močové a dalších kyselin (Baillie & Douglas, 2000). Složení ECM se u různých druhů mikroorganismů liší, je tedy druhově specifické (Bales et al., 2013). Nicméně i u populací stejného druhu se mohou poměry jednotlivých složek lišit. Základní složky jsou obsažené u většiny rodů v různých procentuálních zastoupeních (Baillie & Douglas, 2000).

Při studiu zastoupení polysacharidů a proteinů ECM u různých *Candida* rodů byla potvrzena rodová specifická. ECM *Candida parapsilosis* obsahuje poměrně velké množství polysacharidů a relativně malé množství proteinů. Naproti tomu *Candida tropicalis* obsahuje malé množství jak polysacharidů, tak i proteinů a *Candida glabrata* obsahuje velké zastoupení obou složek. Množství proteinů se může lišit u stejného rodu, ale jiných druhů až pětinašobně (Silva et al., 2009).

Candida albicans vykazuje různé zastoupení jednotlivých složek v porovnání extracelulární polymerní hmoty u planktonních buněk a biofilmů. U planktonních buněk tvoří většinu hmoty polysacharidy (86%, z toho 4,7% glukóza) a dále proteiny (8%) a fosfor (0,3%). Naproti tomu v biofilmu jsou polysacharidy obsaženy ve výrazně menším množství (41%). Asi 16 až 32% polysacharidů tvoří glukóza, což je v porovnání s extracelulární hmotou planktonních buněk významný rozdíl (Baillie & Douglas, 2000; Al-Fattani & Douglas, 2006).

4.1 Polysacharidy

Nejobsáhlejší složkou ECM jsou polysacharidy. Polysacharidy jsou dlouhé lineární řetězce monosacharidů spojených glykosidickou vazbou. Řetězce mohou být různě větvené. Podle typů jednotlivých monosacharidů se dělí na homopolysacharidy, které obsahují opakující se monosacharidy jednoho druhu, a heteropolysacharidy, kde se opakují různé druhy. Bohaté větvení polysacharidových řetězců umožňuje vytvořit velkou kapacitu pro zachytávání vody (Flemming & Wingender, 2010; Pavlova et al., 2005).

Polysacharidy se uplatňují v adhezi buněk jedna k druhé. Molekuly polysacharidů obsažené v ECM jsou schopné vázat některé škodlivé látky a tím zabraňují jejich průniku k samotným buňkám (Billings et al., 2013). Jelikož je v ECM polysacharidů velké množství, tvoří strukturální kostru celé hmoty obklopující jednotlivé buňky (Nett et al., 2007; Hawser et al., 1998; Al-Fattani & Douglas, 2006). Některé polysacharidy mohou dokonce hrát důležitou roli v buněčné signalizaci, jako například Psl polysacharid u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, který indukuje tvorbu

intracelulárního druhého posla cGMP a ten přes pozitivní zpětnou vazbu iniciuje další tvorbu polysacharidů (Irie et al., 2012). Je velmi pravděpodobné, že podobné signální mechanismy se nacházejí i u kvasinek.

4.1.1 Polysacharidy u rodu *Candida*

U *Candida albicans* je hlavní složkou monosacharidů extracelulární hmoty glukóza, která tvoří až 19,3% suché hmoty ECM. S menším zastoupením se v ECM také vyskytuje galaktóza (3,1%) a manóza (9%). Dále byl v hmotě v malém množství (3%) detekován také hexosamin (Baillie & Douglas, 2000).

V matrix *Candida albicans* byla prokázána výrazná aktivita enzymu β -1,3 glukonázy, která hydrolyzuje β -1,3 glukon. Při působení β -1,3 glukonázy výrazně klesá množství ECM v biofilmu (Al-Fattani & Douglas, 2006) a u mutantních kmenů s deletovanými geny pro tvorbu glukonu se mění architektura biofilmu i celkový vzhled ECM (Taff et al., 2012). To poukazuje na fakt, že ECM obsahuje velké množství β -1,3 glukonu (Al-Fattani & Douglas, 2006; Nett et al., 2007), který je také hlavní složkou buněčné stěny (Orlean, 2012).

Hexosamin tvoří majoritní složku polysacharidů v *Candida tropicalis* namísto glukózy. V ECM zaujímá 27% (Al-Fattani & Douglas, 2006). Hexosamin je polysacharid β -1,6 vazbou spojených N-acetylglukosaminových zbytků obsahující deacetylované amino skupiny, sukcinát a fosfát. Na hexosamin bohaté ECM jsou zřejmě více odolné proti antibiotikům, protože je pro ně mnohem méně propustná než například ECM, kde je majoritní složkou glukóza jako např. u *Candida albicans* (Al-Fattani & Douglas, 2006).

4.1.2 Polysacharidy u *Saccharomyces cerevisiae*

Analýzou ECM *Saccharomyces cerevisiae* bylo prokázáno, že až 20% ze všech podjednotek polysacharidů tvoří hexózy. Nejčastější podjednotka je glukóza, která tvoří až 60% obsahu hexóz. Další je galaktóza, která zaujímá 32% podjednotek. Nicméně galaktóza je u *Saccharomyces cerevisiae* neobvyklá a její hojný výskyt ve studované ECM může být způsoben přidáním galaktózy do media a jejím zainkorporováním do extracelulární hmoty. Třetí nejčastější podjednotka je manóza, tvořící až 8% monosacharidů. Etanolem vysrážená frakce je tvořena z 90% manózou a z 10% glukózou (Beauvais et al., 2009).

Z výše zmíněné analýzy vyplývá, že ECM *Saccharomyces cerevisiae* je složena převážně z glukózy a rozvětvené manózy. Jednotlivé monosacharidy jsou sekretovány specificky a spojují se β -1,6, β -1,3 a β -1,2 glykosidickými vazbami do polymerů (Beauvais et al., 2009).

4.2 Proteiny

ECM obsahuje také velké množství proteinů. Některé z nich mohou být kovalentně spojené s buněčnou stěnou, například pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI kotva), která je připojena na C-konci proteinu a do mezibuněčného prostoru vyčnívají volné N-konce proteinů. Další proteiny nejsou pevně ukotveny a asociovány s buněčnou stěnou, nebo plazmatickou membránou (Kuthan et al., 2003).

Proteiny v mezibuněčné hmotě plní různé funkce. Jsou to například degradující enzymy, které degradují látky přijímané z okolí, nebo i vlastní ECM. Dále se v matrix vyskytují ECM-modifikující enzymy, které pozměňují strukturu hmoty a strukturální proteiny tvořící kostru biofilmu. Proteiny nacházející se v ECM hrají důležitou roli v agregaci či adhezi jednotlivých buněk a v tvorbě biofilmů (Flemming & Wingender, 2010).

Dále se v extracelulární hmotě mohou nacházet proteiny, které ovlivňují schopnost kolonizace odlišného prostředí a virulenci některých patogenních kvasinek. Tyto proteiny mohou remodelovat a degradovat různé složky prostředí nebo také okolní tkáň hostitele a umožňují tak výhodnější kolonizaci. Mohou to být různé hydrolytické enzymy, například aspartyl proteázy zvané Sap (Koelsch et al., 2000; Naglik et al., 2004). Některé tyto enzymy jsou přichyceny k buňce pomocí GPI kotvy (Monod et al., 1998).

Nejvýznamnější proteiny extracelulární matrix jsou adhezíny, které zprostředkovávají přichycení buněk k povrchům agaru i jiným materiálům a spojují jednotlivé buňky mezi sebou. U *Candida albicans* to jsou hlavně Als proteiny a dále také Hwp1p, Eap1p a Csh1p (Chaffin & López-Ribot, 1998). U *Saccharomyces cerevisiae* plní tuto funkci zejména proteiny Flo a také aglutininy (Dranginis et al., 2007).

4.2.1 Als proteiny *Candida albicans*

Als (agglutinin-like sequence) proteiny zprostředkovávají adhezi k epitelům, agregaci kvasinkových buněk a formování biofilmů (Dranginis et al., 2007).

Geny pro Als proteiny jsou členěny do 3 domén. C-koncová část proteinu je glykosylovaná a obsahuje oblast bohatou na serin a threonin. Na C-konci je také GPI kotva, která kotví protein k buněčné stěně. N-konec tvoří konzervované domény antiparalelních β -skládaných listů o stejné sekvenci a délce napříč genovou rodinou. Centrální oblast genu se skládá z tandemových repetití vysoce konzervované struktury. Als genová rodina zahrnuje 8 genů: *ALS1* – *ALS7* a *ALS9*. U *ALS8* se ukázalo, že se jedná o stejný gen jako *ALS3*, proto byl odebrán z názvů genů této genové rodiny. V různých kmenech se vyskytují odlišné alelické formy jednotlivých proteinů (Hoyer et al., 2001; Zhao, 2003; Sheppard et al., 2004).

Als proteiny je možné rozdělit do 3 skupin, kde se každá skupina liší hydrofobicitou, nábojem a potenciálem tvořit vodíkové můstky. Jednotlivé Als proteiny se liší ve specifitě adheze. Skupina A zahrnuje Als1p, Als3p a Als5p a je zodpovědná za adhezi například ke kolagenu a epiteliálním buňkám. Als5p je zodpovědný na agregaci buněk. Ve skupině B jsou proteiny Als6p a Als7p. Als2p, Als4p a Als9p tvoří skupinu C a jsou strukturně odlišné od předešlých dvou skupin (Sheppard et al., 2004; Filler, 2006).

4.2.2 Flo proteiny *Saccharomyces cerevisiae*

Flo proteiny se nacházejí v mezibuněčném prostoru, kde plní svoji funkci adhezivních molekul. Flo proteiny mají podobnou strukturu jako Als proteiny u *Candida*. C-konec proteinu je kovalentně nebo přes GPI kotvu vázán k buněčné stěně kvasinky (Caro et al., 1997) a N-konec, obsahující lektinovou doménu, váže sacharidové zbytky okolních buněk (Dranginis et al., 2007). Flo proteiny jsou vysoce glykosylované a obsahují centrální oblast bohatou na serin a threonin. (Douglas et al., 2007). Funkce Flo proteinů je zprostředkovávat adhezi mezi buňkami a buněk k povrchu vedoucí k flokulaci a případně i k invazivnímu nebo pseudohyálnímu růstu (Lo & Dranginis, 1998; Verstrepen & Klis, 2006).

Do Flo rodiny patří proteiny Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p a Flo11p (Teunissen & Steensma, 1995; Lo & Dranginis, 1996).

Proteiny Flo1p, Flo5p, Flo9p a Flo10p jsou nazývány flokulíny, protože zprostředkovávají hlavně adhezi jedné buňky k druhé. Funkce flokulínů je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů (Verstrepen & Klis, 2006). Geny *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* a *FLO10*, ze kterých jsou tyto proteiny exprimovány, jsou částečně sekvenčně homologní (Caro et al., 1997). Při expresi genu *FLO1* výrazně stoupá agregace buněk. Byl dokonce prokázán úzký vztah s transkripcí *FLO1* a množstvím extracelulární hmoty na povrchu buněk nad buněčnou stěnou. Při delecí *FLO1* se netvoří žádná ECM a různé úrovně transkripce korelují s množstvím ECM. Nicméně ECM není nezbytná pro flokulaci (Beauvais et al., 2009).

Expresí proteinu Flo11p z genu *FLO11* je typická pro tvorbu pseudohyfy a prakticky chybí u kvasinkových forem buněk (Guo et al., 2000). *FLO11* pravděpodobně má i vztah k strukturovanosti vrásčité kolonie, protože u hladkých kolonií jeho exprese není významná a je dokázán přímý vztah množství mRNA *FLO11* se složitostí strukturovanosti kolonie. Dále také u vrásčitých kolonií zprostředkovává adhezi k agaru, díky čemuž kolonie nejde tak snadno smýt a zanechává výrazné stopy v agaru (Šťovíček et al., 2010). *FLO11* vykazuje významný polymorfismus, který souvisí s různou schopností vytvářet biofilmy (Zara et al., 2009).

Gen *FLO8* je transkripční aktivátor *FLO1* (Kobayashi et al., 1996) a *FLO11* (Rupp et al., 1999).

4.3 eDNA

eDNA je extracelulární DNA pojmenována podle ECM, která se nachází v extracelulárním prostoru biofilmů. Její výskyt byl dokázán pomocí aktivity přidaných DNáz. eDNA nebyla prokázána u všech druhů kvasinek tvořících ECM. Například u *Candida tropicalis* nebyl zaznamenán žádný efekt DNázy I, která se využívá pro detekci DNA (Al-Fattani & Douglas, 2006).

Množství eDNA v ECM je ovlivněna složením media, na kterém kvasinky rostou. Případně je možné, že určité podmínky dané specifickým mediem a obsahem živin způsobují větší akumulaci eDNA v matrix. Aktivita přidaných DNáz, které by dokazovaly přítomnost eDNA, nebyla prokázána u kolonií mladších 2 dnů. To naznačuje fakt, že u mladých kolonií se eDNA netvoří a nemá žádnou funkci. U dva dny staré kolonie se eDNA začne akumulovat v ECM a dále má významnou funkci v maturaci biofilmu. eDNA má pravděpodobně v ECM u starších biofilmů důležitou funkci v udržování integrity a stability biofilmu. To je prokázáno přidáním DNáz, kdy byl zaznamenán signifikantní úbytek hmoty biofilmu (Martins et al., 2010).

Původ eDNA není znám, nicméně existují 3 hypotézy pravděpodobného původu eDNA u bakterií. První z nich říká, že je to DNA zbylá po lýzi subpopulací v biofilmu (Allesen-Holm et al., 2006). Druhá hypotéza tvrdí, že DNA je uvolňována z živých buněk pomocí membránových váčků (Renelli, 2004; Whitchurch et al., 2002). Poslední hypotéza je založena na aktivní sekreci DNA do ECM (Hara & Ueda, 1981). Nejpravděpodobnější hypotéza je, že eDNA je DNA zbylá po lýzi buněk. Southern blot analýza ukázala, že eDNA je shodná s chromosomální DNA buněk přítomných v kolonii (Vilain et al., 2009; Rajendran et al., 2013). Bylo také dokázáno, že při tvorbě ECM v biofilmu jsou umlčovány geny, které kódují represory lýze buněk. To má za následek hojnější lýze buněk a vzrůst množství eDNA (Pammi et al., 2013).

Velké množství eDNA je zaznamenáno u buněk ve stacionární fázi, kde by velký obsah mohl být způsoben buněčnou smrtí, lýzí buněk a vylití buněčné DNA do extracelulárního prostoru (Martins et al., 2010).

eDNA může přispívat k pevnosti ECM a tím i k větší odolnosti celého biofilmu (Hu et al., 2012). Při použití DNáz během vývoje biofilmu dojde ke snížení schopnosti adheze a agregace buněk k povrchu a dalším buňkám, to dokazuje významnou roli eDNA ve stabilitě celého biofilmu (Pammi et al., 2013).

eDNA tvoří organizované filamentární struktury, podobné organizaci polysacharidů a je spojená s dalšími složkami ECM. Toto spojení je ovlivňováno změnou pH (Hu et al., 2012). eDNA může také spojovat jednotlivé buňky, což podporuje hypotézu, že eDNA je důležitá pro stabilitu biofilmu. Pro prokázání této domněnky byly realizovány pokusy, které pracovaly se

železem indukovanou tvorbou eDNA v ECM. S nedostatkem železa se tvořilo i malé množství eDNA, což se projevilo v poklesu celkové stability a menším množstvím biomasy biofilmu oproti biofilmům s větším množstvím eDNA (Yang et al., 2007). Další pokusy byly zaměřeny na gen *cidA* u bakterie *Staphylococcus aureus*, který za určitých podmínek podporuje lýzi buněk. Pomocí delece genu *cidA*, se snížila lýze buněk (po smrti buněk nedocházelo k lýzi) a tedy i klesl celkový obsah eDNA v biofilmu. Biofilmy s delecí v genu *cidA* měli až 2,5 krát slabší biofilmy než biofilmy s funkčním genem (Rice et al., 2007).

4.4 Dvojmocné kationty

Významný podíl extracelulární matrix tvoří také dvojmocné kationty. Jsou to především Ca^{2+} a Mg^{2+} . Jejich hlavní role je adheze a stabilita matrix. Jde o adhezi v rámci matrix k buňkám, ale také o vzájemnou adhezi jednotlivých složek ECM. Po odstranění dvojmocných kationtů z matrix např. pomocí chelatačního činidla EDTA, dochází k destabilizaci celého biofilmu (Sheng et al., 2006).

To platí i u jednotlivých složek ECM. Například lektínová doména proteinu Flo1p je Ca^{2+} dependentní a po přidání EDTA dochází k deflokulaci a tedy k přerušení vazby mezi lektínovou doménou Flo1p a sacharidovými zbytky okolních buněk. Navíc dochází k odpoutání ECM. Hlavním důvodem je odstranění Ca^{2+} iontů, díky kterým Flo1p účinně adhezuje buňky k sobě. Po odstranění EDTA a opětovném přidání Ca^{2+} , Flo1p obnoví vazbu mezi buňkami a to způsobí opětovnou agregaci buněk. To lze dokázat opětovným odebráním a přidáním EDTA společně s přidáváním Ca^{2+} . Po mnoha takovýchto procedurách dochází k vymizení vrstvy ECM, přestože Flo1p stále účinně drží buňky v těsné blízkosti. To poukazuje na to, že ECM je k buněčné stěně buněk přichycena pravděpodobně jen pomocí slabých chemických interakcí, jako jsou například elektrostatické interakce nebo vodíkové můstky (Beauvais et al., 2009; Dranginis et al., 2007).

Buňky mají přirozeně záporný náboj, kvůli němuž se odpuzují a nemohou koexistovat v těsné blízkosti. Většina starších buněk je ale obklopena extracelulární matrix s rozdílným rozložením nábojů, což umožňuje přiblížení a vazbu buněk k dalším buňkám a tvoří tak stabilní a pevný útvar (Li & Yang, 2007).

5. Význam extracelulární matrix

Extracelulární matrix může být charakterizována množstvím a hustotou vytvořeného materiálu. Tyto dva parametry vymezují vlastnosti ECM a určují výhody, které matrix poskytuje buňkám. Vznik ECM není jednoduše vysvětlitelný evoluční selekcí. Buňky produkující matrix se pomaleji dělí a biomasa tak roste pomaleji, což se může zdát nevýhodné. Nicméně tuto zdánlivou nevýhodu kompenzují výhody spojené s různými funkcemi extracelulární matrix. Čím je kolonie starší, tím více ECM se v ní vyskytuje a matrix tak dokáže lépe vykonávat různé funkce (např. obranné, ochranné, adhezivní a zásobovací).

5.1 Kompetice

I přes nižší růstovou rychlost mohou mikroorganismy produkující ECM rychleji kolonizovat prostředí a zároveň chránit buňky uvnitř společenstva. Například u divokých kmenů kvasinek bylo pozorováno, že jejich kolonie zabírají větší plochu při menším počtu buněk. Dochází tedy v první řadě ke kolonizaci většího území a následně k růstu biomasy (Šťoviček et al., 2010). To může poskytovat významnou výhodu při kompetici o prostředí s jinými druhy. Simulace ukazují, že buňky produkující matrix, které rostou ve smíšených populacích, jsou schopny rychleji a účinněji obsazovat nová území. To jim zajišťuje lepší přístup k živinám i ochranu před jinými druhy mikroorganismů (Xavier & Foster, 2007).

5.2 Zdroj energie

Extracelulární matrix může být využita jako zdroj energie při nepříznivých podmínkách a za nedostatku živin. To bylo potvrzeno při studiích zabývajících se biodegradací extracelulárního materiálu (Zhang & Bishop, 2003). U mikroorganismů z aktivovaných kalů autoři pozorovali několik fází biodegradace ECM. Testované buňky začaly po přidání extracelulárních polymerů s jejich degradací a postupně zároveň s produkcí vlastních rozpustných složek ECM. Ve finální fázi buňky kompletně spotřebovaly veškerý degradovatelný extracelulární materiál a jejich metabolická aktivita se snížila. Pozorovaná biodegradace ECM je přímým důkazem, že proteiny a polysacharidy v ní obsažené mohou být využity jako zdroj energie samotnými buňkami, které ECM tvoří, ale také dalšími buňkami, které tuto ECM nevytvořily (Zhang & Bishop, 2003).

Zdá se, že polysacharidy jsou využívány rychleji a ve větší míře než proteiny. To může být způsobeno faktem, že polysacharidů se v ECM přirozeně vyskytuje větší množství než proteinů a jsou také bohatším zdrojem energie a karbohydrátů.

Proces biodegradace vlastní ECM lze považovat za adaptaci buněk žijících dlouho za podmínek hladovění, kdy ECM může být vhodným zdrojem energie i přes případné nedostatky způsobené ztrátou ochranné vrstvy (Zhang & Bishop, 2003; Xavier & Foster, 2007).

5.3 Rezistence a ochranná funkce

Boj s biofilmy tvořenými patogenními kvasinkami je velmi obtížný, protože vykazují mnohem menší reakci na antibiotika použitá v koncentracích účinkujících na planktonické formy. Extracelulární matrix poskytuje buňkám velmi dobrou bariéru, která je chrání před antibiotiky, dalšími vlivy a škodlivými molekulami. Mnohé studie ukazují, že biofilmy jsou 500 až 1000 krát odolnější vůči antibiotikům než planktonní buňky (Hawser & Douglas, 1995; Costerton, 1995).

Způsob, jakým matrix zabraňuje antibiotikům procházet k buňkám, není zatím zcela jasně objasněn. Extracelulární matrix pravděpodobně funguje jako velmi husté síto, které nepropustí nežádoucí molekuly skrz bariéru. Navíc tyto molekuly aktivně zachytává a tím zabraňuje jejich další difúzi. Velkou roli v tomto procesu má pravděpodobně jedna z hlavních složek ECM β -1,3 glukan, který je schopný vázat některá antibiotika (Nett et al., 2011; Al-Fattani & Douglas, 2006; Baillie & Douglas, 2000). S poklesem tvorby β -1,3 glukanu výrazně klesá i vazba antibiotika flukonazolu v ECM (Nett et al., 2010).

Další teorie týkající se rezistence se zakládá na přítomnosti vodných kanálů v celém biofilmu. Je možné, že antibiotika procházejí kanály a k samotným buňkám se dostávají velmi pomalu, v malé koncentraci a naředěné. Dále je možné, že se v ECM nacházejí enzymy, které umí některá antibiotika degradovat nebo neutralizovat (Al-Fattani & Douglas, 2004).

I další složky ECM, podobně jako β -1,3 glukan, mohou zachytávat antibiotika či vychytávat další škodlivé molekuly a díky tomu fungovat jako účinná bariéra (Costerton, 1995).

5.4 Adheze a agregace buněk v biofilmu

Jedna z hlavních funkcí ECM v biofilmu je udržet jednotlivé buňky pohromadě tak, aby mohly spolupracovat na tvorbě biofilmu. Buňky mají záporný náboj, tvorbou a obalením ECM dochází k interakci mezi buňkou a ECM a to umožňuje agregaci buněk (Flemming & Wingender, 2010).

V ECM se nachází množství adhezivních molekul, například proteinové adheziny zmíněné výše, které zajišťují kontakt jednotlivých buněk.

5.5 Zásobárna vody

Zhang se spoluautory zjistili, že ECM je až z 97% tvořena vodou ve formě tzv. hydrogelu (Zhang, X et al., 1998). Voda má v biofilmech velký význam, protože vytváří vhodné prostředí či dokonce dráhy pro difúzní procesy (Schmitt & Flemming, 1999).

ECM tvoří v biofilmech různé prohlubně, otvory a kanály, kudy může proudit voda a další živiny. To zajišťuje stejnoměrný rozvod vody a živin po celém biofilmu a zabraňuje hladovění buněk, které se nacházejí uprostřed. Kanály také propojují vnější a vnitřní prostředí, díky čemuž je zajištěn odvod odpadních látek a příjem živin, kyslíku a vody. Propojení kanálů si lze představit jako primitivní cirkulační systém podobný oběhové soustavě u mnohobuněčných organismů (Costerton, 1995).

Z ECM mohou být také vytvořené dutiny, kde je možné uchovávat vodu po delší dobu, aby v případě sucha mohla být využita buňkami v biofilmu (Flemming & Wingender, 2010). Další možnost zachycení vody je zajištěna polysacharidy, které mají velkou kapacitu pro vazbu vody a dalších látek. Tento systém pomáhá ustavit určitý stupeň homeostáze, optimální vztah mezi jednotlivými buňkami a efektivní výměnu živin (Flemming & Wingender, 2010; Costerton, 1995).

6. Závěr

Extracelulární matrix u mikrobiálních populací je i přes intenzivní výzkum stále ještě zahalena rouškou mnoha tajemství, která čekají na svá odhalení. Díky spojitosti s patogenitou a rezistencí mikroorganismů se stává středem zájmu hlavně farmaceutických společností, nicméně mnoho laboratoří po celém světě se zabývá základním výzkumem týkajícím se samotným složením ECM či způsobem tvorby a dopravy látek do extracelulárního prostoru.

Mnohé aspekty biofilmů a ECM u bakterií a kvasinek jsou si velmi podobné, ale díky rozmanitosti rodů a druhů jsou znatelné rodové odlišnosti. Rozdíly ve složení ECM jsou patrné dokonce i u stejných druhů jako reakce na podmínky různých prostředí, které přímo ovlivňují tvorbu biofilmu.

Bylo prokázáno, že u některých druhů kvasinek dochází k přepínání fenotypů. Dochází tak ke změně morfologie u *Candida* a *Cryptococcus* z hladké na strukturovanou a naopak u *Saccharomyces* přepíná vrásčité morfologie na hladkou. Změny morfologie doprovází i změny v produkci extracelulární matrix. Ta se hojně vyskytuje právě u více strukturovanějších kolonií.

Hlavní složkou ECM jsou polysacharidy. Nejhojnější složkou polysacharidů vyskytující se v extracelulární hmotě je u většiny rodů glukóza. Dále se v matrix vyskytují proteiny, které zde plní různé funkce. Největší význam mají adhezíny, které zprostředkovávají agregaci buněk a ukotvení biofilmů k agaru. Dále se v ECM v menší míře vyskytuje eDNA, dvojmocné kationty a další složky.

Extracelulární matrix přináší biofilmům mnohé výhody. Uplatňuje se v kompetici s jinými mikroorganismy o nové prostředí, může sloužit jako zdroj energie v nepříznivých podmínkách, chrání buňky před antibiotiky a jinými škodlivými molekulami, udržuje buňky ve vzájemné blízkosti a může fungovat jako zásobárna vody.

7. Použitá literatura

- Al-Fattani, M. a and Douglas, L. J. (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance., *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 8), pp. 999–1008.
- Al-Fattani, M. and Douglas, L. (2004) Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9).
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms., *Molecular microbiology*, 59(4), pp. 1114–28.
- Baillie, G. S. and Douglas, L. J. (2000) Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents., *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 46(3), pp. 397–403.
- Bales, P. M., Renke, E. M., May, S. L., Shen, Y. and Nelson, D. C. (2013) Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens., *PLoS one*, 8(6), p. e67950.
- Beauvais, A., Loussert, C., Prevost, M. C., Verstrepen, K. and Latgé, J. P. (2009) Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells., *FEMS yeast research*, 9(3), pp. 411–9.
- Billings, N., Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R. and Ribbeck, K. (2013) The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms., *PLoS pathogens*, 9(8), p. e1003526.
- Blankenship, J. R. and Mitchell, A. P. (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective., *Current opinion in microbiology*, 9(6), pp. 588–94.
- Bonhivers, M. (1998) Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functiona distinctions between laboratory and wild-type strains, *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), pp. 27565–27572.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited., *Trends in microbiology*, 13(1), pp. 20–6.
- Brown, D. H., Giusani, a D., Chen, X. and Kumamoto, C. a (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene., *Molecular microbiology*, 34(4), pp. 651–62.
- Bulmer, G. S. and Sans, M. (1968) *Cryptococcus neoformans* III. Inhibition of phagocytosis, *Journal of bacteriology*, 95, pp. 5–8.
- Byron, J. K., Clemons, K. V, McCusker, J. H., Davis, R. W. and Stevens, D. a (1995) Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice., *Infection and immunity*, 63(2), pp. 478–85.
- Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H. and Klis, F. M. (1997) In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*., *Yeast (Chichester, England)*, 13, pp. 1477–1489.
- Costerton, J. (1995) Microbial biofilms, *Annual Reviews*, 49, pp. 711–45.

- Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces., *Emerging infectious diseases*, 8, pp. 881–890.
- Douglas, L. J. (2003) Candida biofilms and their role in infection., *Trends in microbiology*, 11, pp. 30–36.
- Douglas, L. M., Li, L., Yang, Y. and Dranginis, A. M. (2007) Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion., *Eukaryotic cell*, 6(12), pp. 2214–21.
- Dranginis, A. M., Rauceo, J. M., Coronado, J. E. and Lipke, P. N. (2007) A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions., *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(2), pp. 282–94.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. and Lang, H. (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* Limber., *European journal of biochemistry / FEBS*, 47(1), pp. 91–97.
- Filler, S. G. (2006) Candida-host cell receptor-ligand interactions., *Current opinion in microbiology*, 9(4), pp. 333–9.
- Flemming, H.-C., Neu, T. R. and Wozniak, D. J. (2007) The EPS matrix: the “house of biofilm cells”., *Journal of bacteriology*, 189(22), pp. 7945–7.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix., *Nature reviews. Microbiology*, Nature Publishing Group, 8(9), pp. 623–33.
- França, E. J. G., Andrade, C. G. T. J., Furlaneto-Maia, L., Serpa, R., Oliveira, M. T., Quesada, R. M. B. and Furlaneto, M. C. (2011) Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes., *Micron (Oxford, England : 1993)*, 42, pp. 726–732.
- Fries, B. C., Goldman, D. L. and Casadevall, A. (2002) Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*., *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4(13), pp. 1345–52.
- Fries, B. C., Goldman, D. L., Cherniak, R., Ju, R. and Casadevall, A. (1999) Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure., *Infection and immunity*, 67(11), pp. 6076–83.
- Goldman, D. and Fries, B. (1998) Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(December), pp. 14967–14972.
- Guo, B., Styles, C. a, Feng, Q. and Fink, G. R. (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), pp. 12158–63.
- Hara, T. and Ueda, S. (1981) A study on the mechanism of DNA excretion from *P. aeruginosa* KYU-1. Effect of mitomycin C on extracellular DNA production., *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), pp. 2457–2461.
- Hawkes, R. (1982) Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate--gel electrophoresis and protein blotting., *Analytical biochemistry*, 123, pp. 143–146.
- Hawser, S. and Douglas, L. (1995) Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(9).

- Hawser, S. P., Baillie, G. S. and Douglas, I. J. (1998) Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms, *J. Med Microbiol*, 47, pp. 253–256.
- Hoyer, L. L., Fundyga, R., Hecht, J. E., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. and Arnold, J. (2001) Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family., *Genetics*, 157, pp. 1555–1567.
- Hu, W., Li, L., Sharma, S., Wang, J., McHardy, I., Lux, R., Yang, Z., He, X., Gimzewski, J. K., Li, Y. and Shi, W. (2012) DNA builds and strengthens the extracellular matrix in *Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides., *PLoS one*, 7(12), p. e51905.
- Chaffin, W. and López-Ribot, J. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression, *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(130-180).
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T. and Ghannoum, M. A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance., *Journal of bacteriology*, 183(18), pp. 5385–94.
- Irie, Y., Borlee, B. R., O'Connor, J. R., Hill, P. J., Harwood, C. S., Wozniak, D. J. and Parsek, M. R. (2012) Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), pp. 20632–6.
- Joshi, K., Wheeler, E. and Gavin, J. (1973) Scanning electron microscopy of colonies of six species of *Candida*, *Journal of bacteriology*, 115(1), pp. 341–348.
- Kobayashi, O., Suda, H., Ohtani, T. and Sone, H. (1996) Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene FLO8 from *Saccharomyces cerevisiae*., *Molecular & general genetics : MGG*, 251, pp. 707–715.
- Koelsch, G., Tang, J., Loy, J. a, Monod, M., Jackson, K., Foundling, S. I. and Lin, X. (2000) Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*., *Biochimica et biophysica acta*, 1480(1-2), pp. 117–31.
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C. and Palková, Z. (2003) Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology., *Molecular microbiology*, 47(3), pp. 745–54.
- Li, X. Y. and Yang, S. F. (2007) Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge., *Water research*, 41(5), pp. 1022–30.
- Lo, W. S. and Dranginis, a M. (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*., *Molecular biology of the cell*, 9(1), pp. 161–71.
- Lo, W. S. and Dranginis, A. M. (1996) FLO11, a Yeast Gene Related to the STA Genes, Encodes a Novel Cell Surface Flocculin, *Journal of bacteriology*, 178(24).
- Lockhart, S. R., Pujol, C., Daniels, K. J., Miller, M. G., Johnson, A. D., Pfaller, M. a and Soll, D. R. (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type., *Genetics*, 162(2), pp. 737–45.
- Martinez, L. and Casadevall, A. (2006) Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(3).

- Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D. P., Cleary, I. a, Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L. and Oliveira, R. (2010) Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms., *Mycopathologia*, 169(5), pp. 323–31.
- Mishra, N. N., Ali, S. and Shukla, P. K. (2014) Arachidonic acid affects biofilm formation and PGE2 level in *Candida albicans* and non-*albicans* species in presence of subinhibitory concentration of fluconazole and terbinafine., *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, Elsevier Editora Ltda, (x x), pp. 1–7.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D. and Sanglard, D. (1998) Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*, *Microbiology*, 3, pp. 2731–2737.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. and Hube, B. (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions., *Cellular microbiology*, 6(10), pp. 915–26.
- Nett, J. E., Sanchez, H., Cain, M. T. and Andes, D. R. (2010) Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan., *The Journal of infectious diseases*, 202(1), pp. 171–5.
- Nett, J. E., Sanchez, H., Cain, M. T., Ross, K. M. and Andes, D. R. (2011) Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation., *Eukaryotic cell*, 10(12), pp. 1660–9.
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M. and Andes, D. (2007) Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(2), pp. 510–20.
- Orlean, P. (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall., *Genetics*, 192(3), pp. 775–818.
- Pammi, M., Liang, R., Hicks, J., Mistretta, T.-A. and Versalovic, J. (2013) Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*., *BMC microbiology*, BMC Microbiology, 13(1), p. 257.
- Pavlova, K., Panchev, I. and Hristozova, T. (2005) Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), pp. 279–283.
- Pomés, R., Gil, C. and Nombela, C. (1985) Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants., *Journal of general microbiology*, 131, pp. 2107–2113.
- Radford, D. R., Challacombe, S. J. and Walter, J. D. (1994) A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*., *Journal of medical microbiology*, 40(6), pp. 416–23.
- Rajendran, R., Williams, C., Lappin, D. F., Millington, O., Martins, M. and Ramage, G. (2013) Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms., *Eukaryotic cell*, 12(3), pp. 420–9.
- Renelli, M. (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential, *Microbiology*, 150(7), pp. 2161–2169.
- Reynolds, T. B. and Fink, G. R. (2001) Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation., *Science (New York, N.Y.)*, 291(5505), pp. 878–81.

- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S. and Bayles, K. W. (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), pp. 8113–8.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H. and Fink, G. (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene., *The EMBO journal*, 18, pp. 1257–1269.
- Sheng, G., Yu, H. and Li, X. (2006) Stability of sludge flocs under shear conditions: roles of extracellular polymeric substances (EPS), *Biotechnology and bioengineering*, pp. 2–9.
- Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Phan, Q. T., Fu, Y., Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Zhang, M., Waring, A. J. and Edwards, J. E. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*., *The Journal of biological chemistry*, 279(29), pp. 30480–9.
- Schmitt, J. and Flemming, H. (1999) Water binding in biofilms, *Water Science and Technology*, 39(7), pp. 77–82.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D. and Azeredo, J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition., *Medical mycology*, 47(7), pp. 681–9.
- Slutsky, B., Buffo, J. and Soll, D. R. (1985) High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*., *Science (New York, N.Y.)*, 230, pp. 666–669.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. and Soll, D. R. (1987) “White-opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*., *Journal of bacteriology*, 169, pp. 189–197.
- Soll, D. (2014) The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*, *Journal of oral microbiology*, 1(23), pp. 1–12.
- Soll, D. R. (2004) Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*., *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 26, pp. 10–20.
- Šťovíček, V., Váchová, L., Kuthan, M. and Palková, Z. (2010) General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies., *Fungal genetics and biology: FG & B*, 47, pp. 1012–1022.
- Taff, H. T., Nett, J. E., Zarnowski, R., Ross, K. M., Sanchez, H., Cain, M. T., Hamaker, J., Mitchell, A. P. and Andes, D. R. (2012) A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance., *PLoS pathogens*, 8(8), p. e1002848.
- Teunissen, A. W. and Steensma, H. Y. (1995) Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family., *Yeast (Chichester, England)*, 11, pp. 1001–1013.
- Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L. and Palková, Z. (2011) Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies., *The Journal of cell biology*, 194(5), pp. 679–87.
- Verstrepen, K. J. and Klis, F. M. (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts., *Molecular microbiology*, 60(1), pp. 5–15.

- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J. and Brözel, V. S. (2009) DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms., *Applied and environmental microbiology*, 75(9), pp. 2861–8.
- De Vita, D., Friggeri, L., D’Auria Felicia, D., Pandolfi, F., Piccoli, F., Panella, S., Palamara, A. T., Simonetti, G., Scipione, L., Di Santo, R., Costi, R. and Tortorella, S. (2014) Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Elsevier Ltd.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. and Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation., *Science (New York, N.Y.)*, 295(5559), p. 1487.
- Xavier, J. B. and Foster, K. R. (2007) Cooperation and conflict in microbial biofilms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), pp. 876–881.
- Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*., *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 5), pp. 1318–28.
- Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S. and Budroni, M. (2009) FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*., *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 12), pp. 3838–46.
- Zhang, X. and Bishop, P. L. (2003) Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances., *Chemosphere*, 50(1), pp. 63–9.
- Zhang, X, Bishop, P and Kupferle, M. (1998) Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers, *Water Science and Technology*, 37(4-5), pp. 345–348.
- Zhao, X. (2003) Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9, *Microbiology*, 149(10), pp. 2947–2960.