

## BIOLOGICKÉ SNÍMACÍ PRVKY PRO DETEKCI *N*-ACYL-HOMOSERINOVÝCH LAKTONŮ

MARTINA PALDRYCHOVÁ, ALENA ČEJKOVÁ  
a JAN MASÁK

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

Došlo 1.3.18, přepracováno 20.3.19, přijato 26.3.19.

Klíčová slova: quorum sensing, signální molekuly, *N*-acyl-homoserin-lakton, biologický snímací prvek, *Agrobacterium tumefaciens*

### Obsah

1. Úvod
2. Bakteriální kmeny jako biologické snímací prvky
3. *Agrobacterium tumefaciens*
4. *Chromobacterium violaceum*
5. *Escherichia coli*
6. *Vibrio fischeri*
7. Závěr

### 1. Úvod

Většina gramnegativních bakterií využívá k populačně dependentní regulaci (označované quorum sensing) *N*-acyl-homoserinové laktony (*N*-acyl-HSL) jako signální molekuly<sup>1,2</sup>. *N*-acyl-HSL hrají významnou roli např. při infekcích způsobených bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*, které zhoršují průběh onemocnění pacientů s cystickou fibrózou<sup>3</sup>. Tyto molekuly totiž, kromě jiného, řídí expresi genů kódujících faktory virulence (tvorba biofilmu, surfaktantů, enzymů nebo exotoxinů)<sup>4</sup> a přispívají tak k patogenitě bakterií. Rovněž jsou účinky *N*-acyl-HSL významné pro patogenezí několika onemocnění gastrointestinálního traktu. Nové biologické metody pro detekci signálních molekul nám v budoucnu umožní včasnou diagnózu a monitorování onemocnění spojených s výskytem těchto mikroorganismů<sup>3</sup>.

### 2. Bakteriální kmeny jako biologické snímací prvky

Prostřednictvím bakteriálních kmenů, které jsou pro tento účel v anglické odborné literatuře souhrnně popisovány jako biosenzory, byla identifikována také řada nových bakteriálních quorum sensing (QS) systémů využívajících *N*-acyl-HSL (cit.<sup>5</sup>).

Biosenzor je analytické zařízení, které kombinuje biologický snímací prvek s transduktorem a produkuje signál, který je úměrný koncentraci analytu. Tento signál může být důsledkem změny koncentrace  $H_3O^+$  iontů, uvolňování nebo absorpce plynů, emise světla či absorpce způsobené metabolizací cílové sloučeniny biologickým rozpoznávacím prvkem. Transduktor konvertuje tento biologický signál na měřitelnou odezvu, kterou může být proud, potenciál nebo absorpce světla, elektrochemickými či optickými prostředky, které mohou být dále zesilovány, zpracovány a ukládány pro další analýzu<sup>6</sup>. Použití bakteriálního kmene jako biologického snímacího prvku je vhodné a citlivou metodou umožňující detekci *N*-acyl-HSL v reálném čase. Tyto kmeny obsahují receptory vázající *N*-acyl-HSL a regulační promotory, které jsou propojeny např. s *lux* operonem nebo *lacZ* genem, ale neobsahují gen kódující *N*-acyl-homoserin-laktosynthasu. Tyto bakteriální kmeny tedy nejsou schopny produkovat *N*-acyl-HSL, ale k indukci aktivity promotorů dochází a tím je iniciována exprese určitých genů. Exprese vede k projevu specifických fenotypů, mezi které patří např. produkce beta-D-galaktosidasy u bakterie *Agrobacterium tumefaciens* NT1, produkce violaceinu u *Chromobacterium violaceum* CV026, bioluminiscence u *Escherichia coli* nebo produkce zeleného fluorescenčního proteinu u *Vibrio fischeri*. Biologické snímací prvky mohou být schopné detekce pouze úzkého spektra *N*-acyl-HSL produkovaných jednou bakterií, proto je zapotřebí použít takových testů více. Přestože byly tyto kmeny původně vyvinuty k detekci přítomnosti *N*-acyl-HSL v prostředí, jsou nyní využívány také za účelem detekce příbuzných molekul schopných interference s QS systémy bakterií jakožto potenciálních antivirulentních látek<sup>7</sup>.

### 3. *Agrobacterium tumefaciens*

Nejčastěji používaným biologickým snímacím prvkem v mikrobiologických laboratořích je bezesporu gramnegativní bakterie *A. tumefaciens* (dle současné taxonomie *Rhizobium radiobacter*). Tato bakterie infikuje rostliny a vytváří u nich nádory, které jsou výsledkem genetické transformace. Bakterie totiž do rostlinných buněk přenáší specifický fragment plasmidové DNA (tzv. T-DNA), který se integruje do jaderného genomu hostitele. Exprese onkogenů z T-DNA poté vede ke vzniku nádoru. Další geny obsažené v T-DNA kódují enzymy, které v nádorech zprostředkovávají vznik opinů (unikátních sloučenin s nízkou molekulovou hmotností sloužících jako zdroj uhlíku pro

*A. tumefaciens*) z intermediárních metabolitů<sup>8,9</sup>. Opiny se postupně uvolňují do půdy a jsou katabolizovány bakteriemi *A. tumefaciens*, které vznik nádorů indukovaly.

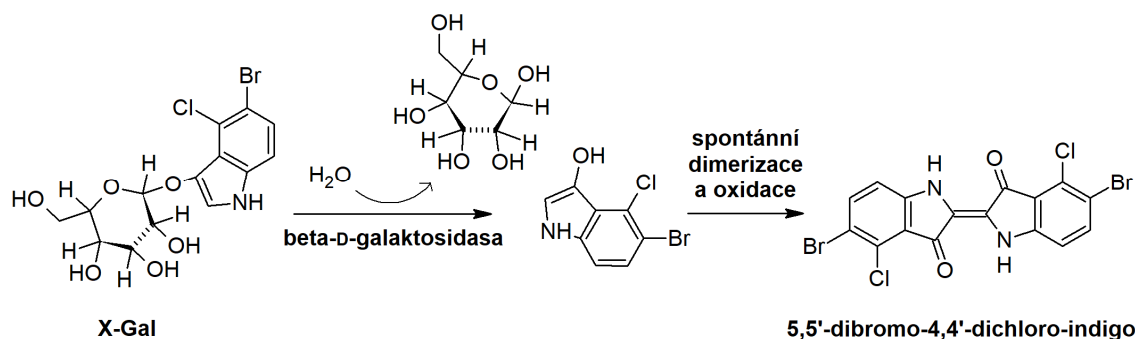
Většina genetických determinant (včetně T-regionu) nutných pro rozvinutí virulence *A. tumefaciens* je lokalizována na Ti plasmidu. Tento plasmid kóduje proteiny zajišťující příjem a katabolismus opinů a také dva nezávislé transferové systémy. První z nich nese název *vir* a je zodpovědný za přenos T-regionu z bakterie do hostitelské rostlinné buňky. Druhý, nazývaný se *tra*, umožňuje přenos celého Ti plasmidu z dárcovské bakterie do bakterie recipientní mechanismem konjugace. Oba systémy jsou regulovány na úrovni transkripce. *Vir* regulon je řízen klasickým dvoukomponentním signál-transdukčním systémem, který snímá a reaguje na faktory produkované rostlinou, které signalizují vhodné místo infekce. *Tra* systém reaguje na faktory produkované nádory (opiny), které vytvářejí prostředí vhodné pro množení bakterií sloužících jako hostitelé pro příjem samotného Ti plasmidu. Opiny indukují *tra* systém, což umožňuje Ti plasmidu přenos do dalších bakterií rodu *Agrobacterium* a jiných příbuzných organismů vyskytujících se v blízkosti nádoru. Získání Ti plasmidu zprostředkovává bakteriím schopnost využívat opiny produkované nádory<sup>8</sup>.

Kromě toho je známo, že tzv. konjugační opin je specifický pouze pro určitý plasmid. Například oktopin specificky indukuje přenos oktopin/mannityl opinového typu Ti plasmidů, zatímco agrocinopiny A a B stimulují přenos Ti plasmidů typu nopalín/agrocinopin (např. pTiC58). Tato zjištění vedla k modelu, který pro každý Ti plasmid navrhuje centrální regulační prvek. U plasmidů oktopin/mannityl opinového typu (např. pTiR10) je konjugační přenos a katabolismus oktopinů koregulován transkripčním aktivátorem OccR, u plasmidů typu nopalín/agrocinopin jsou tyto děje koregulovány transkripčním represorem AccR (cit.<sup>8</sup>). Expresí genů odpovědných za konjugaci (lokalizovaných na *tra* regulonu), uspořádaných do tří operonů (*trb*, *traAFB* a *traCDG*), vyžaduje tři regulované promotory. AccR a OccR přímo regulují pouze expresi genů opinového katabolismu a pouze nepřímo poté řídí expresi genů zodpovídajících za konjugaci. Expresí tří cílových operonů (*tra*) obou typů Ti plasmidů je řízena

vysoce konzervovaným transkripčním aktivátorem TraR, jehož gen je rovněž umístěn na Ti plasmidu. TraR byl identifikován jako člen QS transkripčních faktorů rodiny LuxR (cit.<sup>10</sup>). Jelikož konjugační přenos Ti plasmidů vyžaduje kromě konjugačního opinu také difuzní neboli konjugační faktor (CF) produkovaný samotnými bakteriemi, byl později identifikován *N*-(3-oxooktanoyl)-L-homoserin-lakton (3-oxo-C8-HSL), jehož syntéza je kódována *luxI* homologem *traI*, prvním genem lokalizovaným v *trb* operonu<sup>11</sup>. V nepřítomnosti konjugačního opinu je gen *traI* exprimován na nízké bazální úrovni a 3-oxo-C8-HSL se akumuluje pomalu. Pokud je přítomen opinový signál, QS systém je aktivován indukcí *traR* a po nahromadění 3-oxo-C8-HSL nad určitou kritickou úroveň dojde k aktivaci *tra* regulonu<sup>8</sup>.

Popis QS systému řídícího přenos Ti plasmidu u bakterie *A. tumefaciens* poskytl široce aplikovatelné modely a nástroje pro studium této genové regulace u dalších bakterií. Biologické reportérové systémy založené na TraR se ukázaly jako velice užitečné při studiu *N*-acyl-HSL produkovaných jinými bakteriemi, stejně jako při charakterizaci těchto sloučenin v komplexní matici. Jelikož kmeny *A. tumefaciens* postrádají enzymy s beta-D-galaktosidasovou a beta-D-glukuronidasovou aktivitou, testy pro expresi genů regulovaných TraR jsou založeny na fúzích příslušných genů s reportérovým genem *lacZ* (kódujícím enzymem beta-D-galaktosidasu) nebo *uidA* (kódujícím enzymem beta-D-glukuronidasu). Hladina exprese reportérového genu poté koreluje s expresí genu ve fúzi. Produkce enzymů může být následně kvantitativně stanovena standardními metodami za použití chromogenních substrátů: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosidu (X-Gal) nebo 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glukuronidu (X-Gluc). Reportérový systém a *traR* mohou být uloženy buď na stejném, nebo na dvou rekombinantních plasmidech. Alternativně může být reportérová fúze zavedena také do Ti plasmidu<sup>8</sup>.

Standardním biologickým snímacím prvkem založeným na transkripčním aktivátoru TraR je *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). Tento kmen, postrádající Ti plasmid, díky absenci genu *traI* kódujícího *N*-acyl-homoserin-laktosynthasu, neprodukuje *N*-acyl-HSL. Plasmid



Obr. 1. Přeměna bezbarvého 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosidu (X-Gal) na modře zbarvené indigo pomocí beta-D-galaktosidasu (upraveno dle cit.<sup>12,13</sup>)

pZLR4 obsahuje kopii genu *traR* a geny *lacZ* a *traG* ve fúzi, exprimované z *TraR* dependentního promotoru. V nepřítomnosti signálu tento kmen neprodukuje významné množství beta-D-galaktosidasy a vytváří v médiu obsahujícím chromogenní substrát (X-Gal) bílé kolonie (pro přehlednost uvádíme pouze jeden ze dvou jmenovaných chromogenních substrátů)<sup>8</sup>. Pokud je vystaven výraznějšímu signálu, produkuje řádově stovky jednotek aktivity beta-D-galaktosidasy (obr. 1) a při růstu v médiu obsahujícím X-Gal vytváří kolonie, které mají sytě modré zbarvení<sup>8,12,13</sup>.

Pro detekci *N*-acyl-HSL mohou být použity dva typy testů. Kvalitativní testy detegují pouze přítomnost těchto sloučenin, zatímco analytické testy poskytují odhad minimálního zastoupení chemicky odlišných *N*-acyl-HSL ve vzorku.

#### Kvalitativní testy

Přítomnost *N*-acyl-HSL může být ve vzorcích bakterií jednoduše testována jejich aplikací na povrch pevného média obsahujícího X-Gal, na kterém biologický snímáček roste v souvislé vrstvě. Rovněž mohou být na povrch aplikovány vzorky médií po odstředění bakterií nebo ethyl-acetátové extrakty těchto supernatantů. Při správném provedení testu se v místě aplikace vzorků obsahujících *N*-acyl-HSL (po inkubaci přes noc) objeví modře zbarvená zóna. V každém případě by měly být v jednotlivých testech obsaženy tyto kontroly:

- pozitivní kontrola: buď kolonie bakterie, o které je známo, že produkuje detegovatelný *N*-acyl-HSL nebo standard *N*-acyl-HSL rozpuštěný v organickém rozpouštědle,
- negativní kontrola: buď kolonie bakterie, o které je známo, že k signalizaci nepoužívá *N*-acyl-HSL nebo vzorek kultivačního média, ve kterém byla testovaná bakterie kultivována, aby bylo ověřeno, že složky obsažené v tomto médiu neaktivují reportérový systém. Např. ethyl-acetátové extrakty Luria-Bertani (LB) média obsahují neznámou sloučeninu, která reportérový systém slabě aktivuje.
- Dále je důležité připravit vzorek obsahující pouze X-Gal bez biologického snímáček. V případě falešně pozitivní reakce se kolem testovaných kolonií bakterií vytvářejí modré zóny i v jeho nepřítomnosti. Tyto bakterie pravděpodobně uvolňují během růstu do média látku hydrolyzující X-Gal (cit.<sup>8</sup>).

Pro detekci *N*-acyl-HSL u více vzorků najednou můžeme využít klasickou mikrotitrační destičku. Kultivace *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) v destičce v přítomnosti vzorků probíhá po dobu 16–18 h. Během této doby dochází v závislosti na množství přítomných *N*-acyl-HSL k produkci beta-D-galaktosidasy. Za účelem uvolnění enzymu, který štěpí přidaný X-Gal na modrý produkt, musí být provedena lyze buněk<sup>14</sup>. Aktivita beta-D-galaktosidasy je ke sledování genové exprese v molekulární biologii využívána velice často. Nejčastěji používaným chromogenním substrátem pro monitorování aktivity enzymu je *o*-nitrofenyl-beta-D-galaktopyranosid (ONPG). Dle Mill-

era<sup>15</sup> je množství *o*-nitrofenolu (ONP) vytvořené z ONPG funkcí reakčního času vztaženou k reakčnímu objemu buněčné kultury a její optické denzitě. Takto popsaná aktivita enzymu se vyjadřuje v Millerových jednotkách<sup>16</sup>. Pro vstup ONPG do buněk *A. tumefaciens* je vyžadována jejich permeabilizace, k níž se standardně využívá organických rozpouštědel (toluen nebo chloroform v kombinaci s dodecylsíránem sodným). Z tohoto důvodu není možné použít klasické plastové mikrotitrační destičky, které umožňují detekci *N*-acyl-HSL u více vzorků najednou<sup>16</sup>.

#### Analytické testy

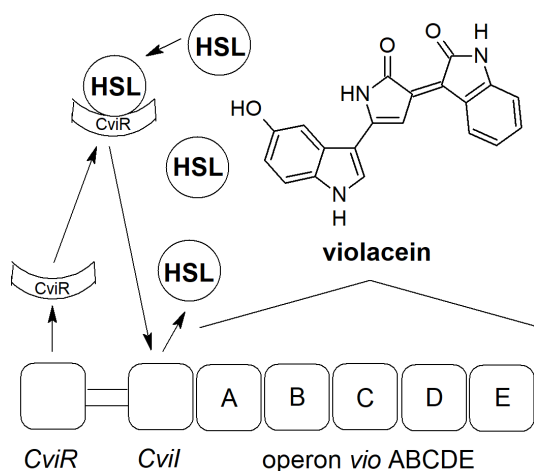
Bakterie, které k signalizaci používají *N*-acyl-HSL, obvykle produkuje více než jednu formu těchto látek. Tradičně se jejich počet určuje kombinací separace prostřednictvím tenkovrstvé chromatografie (TLC) na C18 reverzní fázi s detekcí prostřednictvím biologických snímáček. Např. TLC ve spojení se dvěma různými prvky je široce používaná, jelikož je rychlá a umožňuje analýzu mnoha vzorků současně<sup>17</sup>. Každý *N*-acyl-HSL migruje s určitou pohyblivostí a vytváří v mobilní fázi methanol/voda (6:4) skvrny charakteristického tvaru (3-oxoacyl-HSL ve tvaru slzy, alkanoyl a 3-hydroxyacyl-HSL ve tvaru kruhu). Vzdálenost migrace (hodnota  $R_f$ ) závisí na délce postranního řetězce, přičemž *N*-acyl-HSL s kratšími postranními řetězci migrují rychleji než jejich analoga s delšími řetězci<sup>8</sup>. TLC je nejvhodnější metodou pro stanovení počtu typů *N*-acyl-HSL. Velikost skvrn je úměrná signálu v široké škále koncentrací. Kvantifikace vyžaduje nanesení standardů o známé koncentraci na desku spolu se vzorky. TLC může být využita také jako preparativní krok k přečištění vzorku, který je následně podroben strukturní analýze<sup>17,18</sup>. Nicméně HPLC s C18 reverzní fázi v kombinaci s hmotnostní spektrometrií je pro určení struktury signálních molekul vhodnější metodou<sup>8</sup>.

Za použití kmenů *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) a NT1 byla např. detegována produkce HSL-příbuzných sloučenin rodem *Actinomyces*<sup>14</sup> a pomocí kmene *A. tumefaciens* A136 anti-QS aktivita zingeronu<sup>19</sup>.

## 4. *Chromobacterium violaceum*

Gramnegativní bakterie *C. violaceum*, běžně se vyskytující ve vodě a půdě, disponuje CviI/R *N*-acyl-HSL QS systémem, prostřednictvím něhož dochází u kmene *C. violaceum* ATCC 31532 k biosyntéze *N*-hexanoyl-L-homoserin-laktonu (C6-HSL) a u kmene *C. violaceum* ATCC 12472 k biosyntéze *N*-dekanoyl-L-homoserin-laktonu (C10-HSL). Tyto HSL řídí produkci fialového, ve vodě nerozpustného pigmentu s antibakteriálními vlastnostmi – violaceinu<sup>20</sup>.

Biosyntéza violaceinu je zahájena vytvořením *N*-acyl-HSL-CviR komplexu, který spustí expresi *vio* operonu (obr. 2)<sup>21</sup>. První enzymový produkt VioA (flavin-dependentní-tryptofan-2-monooxygenasa) katalyzuje oxidaci tryptofanu na imin indol-3-pyruvát (IPA) se současnou redukcí flavinadenindinukleotidu (FAD). IPA je následně



Obr. 2. Biosyntéza violaceinu a její regulace prostřednictvím QS u bakterie *C. violaceum* (upraveno dle cit.<sup>21</sup>)

prostřednictvím VioB přeměněn na nestabilní iminový dimer, který buď samovolně přechází na kyselinu chromopyrrolovou nebo z něj prostřednictvím VioE vzniká kyselina protodeoxyviolaceinová (PVA). VioD katalyzuje hydroxylaci indolového kruhu PVA v páté poloze za vzniku proviolaceinu a současně oxidace redukované formy nikotinamidadeninindukleotidfosfátu (NADPH) na nikotinamidadeninindukleotidfosfát (NADP). K přeměně proviolaceinu na violacein dochází za vzniku vody a  $\text{CO}_2$  a rovněž oxidace NADPH na NADP (cit.<sup>22</sup>).

Prostý screening anti-QS aktivity vybraných přírodních látek lze provést na základě jejich schopnosti inhibovat produkci violaceinu např. u divokého kmene *C. violaceum* CETC 494 (cit.<sup>23</sup>).

Hladina violaceinu produkovaného kmenem ATCC 12472 je výrazně vyšší než u kmene ATCC 31532. Biosyntéza violaceinu je totiž u kmene ATCC 31532 zároveň negativně regulována represorem VioS (cit.<sup>24</sup>). Produkce snadno detegovatelného a kvantifikovatelného pigmentu violaceinu pomocí QS-řízeného *vio* operonu nabízí jednoduchý způsob screeningu potenciálních QS modulátorů nebo inhibitorů. Jednoduchost kvantifikace violaceinu přímo vybízí ke konstrukci biologických snímacích prvků<sup>22</sup>. McClean a spol.<sup>20</sup> zkonstruovali kmen *C. violaceum* CV026 (odvozený od kmene ATCC 31532) neschopný produkce C6-HSL. Mutagenézí prostřednictvím mini-Tn5 transpozonu bylo dosaženo dvojitě Tn5 inserce. Získaný mutovaný kmen má jeden transpozon vložený do genu pro *N*-acyl-HSL-synthasu (*cviI*) a druhý do lokusu pro violaceinový represor. Tento kmen může být použit jako biologický indikátor pro detekci řady *N*-acyl-HSL s krátkým řetězcem<sup>20</sup>.

Rovněž byl zkonstruován mutantní kmen s trojí mutací, a to ATCC 31532 *C. violaceum* CV0blu disponující rekombinantním plasmidem pSB403 obsahujícím geny kódující proteiny, které se podílejí na luminiscenci u *Pho-*

*torhabdus* (dříve *Xenorhabdus*) *luminiscens*, a gen kódující receptor luxR pro signální molekuly *V. fischeri*<sup>25</sup>.

Prostřednictvím *C. violaceum* CV026 byla prokázána např. schopnost kyseliny salicylové interferovat s QS systémem bakterie *P. aeruginosa*. Zatímco supernatanty pocházející z kontrolní kultivace *P. aeruginosa* (obsahující *N*-acyl-HSL) indukovaly tvorbu pigmentu u kmene CV026, supernatanty pocházející z kultivace *P. aeruginosa* v přítomnosti kyseliny (obsahující méně *N*-acyl-HSL v porovnání s kontrolou) této indukce schopné nebyly<sup>26</sup>.

## 5. *Escherichia coli*

Bioluminiscence je proces, kterým je viditelné světlo emitováno organismem jako důsledek chemické reakce. Reakce zahrnuje oxidaci substrátu (luciferinu) pomocí enzymu (luciferasy). Bioluminiscenčními organismy jsou např. některé ryby, chobotnice, škeble, krevety a medúzy. Bioluminiscenční systémy nejsou evolučně konzervativní a geny kódující proteiny podílející se na bioluminiscenci nejsou homogenní. Emitované světlo má obvykle jednu ze tří funkcí, a to ofenzivní, defenzivní nebo komunikační<sup>27</sup>.

Biologické snímací prvky využívající bioluminiscenci jsou schopné kvantifikace genové exprese s vysokou citlivostí, nedestruktivně a v reálném čase. Zatímco kmeny využívající enzymovou aktivitu jsou při použití znevýhodněny kvůli vysokému signálu pozadí vytvářenému enzymovou aktivitou hostitele, použití kmenů využívajících bioluminiscenci je méně problematické, protože vysoký bioluminiscenčních bakterií je mimo mořské prostředí velice vzácný. Genetika bakteriální bioluminiscence a rozsah aplikací pro sledování fyziologie mikroorganismů byly podrobně prostudovány. *Lux* geny nezbytné pro luminiscenci jsou uspořádány v jediném operonu (*luxCDABE*). *LuxCDE* kóduje komplex reduktasy mastných kyselin, který se podílí na syntéze aldehydového substrátu mastné kyseliny pro luminiscenční reakci katalyzovanou luciferasovými *LuxAB* podjednotkami. Substráty pro bioluminiscenční reakci (redukovaný flavin mononukleotid a molekulární kyslík) jsou u aerobních bakterií snadno dostupné. Vlastnosti *lux* genů gramnegativních bakterií se liší napříč druhy. Zdroj *lux* genů, který použijeme jako reportérový systém, je tedy důležitým faktorem. Zásadní je např. omezený teplotní rozsah nejčastěji používaných *lux* genů *V. fischeri* (< 30 °C) a *Vibrio harveyi* (< 37 °C), který může být v některých aplikacích omezující. Naproti tomu enzymy kódované operonem *luxCDABE* bakterií *P. luminiscens* jsou funkční při teplotách až 45 °C (cit.<sup>28</sup>).

Plasmidy nesoucí *luxCDABE* operon bakterií *V. fischeri*, *V. harveyi* nebo *P. luminiscens* bývají obvykle vloženy do bakterie *E. coli*, která neprodukuje vlastní *N*-acyl-HSL. Exogenní *N*-acyl-HSL poté u *E. coli* indukují bioluminiscenci. Citlivost *E. coli* (pSB401) je nejvyšší k *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserin-laktonu (3-oxo-C6-HSL). Pro detekci *N*-butanoyl-L-homoserin-laktonu (C4-HSL) se využívá *E. coli* (pSB536). Plasmid nese AhylR QS sys-

tém *Aeromonas hydrophyla*. Kmeny pro detekci C10-C12-HSL a jejich 3-oxo derivátů jsou založeny na LasI/R systému *P. aeruginosa*, který produkuje a reaguje na *N*-(3-oxododekanoyl)-L-homoserin-lakton (3-oxo-C12-HSL)<sup>5</sup>. Plasmidy pSB1075 nebo pSB1142 jsou v tomto případě opět vloženy do *E. coli* (cit.<sup>5,29</sup>). Nevýhodou metod využívajících kmenů *E. coli* k detekci luminiscence je nutnost použití luminometru (přístroje schopného kvantifikovat vyzařené světlo)<sup>5</sup>.

Prostřednictvím bakterií *E. coli* (pSB401), *E. coli* (pSB536) a *E. coli* (pSB1142) byla prokázána např. schopnost netermálního plazmatu oslabit HSL-dependentní QS systém bakterie *P. aeruginosa* (cit.<sup>29</sup>).

## 6. *Vibrio fischeri*

I když jsou všechny předcházející biologické snímací prvky vysoce citlivé, neumožňují detekci na úrovni jedné buňky nebo v přirozeném prostředí. Živý bakteriální kmen, který signalizuje přítomnost *N*-acyl-HSL expresí reportérového proteinu, např. zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), naopak tyto požadavky splňuje<sup>30</sup>.

Medúza *Aequorea victoria* fluoreskuje po ozáření UV světlem zeleně. Do bioluminiscence jsou zapojeny dva proteiny – luciferasa a GFP. Luciferasa po navázání tří iontů vápníku oxiduje luciferin a vytváří komplex Ca<sub>3</sub>-apo-luciferasa-luciferin emitující modré světlo. Luciferasový komplex poté přenáší energii do GFP a výsledkem je zelená fluorescence<sup>27</sup>. GFP získaný z medúzy *A. victoria* vyžaduje k maturaci pouze nepatrné množství kyslíku, není tedy nutné k mikroorganismům produkujícím GFP přidávat žádné další látky za účelem detekce zelené fluorescence<sup>30</sup>. Navíc, fúze GFP s proteinem nemění funkci nebo lokaci proteinu<sup>27</sup>. GFP je proto ke studiu exprese genů v živých buňkách nebo tkáních široce využíván. Je např. vhodným reportérovým proteinem pro sledování genové exprese na úrovni jedné buňky v biofilmu<sup>30</sup>. Nicméně skutečnost, že neexistuje možnost zesílení signálu (každý GFP disponuje pouze jedním chromoforem), jeho použití poněkud omezuje<sup>27</sup>.

Nízká citlivost může být vyřešena použitím citlivých zařízení pro počítání fotonů, ty jsou však pro rutinní analýzy příliš drahé. Pomalá tvorba chromoforu na úrovni posttranslačních modifikací omezuje jeho použití pro studium rychlých procesů aktivace transkripce. Nelinearita fluorescenčního signálu vyžaduje pro každou novou aplikaci konstrukci nových kalibračních křivek<sup>27</sup>.

Jako molekulární složka řídící expresi reportéru GFP byl vybrán systém luxR-P<sub>luxI</sub> pocházející z bakterie *V. fischeri*. V přítomnosti exogenních *N*-acyl-HSL LuxR pozitivně ovlivňuje expresi *luxI* promotoru (P<sub>luxI</sub>), který poté řídí expresi GFP (cit.<sup>30</sup>). Plasmidy nesoucí geny pro detekci *N*-acyl-HSL a současně umožňující expresi GFP proteinu je možné vložit také do *N*-acyl-HSL-negativních mutantů *Pseudomonas putida* IsoF nebo F117 a *Serratia liquefaciens* MG1 (cit.<sup>31</sup>).

## 7. Závěr

Popsané biologické snímací prvky (*A. tumefaciens*, *C. violaceum*, *E. coli* a *V. fischeri*) neobsahují geny kódující *N*-acyl-homoserin-laktosynthasu, nejsou tedy schopné produkce vlastních *N*-acyl-HSL. V přítomnosti exogenních *N*-acyl-HSL u nich však dochází k iniciaci exprese reportérových genů. Tato exprese (produkce beta-D-galaktosidasy, violaceinu, GFP nebo bioluminiscence) je snadno pozorovatelná a měřitelná<sup>7</sup>. Produkce beta-D-galaktosidasy u biosenzoru *A. tumefaciens* NT1 může být snadno kvantitativně stanovena pomocí chromogenních substrátů<sup>8</sup>. Detekce signálu na úrovni jedné buňky nebo v přirozeném prostředí je umožněna prostřednictvím živého bakteriálního biosenzoru *V. fischeri*, který v přítomnosti *N*-acyl-HSL produkuje GFP (cit.<sup>30</sup>). Některé biosenzory (např. *C. violaceum*) jsou schopné detegovat pouze úzké spektrum *N*-acyl-HSL produkovaných jednou bakterií, proto se v praxi k analýze jednoho vzorku používají minimálně dva biologické testy<sup>7</sup>.

*Tato práce byla realizována v rámci „Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost“ (CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory „Národního programu udržitelnosti I“ – NPU I (LO1601 – č.: MSMT-43760/2015).*

### Seznam zkratek

3-oxo-C6-HSL	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)-L-homoserin-lakton
3-oxo-C8-HSL	<i>N</i> -(3-oxooktanoyl)-L-homoserin-lakton
3-oxo-C12-HSL	<i>N</i> -(3-oxododekanoyl)-L-homoserin-lakton
C4-HSL	<i>N</i> -butanoyl-L-homoserin-lakton
C6-HSL	<i>N</i> -hexanoyl-L-homoserin-lakton
C10-HSL	<i>N</i> -dekanoyl-L-homoserin-lakton
C12-HSL	<i>N</i> -dodekanoyl-L-homoserin-lakton
CF	konjugační faktor
FAD	flavinadeninukleotid
GFP	zelený fluorescenční protein
IPA	imin indol-3-pyruvát
<i>N</i> -acyl-HSL	<i>N</i> -acyl-homoserin-lakton
NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
ONP	<i>o</i> -nitrofenol
ONPG	<i>o</i> -nitrofenyl-beta-D-galaktopyranosid
PVA	kyselina protodeoxyviolaceinová
QS	quorum sensing
TLC	tenkovrstvá chromatografie
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glukuronid

## LITERATURA

1. Cámara M., Williams P., Hardman A.: *Lancet Infect. Dis.* 2, 667 (2002).
2. Pappenfort K., Bassler B. L.: *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576 (2016).
3. Kumari A., Pasini P., Daunert S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1619 (2008).
4. Lee J., Zhang L.: *Protein Cell* 6, 26 (2015).
5. Steindler L., Venturi V.: *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 1 (2007).
6. Lei Y., Chen W., Mulchandani A.: *Anal. Chim. Acta* 568, 200 (2006).
7. Lade H., Paul D., Kweon J. H.: *BioMed Res. Int.* 2014, 162584 (2014). DOI: 10.1155/2014/162584.
8. Farrand S. K., Qin Y., Oger P.: *Methods Enzymol.* 358, 452 (2002).
9. von Bodman S. B., Hayman G. T., Farrand S. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 643 (1992).
10. Piper K. R., von Bodman S. B., Farrand S. K.: *Nature* 362, 448 (1993).
11. Zhang L., Murphy P. J., Kerr A., Tate M. E.: *Nature* 362, 446 (1993).
12. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.: *Biochemistry*, 5. vyd. W. H. Freeman, New York 2002.
13. Stevenson R., McAughtrie S., Senior L., Stokes R. J., McGachy H., Tetley L., Nativo P., Brewer J. M., Alexander J., Faulds K.: *Analyst* 138, 6331 (2013).
14. Singh M. P., Greenstein M.: *J. Microbiol. Methods* 65, 32 (2006).
15. Miller J.: *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972.
16. Griffith K. L., Wolf R. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 397 (2002).
17. Shaw P. D., Ping G., Daly S. L., Cha C., Cronan J. E., Rinehart K. L., Farrand S. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6036 (1997).
18. Cha C., Gao P., Chen Y.-C., Shaw P. D., Farrand S. K.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 1119 (1998).
19. Kumar L., Chhibber S., Kumar R., Kumar M., Harjai K.: *Fitoterapia* 102, 84 (2015).
20. McClean K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Cámara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W.: *Microbiology* 143, 3703 (1997).
21. Durán N., Justo G. Z., Durán M., Brocchi M., Cordi L., Tasic L., Castro G. R., Nakazato G.: *Biotechnol. Adv.* 34, 1030 (2016).
22. Kothari V., Sharma S., Padia D.: *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 744 (2017).
23. Truchado P., López-Gálvez F., Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Allende A.: *Food Chemistry* 115, 1337 (2009).
24. Devescovi G., Kojic M., Covaceuszach S., Cámara M., Williams P., Bertani I., Subramoni S., Venturi V.: *Front. Microbiol.* 8, 349 (2017). DOI: 10.3389/fmicb.2017.00349.
25. Winson M. K., Swift S., Fish L., Throup J. P., Jørgensen F., Chhabra S. R., Bycroft B. W., Williams P., Stewart G. S.: *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 185 (1998).
26. Bandara M. B., Zhu H., Sankaridurg P. R., Willcox M. D.: *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 47, 4453 (2006).
27. Zimmer M.: *Chem. Rev.* 102, 759 (2002).
28. Winson M. K., Swift S., Hill P. J., Sims C. M., Griesmayr G., Bycroft B. W., Williams P., Stewart G. S.: *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 193 (1998).
29. Flynn P. B., Busetti A., Wielogorska E., Chevallier O. P., Elliott C. T., Lavery G., Gorman S. P., Graham W. G., Gilmore B. F.: *Sci. Rep.* 6, 26320 (2016).
30. Andersen J. B., Heydorn A., Hentzer M., Eberl L., Geisenberger O., Christensen B. B., Givskov M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 575 (2001).
31. Steidle A., Sigl K., Schuhegger R., Ihring A., Schmid M., Gantner S., Stoffels M., Riedel K., Givskov M., Hartmann A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5761 (2001).

**M. Paldrychová, A. Čejková, and J. Masák**  
*(Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague): Biological Sensing Elements for the Detection of N-acyl Homoserine Lactones*

Many Gram-negative bacteria use *N*-acyl-homoserine lactones (*N*-acyl-HSL) as quorum sensing signal molecules. *N*-acyl-HSL are the subject of investigation by many research groups. Simple methods have been designed to detect *N*-acyl-HSL using bacterial strains that doesn't produce its own signal molecules, but the reporter gene is expressed when exogenous *N*-acyl-HSL are present. This article reviews and discusses the most common and most currently obtainable systems using bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli* or *Vibrio fischeri*. These biological sensing elements can be used to detect and study a wide range of *N*-acyl-HSL and related molecules interfering with quorum sensing systems.

**Keywords:** quorum sensing, signal molecules, *N*-acyl-homoserine lactone, biological sensing element, *Agrobacterium tumefaciens*

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from "Operational Programme Prague – Competitiveness" (CZ.2.16/3.1.00/24503) and the "National Programme of Sustainability I" - NPU I LO1601.