

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta



Speciální chemicko-biologické obory

Molekulární biologie a biochemie organismů

Vočadlová Michelle

Aktivita bakteriálních enzymů a molekulární mechanismy při dekompozici kostní tkáně
Bacterial enzyme activities and molecular mechanism of the decomposition of bone tissue

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

doc. Mgr. Vladimír Sládek, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkovat bych chtěla především mému školiteli doc. Mgr. Vladimíru Sládkovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala rodině a nejbližším za podporu během studia. Hani děkuju, že si to semnou prožila a přežila.

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

V Praze dne 29.4.2024

.....

Vočadlová Michelle

Abstrakt

Dekompozice kostní tkáně je komplexní proces, ve kterém hrají zásadní roli bakteriální enzymy. Enzymy jsou biologické katalyzátory, které se účastní všech biochemických reakcí v živých organismech. Ve této bakalářské práci jsou identifikovány a charakterizovány bakteriální enzymy účastnící se rozkladu kostní tkáně. Hlavní pozornost je věnována enzymům, kterými jsou různé kolagenázy, které mají klíčovou roli v degradaci organických komponent kosti. Dále jsou v práci popsány molekulární mechanismy, kterými tyto enzymy působí. Práce je zaměřena na specifické interakce mezi bakteriálními enzymy a kostní matrix, včetně adhezivních interakcí a syntézy enzymů reagujících na specifické mikroprostředí kostní tkáně. Těmito faktory jsou pH, teplota, a přítomnost potenciálních inhibitorů ovlivňují aktivitu těchto bakteriálních enzymů. Tyto faktory přispívají variabilitě dekompozičních procesů. Následné porozumění molekulárním mechanismům, kterými bakteriální enzymy degradují kostní tkáň, má významné aplikace ve forenzní vědě pro přibližné stanovení času úmrtí, v archeologii pro interpretaci historických a předhistorických nálezů, či v medicíně, kde může mít tento výzkum důležitý význam pro diagnostiku a léčbu onemocnění kostí.

Klíčová slova:

aktivita enzymů, bakterie, bakteriální enzymy, enzym, kolagen, kost, měkké tkáně, rozklad

Abstract

The decomposition of bone tissue is a complex process in which bacterial enzymes play a crucial role. Enzymes are biological catalysts involved in all biochemical reactions in living organisms. In this bachelor thesis, bacterial enzymes involved in the breakdown of bone tissue are identified and characterized. The main focus is on various collagenases, which play a key role in the degradation of the organic components of bone. The work also describes the molecular mechanisms by which these enzymes operate. The thesis focuses on specific interactions between bacterial enzymes and the bone matrix, including adhesive interactions and enzyme synthesis responding to specific microenvironments of bone tissue. Factors such as pH, temperature, and the presence of potential inhibitors influence the activity of these bacterial enzymes. These factors contribute to the variability of decomposition processes. Subsequent understanding of the molecular mechanisms by which bacterial enzymes degrade bone tissue has significant applications in forensic science for estimating the time of death, in archaeology for interpreting historical and prehistoric finds, and in medicine, where this research may be important for the diagnosis and treatment of bone diseases.

Keywords:

Bacterial enzyme, bacteria, bone, collagen, decomposition, enzyme, enzyme activity, soft tissue

Seznam zkratk

(-HEXXH)	sekvence aminokyselin obsahující His, Glu
Asp	aspartát
Cis	cistein
<i>CoIG</i>	název genu collagenase (písmeno značí isoformu)
<i>CoIH</i>	název genu collagenase (písmeno značí isoformu)
GAGs	glykosaminoglykany
Glu	glutamát či kyselina glutamová
Gly	glycin
His	histidin
<i>M9</i>	metaloproteinázy
<i>MCP-01</i>	marine collagenase protease disease
<i>MO-1</i>	specifický typ proteázy, patřící do rodiny S8
PKD	polycystic kidney disease, proteinová doména
Pro	prolin
S1	rodina serinových peptidáz
S8	subtilisinové rodiny serinových peptidáz
Ser	serin
<i>SM9913</i>	specifický kmen bakterie <i>Pseudoalteromonas sp.</i>
Sp.	species (rod)
Tyr36	Tyrosin na pozici 36 v sekvenci proteinu
U32	unikátní rodina peptidáz (přesný název není k dispozici)

Obsah

Seznam zkratk	
Úvod	1
1. Kost	3
1.1. Osifikace.....	3
1.2. Kolagen	4
1.2.1. Vznik kolagenu	4
1.2.2. Lokalizace kolagenu.....	4
1.2.3. Podtypy kolagenu	4
2. Dekompozice.....	5
2.1. Diagenese	6
2.2. Mechanismus rozkladu měkké tkáně	8
2.3. Molekulární mechanismus dekompozice kostní tkáně.....	9
3. Bakterie účastnící se dekompozice	11
3.1. Vliv bakterií a bakteriálních enzymů při dekompozici kostní tkáně.....	12
4. Bakteriální enzymy	13
4.1. Rodiny bakteriálních enzymů účastnící se dekompozice kostní tkáně	14
4.1.1. Rodina S1	14
4.1.2. Rodina S8	15
4.1.3. Rodina U32	15
4.1.4. Rodina M9.....	16
4.1.5. Kolagenázové domény	16
4.1.6. Rodina S53	17
4.1.7. Karboanhydrázy	17
4.2. Aktivita bakteriálních enzymů při dekompozici kostní tkáně.....	19
4.3. Mechanismus působení bakteriálních enzymů při dekompozici kostní tkáně	20
Závěr.....	21
Seznam použité literatury	22

Úvod

Kostní tkáň tvoří významnou část hmoty těl obratlovců (Graw et al., 2000). Po smrti organismu nejvíce a nejdéle odolává rozkladu a návratu do globálního koloběhu. Na usnadnění degradace kostní hmoty se podílí bakterie (Zhang et al., 2015), přesněji řečeno celá bakteriální společenstva. Zastoupení jednotlivých taxonů se mění v závislosti na tom, jak se během rozkladu těla v příslušném prostředí mění podmínky terestrické a akvatické. Podmínky ovlivňuje obsah kyslíku a pH (Eriksen et al., 2020). Při degradaci kostní tkáně vykazují některé bakterie prakticky všechny enzymatické aktivity potřebné ke kompletnímu rozkladu matrice. Konkrétně se jedná o například *Bacterioidota* a *Firmicutes*, jejichž zástupci jsou také přítomni již bezprostředně po smrti organismu (Körgesaar et al., 2022). Ostatní bakterie účastníci se dekompozice se chovají jako specialisté využívající pouze některé ze složek organického substrátu. Lze předpokládat, že tito specialisté nejsou přítomni po celou dobu trvání degradace kostní tkáně (Procopio et al., 2021). Hlavní rozkládanou složkou v organické matrix kostní tkáně je kolagen. Ten se díky své specifické struktuře obecně vyznačuje vysokou odolností (Olszta et al., 2007). Mezi enzymy, které jej dokáží štěpit, patří bakteriální peptidázy (Amendt et al., 2010).

Dle mechanismu rozkladu kolagenu dělíme kolagenázy na pravé a nepravé. Pravé kolagenázy jsou specifické enzymy schopné štěpit kolagen na přesně určených místech, a to i bez předchozí denaturace kolagenu (Zhang et al., 2015). Tyto kolagenázy jsou typicky nalezeny u prokaryotických organismů, jako jsou bakterie, a jsou zodpovědné za rozklad kolagenu ve tkáních (Eriksen et al., 2020). Pravé bakteriální kolagenázy, jako jsou ty z rodů *Clostridium*, jsou známé svou schopností hydrolyzovat nativní kolagen bez nutnosti předchozí modifikace substrátu (Shenoy et al., 2022). Na druhé straně eukaryotické kolagenázy, které se vyskytují u živočichů včetně lidí, obvykle obsahují hemopexinovou doménu, která se podílí na vazbě a rozpoznání substrátu, což je strukturální prvek, který prokaryotickým kolagenázám chybí. Prokaryotické kolagenázy mají nižší specifitu, která zapříčiňuje rozpoznávání více štěpných míst. Charakteristickým rysem je, že naopak kolagenolytickou funkci mají i příbuzné proteázy z rodin S1, S8 a U32, které za pravé kolagenázy považovat nelze (Zhang et al., 2015).

Studium změn ve složení bakteriálních společenstev, respektive jejich metabolitů má význam ve forenzní analýze. Sukcese jednotlivých taxonů jak internistického původu – převážně ze střeva, tak i okolního prostředí, napomáhá stanovení doby od okamžiku smrti (Procopio et al., 2021).

Cílem této bakalářské práce je shrnout bakteriální rodiny zastoupené při dekompozici kostní tkáně a popsat molekulární mechanismy působení během bakteriální činnosti. Hlavním cílem je nalézt odpověď na otázku, které bakterie se účastní dekompozice kostní tkáně a jak jejich enzymatická aktivita dekompozici ovlivňuje.

1. Kost

Kost je tvrdá a pevná tkáň, která tvoří kostru těla obratlovců a zajišťuje mnoho funkcí např. podporu a ochranu těla (Su et al., 2019). Vzniká zárodečnými buňkami, které se nazývají mezenchymální buňky (Florencio-Silva et al., 2015). Tyto buňky jsou přítomné v embryonálním stavu a mají schopnost diferencovat se do různých buněčných typů, včetně osteoblastů, které jsou zodpovědné za tvorbu kostní tkáně (Downey & Siegel, 2006). Kosti jsou tvořeny ze dvou hlavních typů tkáně - kompaktní kostní tkáň, která je hustá a tvrdá, a spongiózní (neboli trabekulární) kostní tkáň, která je více pórovitá a nachází se na koncích dlouhých kostí a uvnitř ostatních kostí (Clarke, 2008). Kostní tkáň obsahuje živé buňky, včetně osteoblastů (buňky tvořící kostní tkáň), osteocytů (buňky udržující kostní tkáň) a osteoklastů (buňky rozkládající kostní tkáň), což umožňuje kostem se regenerovat a adaptovat na změny v zátěži (Hart et al., 2020).

1.1. Osifikace

Vznik kosti je doprovázen složitým procesem vývoje a následné mineralizace, který vede k vytvoření pevné a odolné tkáně (Kenkre & Bassett, 2018). Proces vzniku kosti se nazývá osteogeneze a probíhá v několika fázích. Mezenchymální buňky představují základ pro tvorbu kostní tkáně. Tyto buňky jsou přítomné v embryonálním vývoji a mají schopnost se diferencovat do osteoblastů, chrupavkových buněk a dalších buněčných typů (Langdahl et al., 2016). Mezenchymální buňky se diferencují na osteoblasty. Ty produkují kolagen a další látky, které tvoří kostní matrix (Florencio-Silva et al., 2015). Následná ossifikace je proces, při kterém se měkká tkáň (často chrupavka) mineralizuje a mění se na tvrdou kostní tkáň. Existují dva hlavní typy ossifikace – endochondrální a intramembranózní (Langdahl et al., 2016). První ze zmiňovaných je proces týkající se dlouhých kostí – například kosti paže, stehna. Začíná vytvořením chrupavkového základu, který je později nahrazen kostní tkání (Wittig & Birkedal, 2022). Intramembranózní ossifikace se odehrává u plochých kostí, jako jsou lebka nebo klíční kosti. Osteoblasty produkují kostní matrix přímo bez předchozího vytvoření chrupavky (Langdahl et al., 2016).

1.2. Kolagen

Kolagen je hlavní strukturální bílkovinou nalezenou v tkáních těl obratlovců, včetně kůže, šlach, vazů, chrupavek, kostí a cév (Wu et al., 2023). Je to extracelulární bílkovina, která hraje klíčovou roli při poskytování pevnosti, pružnosti a struktury tkáním (Wu et al., 2023). Udržuje integritu tkání a orgánů (Shenoy et al., 2022).

1.2.1. Vznik kolagenu

Syntéza kolagenu v případě vaziva a šlach probíhá buňkách zvaných fibroblasty. V chrupavce nacházíme chondrocyty, ty jsou produktem složitého procesu translace (Graw et al., 2000). Po syntéze je kolagen modifikován různými post-translačními způsoby, jako je hydroxylace (přidání hydroxylových skupin) a glykosylace (přidání cukerných řetězců). To pomáhá získat správnou strukturu a funkci (Shenoy et al., 2022). Molekuly kolagenu se shlukují do fibrilárních struktur, které se dále organizují do větších vláken a sítí, které společně vytváří pevnou a pružnou tkáň (Wu et al., 2023).

1.2.2. Lokalizace kolagenu

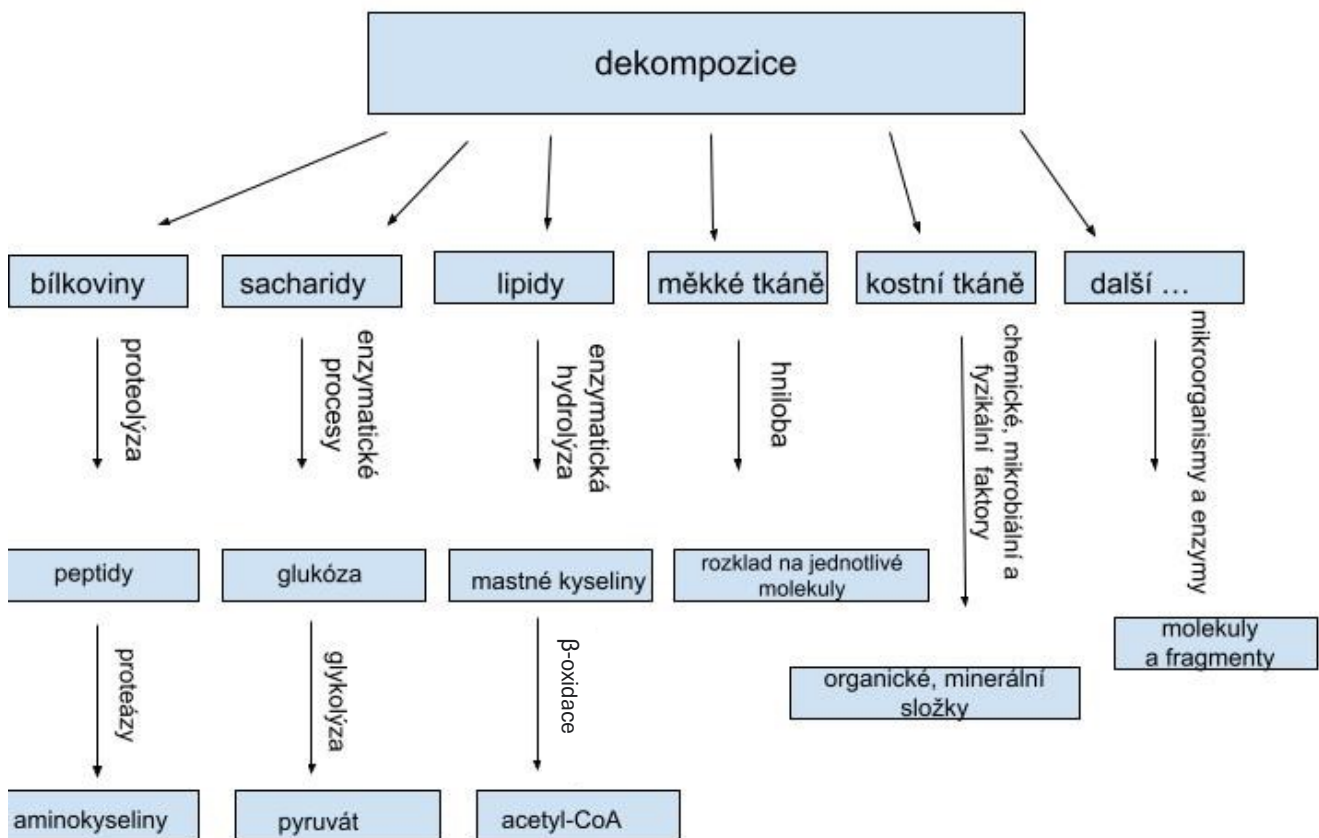
Kolagen hraje zásadní roli v různých typech tkání v těle. V kůži tvoří kolagen hlavní složku kožní pojivové tkáně, kde pomáhá udržovat její pevnost a pružnost. Toto je důležité pro ochranu těla. Ve šlachách a vazech kolagen poskytuje nezbytnou pevnost a odolnost, což je klíčové pro efektivní přenos síly mezi svaly a kostmi, umožňující tak pohyb. V chrupavkách kolagenová vlákna tvoří základní strukturu, která dodává tkáni potřebnou pevnost a podporu, což je důležité pro hladký pohyb kloubů a minimalizaci opotřebení. Kostí také obsahují kolagen, kde slouží k poskytování strukturální opory a přispívá k celkové odolnosti kostí, což je zásadní pro podporu tělesné struktury a funkce (Ricard-Blum, 2011).

1.2.3. Podtypy kolagenu

Existuje více než 20 různých typů kolagenu, ale největší důraz je kladen na 3 podtypy. Typ I, který tvoří většinu kolagenu v těle a nachází se především v kostech, šlachách, kůži a vazech. Typ II.- Převažuje v chrupavkách a očním sklivci. Typ III. - Se často nachází v retikulárních vláknech, které podporují měkké tkáně jako játra, slezina a lymfatické orgány (Ricard-Blum, 2011).

2. Dekompozice

Dekompozice neboli rozklad, je biologický proces, který nastane po smrti. Během tohoto procesu dochází k postupnému rozkladu tělních částí jako jsou svaly, orgány a kůže (Shenoy et al., 2022). Tyto proměny jsou důsledkem enzymatických reakcí a bakteriální činnosti, které rozkládají organické složky, jako jsou proteiny, sacharidy a lipidy tak i složky anorganické mezi, které řadíme kosti a zuby. Klíčové procesy pro rozklad těla jsou autolýza a hniloba (viz obr.1). Při autolýze dochází k samorozkladu tkání enzymy vlastního těla. Hniloba odkazuje na rozklad způsobený bakteriálními a houbovými aktivitami (Benninger et al., 2008).



Obr.1 – vlastní schématické znázornění dekompozičních procesů

Při proteolýze dochází k částečné nebo úplné degradaci proteinů na peptidy a jednotlivé volné aminokyseliny. Proteolýza neprobíhá rovnoměrně, a tak dochází k degradaci proteinů v různých časových intervalech (Rogers & Overall, 2013). Intervaly rozdělujeme na časnou a pozdní fázi rozkladu (Kaiser et al., 2013). V časné fázi rozkladu se rozkládají především proteiny měkkých tkání (např. v mozku, játrech a ledvinách). V pozdější fázi se pak rozkládají peptidy svalových vláken, kolagen a retikulin (Haglund & Sorg, 1997). Naposled dochází k rozkladu keratinu. Jedná se o protein nacházející se v kůži, vlasech a nehtech. Jeho specifickou vlastností je odolnost vůči enzymům podílejícím se na proteolýze, a tak je štěpen keratinolytickými mikroorganismy (Gupta & Ramnani, 2006). Z tohoto důvodu běžně na kosterních pozůstatcích nacházíme zbytky vlasů a nehtů.

Během degradace sacharidů dochází k rozkladu glykogenu na monomery glukózy. Monomery se dále rozkládají v závislosti na množství kyslíku a přítomnosti organismů na další produkty. Bakterie a houby mohou sacharidy rozkládat dvěma způsoby – anaerobně a aerobně. V obou případech se cukry rozkládají na organické kyseliny, které jsou zodpovědné za kyselé prostředí nacházející se v rozkládajících se tělech (Dent et al., 2004).

Lipidy jsou obsaženy především v tukové tkáni a jejich degradace probíhá přes hydrolyzaci lipáz krátce po smrti. Z glycerolové kostry se uvolňují mastné kyseliny a vzniká směs nasycených a nenasycených mastných kyselin (Notter et al., 2009). Pokud má degradace správné podmínky, které jsou závislé na množství vody a aktivitě bakteriálních enzymů, mohou být mastné kyseliny přeměněny na adipocire (Simonsen, 1977). Jedná se o tzv. mrtvolný vosk.

2.1. Diagenese

Diagenese je proces, který se odehrává v kostní tkáni po smrti organismu. Tento proces zahrnuje chemické, fyzikální a biologické změny. Diagenese kostí je především ovlivněna prostředím a činností mikroorganismů (Falgayrac et al., 2022). Prvním krokem diagenese je odstranění organické části kolagenu, působením bakteriálních kolagenáz (Loy et al., 2023) Následně dochází k degradaci hydroxyapatitu, který je minerálním zvětráváním rozkládán na ionty. Silná struktura kosti je těmito procesy narušena a dochází k úplnému rozpadu (Krane, 1982). Kost můžeme rozdělit na tři části. Část proteinová částí, obsahující především kolagen, minerální částice z hydroxyapatitu, a nakonec jiné organické sloučeniny (viz. tab. č. 1).

Název:	Funkce:
Osteokalcin	Protein důležitý pro mineralizaci kostí, je produkován osteoblasty.
Osteopontin	Protein důležitý pro adhezi buněk, regulaci minerálního obsahu a remodelaci kostí.
Osteonectin	Jedná se o glykoprotein, který se váže na kolagen a mineralizuje extracelulární matrix kostí.
Glykosaminoglykany (GAGs)	Dlouhé polysacharidové řetězce přítomné v kostní matrix, které regulují interakci s buňkami.
Kyselina hyaluronová	Polysacharid, který je součástí matrix kostí a pomáhá udržovat strukturu a lubrikaci.
Proteoglykany	proteiny vázané na sacharidové řetězce, které pomáhají regulovat mineralizaci a mechanické vlastnosti kostní matrix

Tab. č. 1 Organické sloučeniny kosti dle Krane, 1982.

2.2. Mechanismus rozkladu měkké tkáně

Rozklad měkkých tkání je základním předpokladem pro zpřístupnění kostní hmoty dalšímu působení bakterií účastnících se enzymatické degradace. Proces je velmi dobře popsán zejména s ohledem na jeho význam pro forenzní a archeologické aplikace. Po smrti organismu dochází během několika minut k autolytickému rozkladu buněk (Vass, 2001). Nejdříve probíhá aerobní autolytický enzymatický rozklad proteinů, následkem toho okolní tkáň ztrácí odolnost vůči enzymům. Prostředí v těle se rychle mění z aerobního na anaerobní a dochází k množení a šíření původně střevních bakterií hostitele, např. *Bacillus putrificus*, *Clostridium histolyticum*, které zahajují proces mikrobiálního rozkladu tkání – stadium putrefikace, hnití (Child, 1995).

Během hnilobných procesů mikroorganismy produkují metabolity – plyny jako sulfan, oxid uhličitý, metan, amoniak, oxid siřičitý nebo vodík. Ty zvyšují svůj objem, až dojde k prasknutí kadaveru a tím vystavení vnitřních tkání působnosti mikrobiálních společenstev z okolního prostředí. V aerobním prostředí po úniku tekutin a hnilobných plynů pokračuje suchý rozklad těla. Mastné kyseliny se oxidují na aldehydy, ketony, organické kyseliny s jejich estery a oxid uhličitý. V tomto stadiu narůstá četnost bakterií např. ze skupin *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, a *Proteobacteria* (Damann et al., 2015). V teplém a vlhkém prostředí se na místech s vysokým obsahem tuku jejich hydrolýzou – saponifikací a reakcí volných mastných kyselin s dvojmocnými ionty (zejména vápenatými a hořečnatými kationty) tvoří nerozpustný „mrtvolný vosk“, adipocire, který dočasně snižuje přístupnost tkání vůči vnějším rozkladným vlivům. Ke stabilizaci adipociru přispívají také metabolity některých bakterií (např. *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, tedy druhů pocházejících převážně právě z organismu) a jeho vznik přispívá k poklesu pH prostředí (Fiedler & Graw, 2003). Délka procesu rozkladu měkkých tkání rovněž závisí na faktorech jako je pH, teplota, množství kyslíku a vody. Jeho konečným stádiem je skeletonizace, kdy zůstávají pouze kosterní pozůstatky dobře přístupné dalšímu působení chemické i bakteriální degradace (Turner-Walker, 2007).

2.3. Molekulární mechanismus dekompozice kostní tkáně

Relativně velké množství poznatků je k dispozici o molekulárním mechanismu rozkladu kolagenu pravými bakteriálními kolagenázami, které jsou klasifikovány jako rodina *M9* podle systému MEROPS. Jedná se o klasifikaci proteáz, kde je každá proteáza zařazena do rodiny a klanů na základě její aminokyselinové sekvence a mechanických vlastností. Rodiny jsou označeny jedním písmenem a jedním nebo více číslicemi. Písmeno "M" ve zkratce značí, že se jedná o metaloproteázu – enzymy, jejichž katalytická aktivita závisí na přítomnosti kovového iontu (obvykle zinku). Číslo "9" pak identifikuje konkrétní rodinu v rámci metaloproteáz, což v tomto případě zahrnuje určité typy kolagenáz (dále jen jako *M9*). *M9* kolagenázy třídy I a II jsou právě endopeptidázy (Zhang et al., 2015).

Předpokládá se, že kolagenáza u bakterií rodu *Clostridium sp.* má dva možné stavy umožňující hydrolýzu kolagenu. Kolagen vážící doména a katalytická doména v kolagenázovém modulu zůstávají během hydrolýzy kolagenu většinou uzavřené, ale uvolňují se do otevřeného základního stavu, jakmile je kolagen rozštěpen (Kato et al., 1992). Na rozdíl od eukaryotických kolagenáz, které štěpí nativní kolageny na charakteristické fragmenty v poměru „čtvrtiny“ a „tři čtvrtiny“. Kolagenázy z *Clostridium histolyticum*, u nichž byl doposud mechanismus studován, hydrolyzují nativní kolageny na směs malých peptidů (MacLennan et al., 1953). Kolagenázy třídy I a II zpočátku napadají odlišná hyperreaktivní místa na vazbách γ -Glycinu (dále jen Gly) v opakující se sekvenci Gly-X-Y kolagenu. Jedná se o typ aminokyselinové sekvence charakteristickou pro kolagení řetězce. Gly je každá třetí aminokyselina v kolagenové trojšroubovici. "X" a "Y" jsou místa, která mohou být obsazena jakoukoli jinou aminokyselinou, často jsou to prolin a hydroxyprolin. Tato sekvence Gly-X-Y je základem pro stabilní strukturu kolagenu. Přestože obě třídy kolagenáz mají různou specifitu, nakonec je jejich působení při štěpení nativních kolagenů synergické (Zhang et al., 2015).

Na základě studií domén pro vazbu kolagenu u dvou druhů bakteriálních kolagenáz bylo zjištěno, že doména dokáže rozpoznat a navázat se na trojšroubovici. Tato vazba je posílena v přítomnosti vápenatých iontů (Ohbayashi et al., 2012). Doména typu polycystic kidney disease (dále jen PKD), která se skládá z 80-90 aminokyselinových zbytků, je vyrovnávací platformou mezi kolagenázovou jednotkou a doménou pro rozpoznání kolagenu. Její specifická role v hydrolyze kolagenu není jasná (Wang et al., 2010). PKD některých speciálních kolagenáz se může nejen vázat na kolagen, ale může také rozvolnit mikrofibrily a zlepšit tak kolagenolytickou účinnost (Matsushita et al., 1994). Vápenaté kationty v PKD doméně mohou stabilizovat konformaci domény a tím zvýšit celkovou stabilitu kolagenázy (Wang et al., 2010). Hydrolytický proces katalyzovaný bakteriálními kolagenázami lze rozdělit do dvou kroků. Na začátku vazby s kolagenem kolagenáza postupně mění svou konfiguraci z otevřené na uzavřenou, poté na polootevřenou. Mezitím dojde k otevření trojšroubovice kolagenu a štěpená vazba je vystavena aktivnímu místu enzymu. Jakmile je tato část kolagenu hydrolyzována, kolagenáza se vrátí do otevřené konfigurace, aby mohla postoupit k rozkladu další molekuly kolagenu, a takto se proces opakuje (Ohbayashi et al., 2012).

Částečně je popsán i mechanismus kolagenolytické subtilisinové rodiny serinových peptidáz.proteázy S8 (MEROPS, 2024) z hlubokomořských bakterií – marine collagenase protease deseasinu (dále jen MCP-01) (Wang et al., 2010). Ten má schopnost štěpit kolagen typu I, a tedy potencionálně přispívat k rozkladu kostní hmoty. MCP-01, respektive jeho katalytická doména, postupně uvolňuje jednotlivé kolagenové monomery z fibril především hydrolyzací proteoglykanů a telopeptidů v kolagenových vláknech (Zhang et al., 2015). Dále dochází k rozkladu trojšroubovice kolagenu typu I. MCP-01 vykazuje nestriktní preferenci pro peptidové vazby s Prolinovými (dále jen Pro) nebo bazickými vazbami (Wang et al., 2010).

3. Bakterie účastníci se dekompozice

Bakteriální dekompozice začíná bezprostředně po smrti, intenzivněji však probíhá po skončení skeletonizace, kdy je kostní tkáň přímo vystavená okolnímu prostředí (Eriksen et al., 2020). Bakterie podílející se na rozkladu kostní hmoty můžeme rozdělit na dva typy (Azam & Malfatti, 2007). První jsou ti, kteří pocházejí ze samotného organismu – symbionti, parazité, infekce (Körgesaar et al., 2022). Poté se jedná o bakterie z prostředí, ve které se ostatky nachází (Zhang et al., 2015). Bakterií z okolí přibývá v souvislosti s postupující skeletonizací zvýšenou expozicí kostní hmoty (Borchert et al., 2021). Při tomto procesu působí synergicky jednotlivé bakteriální enzymy i vlivy okolního prostředí, kde chemická eroze zpřístupňuje organickou složku enzymům. Enzymatické štěpení urychluje chemickou degradaci hydroxyapatitu a produktů jeho přeměny (Eriksen et al., 2020).

Jejich původ se v minulosti vysvětloval dvěma možnými hypotézami – tzv. „střevní“ (tj. bakterie účastníci se rozkladu kosti pocházejí z hostitelského organismu, především jeho střev) (Li et al., 2008) versus teorií o kolonizaci mikroorganismy z okolního prostředí (Turner-Walker, 2007). V současnosti je již potvrzeno, že důležitou roli hrají oba zdroje mikroorganismů (Emmons et al., 2022).

Starší tafonomicky orientované studie, zpravidla bakteriální společenstva na archeologických lokalitách byly zkoumány pouze na základě kultivačních metod (Benbow et al., 2015). Až výrazný rozvoj sekvenování v posledních desetiletích přinesl komplexnější obraz o zastoupení bakterií podílejících se na rozkladu kostní tkáně a mechanismu jejich působení (Hanson & Buikstra, 1987). Většina recentních prací zabývajících se bakteriálním rozkladem kostí v terestrickém prostředí se shoduje na přítomnosti zástupců kmenů *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sp.*, *Planctomycetes*). Dále ještě *Proteobacteria* (*Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp.*) (Wilkins et al., 2013). Pokud k rozkladu dochází na povrchu, převládají *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus* a *Planctomycetes* (Damman et al., 2015). Rodu *Chlamydiae* v povrchových zbytcích dominuje řád *Chlamydiales* s hlavními zástupci *Candidatus Protochlamydia* a *Neochlamydia* (Emmons, 2022). Z kmene *Actinobacteria* se na rozkladu kostí v terestrickém prostředí podílí např. rody *Streptomyces* a *Streptosporangium* (Eriksen et al., 2020).

Proteobacteria jsou časté při rozkladu kostí v půdě i ve vodním prostředí. Ve sladkých vodách zejména *Alphaproteobacteria* a *Betaproteobacteria* (Hiorns et al., 1997), které lze najít ve střevech obratlovců (Benbow et al., 2015; Damman et al., 2015). *Firmicutes* jsou typické pro anoxické prostředí (Wilkins et al., 2013). Dále se na post mortem rozkladu kostní tkáně podílí zástupci kmene *Spirochaetes*, vyskytující se opět ve střevech obratlovců i členovců, v půdě, i v mořských sedimentech (Borchert et al., 2020).

Rozklad ve sladkovodních systémech se výrazně liší od rozkladu v suchozemských systémech, což je způsobeno řadou faktorů včetně teploty, pH, zákalu a vodních mikrobiálních společenstvech. Liší se i struktura společenstev uvnitř a na povrchu kostí, i když v obou opět převažují kmeny *Bacteroidetes* a *Verrucomicrobia* uvnitř kostní tkáně (Kaszubinski et al., 2022). V mořském prostředí, ještě více než ve sladkovodním dominuje vliv anoxických podmínek a chemismus vody. Výzkum mikrobiálního rozkladu v mořském prostředí byl donedávna ve stínu studií terestrických – zejména archeologických lokalit, v posledních letech se začíná dostávat do popředí zájmu (Siles et al., 2018). V mikrobiomu rozkládající kosti dominují v mořích kmeny *Bacteroidota*, *Campylobacterota* a *Proteobacteria* (Borchert et al., 2020). V přílivové zóně byly zaznamenány bakteriální kmeny *Chloroflexi*, *Deferribactere*, *Latescibacteria*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae* a *Planctomycetes* (Eriksen et al., 2020).

3.1. Vliv bakterií a bakteriálních enzymů při dekompozici kostní tkáně

Bakteriální enzymatický rozklad kostí je komplexní proces, který probíhá současně a synergicky s chemickým rozkladem. Kostní hmota sama o sobě patří k rekalitrantním materiálům – tj. obtížně zvětratelná (Schoeninger et al., 1989). Anorganická složka, převážně hydroxyapatit, je zpočátku před rozkladem chráněna díky asociaci s organickou složkou – kolagenem tvořenou matrix. Proteinová složka je naopak vazbou minerálních fází chráněna proti bezprostřednímu ataku mikrobiálními kolagenázami, pro které jsou prostory mezi krystaly hydroxyapatitu příliš malé a nepropustné. Postupem času, zejména v suchozemském (půdním) prostředí, dochází k postupnému vzniku rozvětvených kanálků v kostní hmotě a nárůstu porozity. Celý proces zpřístupňuje organickou i anorganickou složku pro další bakteriální i chemický rozklad (Jans et al., 2004).

Bakterie svou enzymatickou aktivitou pomáhají uvolňovat obrovské množství hmoty, které je jinak obtížně rozložitelné a vracejí ho zpět do koloběhu v celosvětovém měřítku. Tyto symbiotické bakterie mají klíčovou úlohu při procesu rozkladu kostní tkáně v mořském prostředí, což poukazuje na rozmanitost a adaptabilitu bakterií v různých ekosystémech (Turner-Walker, 2007). V mořském prostředí se na rozkladu kostní hmoty podílí nejen volně se vyskytující bakterie vytvářející biofilm, ale také bakterie spolupracující s objevenými mnohoštětinatci známými jako kostižerky (*Osedax mucofloris*) (Turner-Walker, 2007).

4. Bakteriální enzymy

Obecně platí, že bakteriální enzymy se v mnoha ohledech odlišují od těch eukaryotických, a stejně tak tomu je i v případě enzymů, které jsou schopny štěpit kolagen (Turner-Walker, 2007). Jejich unikátní vlastnosti a schopnost specializace na konkrétní druhy tkání a substrátů představují klíčový aspekt mikrobiálního rozkladu kostní tkáně (Fernandez-Lopez et al., 2021). Mikrobiální atak a rozklad kostní hmoty představují fascinující proces, jehož detailní popis nám odkrývá složitou synergii celého bakteriálního společenstva a škály enzymů, které tato komunita produkuje (Borchert et al., 2021). Každý druh enzymu je často specifický pro konkrétní bakteriální kmeny, což dodává rozkladu preciznost a specializaci.

Vzhledem k převažujícímu zastoupení kolagenu v organické matrix kosti, z nichž nejodolnější je kolagen I, mají kolagenázy klíčovou roli při biodegradaci kostní tkáně (Yoshino et al., 1991). Tyto enzymy jsou schopny štěpit kolagen, což je nezbytný krok při rozkladu organické struktury kosti (podrobněji v kapitole [4.1.](#)). Nicméně, celý proces by nebyl tak efektivní bez účasti bakteriálních karboanhydráz a glykosidáz, které rozkládají neproteinové složky organické matrix (Fernandez-Lopez et al., 2021). Tímto způsobem enzymy umožňují kolagenázám přístup k samotné struktuře kolagenu I. (Borchert et al., 2021). Struktura a mechanismus působení těchto enzymů jsou nejpodrobněji popsány u kolagenáz z několika modelových druhů bakterií – *Clostridium sp.*, *Streptomyces sp.* a *Vibro cholerae*. Důkladná analýza je podporována skutečností, že kolagenázy mají schopnost rozkládat nejen kostní hmotu, ale i tkáně obsahující kolagen v širším spektru. To je uplatnitelné v průmyslovém a biotechnologickém přesahu jako je kožedělný průmysl a potravinářství (Fernandez-Lopez et al., 2021).

4.1. Rodiny bakteriálních enzymů účastnící se dekompozice kostní tkáně

Kolagen je díky své specifické struktuře odolný vůči většině běžných proteáz, zejména pak kostní kolagen typu I, tvořený obvykle jedinou nepřerušovanou trojšroubovicovou doménou. Kolektiv Borchert et al., (2021) i Fernandez-Lopez et al., (2021) zkoumali u bakterií ze skupin *Bacteroidia*, *Fermentibacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Geopsychrobacteraceae*, *Krumholzibacteria*, *Planctomycetota*, *Spirochaetia* a *Thiovulaceae* proteinové sekvence enzymů s kolagenolytickou aktivitou, respektive jejich schopností štěpit želatinu (jeden z meziproductů rozkladu kolagenu). Identifikovali peptidázy/kolagenázy patřící do rodin S1, S8, U32 a u bakterií rodu *Enterobacterales* i kolagenázu z rodiny M9. Nejasnosti s případným zařazením těchto enzymů mezi „pravé“ kolagenázy či gelatinázy vyplývá ze skutečnosti, že bakteriální kolagenázy jsou méně specifické než kolagenázy živočišného původu (Fernandez-Lopez et al., 2021).

U živočišných živočišných kolagenáz je degradace nativního kolagenu (nebo ve vodě nerozpustného nativního kolagenu) zásadně závislá na typu kolagenu a na jeho původu (Harrington, 1996). Naopak bakteriální kolagenázy mohou rozkládat jak ve vodě rozpustné denaturované kolageny, tak ve vodě nerozpustné nativní molekuly, a to i díky tomu, že kolagen štěpí na více místech (Zhang et al., 2015). Velké množství bakteriálních proteáz má schopnost hydrolyzovat jednovláknové a denaturované kolagenní polypeptidy. Mezi známé mikrobiální enzymy degradující kolagen patří také peptidázy, u nichž nejsou k dispozici informace o jejich aktivním místě. Tyto peptidázy byly zařazeny do rodiny neznámého katalytického typu – rodiny U32 (Ricard-Blum, 2011). Ty nelze zaměňovat s pravými bakteriálními kolagenázami, které jsou schopny napadat a degradovat trojšroubovicové nativní kolagenové fibrily nacházející se v pojivové tkáni. Nepřesné používání termínů kolagenáza, gelatináza a kolagenolytické enzymy vede k nejasnostem. Termín kolagenáza se často bez rozlišení používá jak pro metalopeptidázy z rodiny M9, tak pro serinové proteázy, tedy nikoli na základě jejich struktury či mechanismu funkce, ale pouhé jim společné schopnosti rozkládat stejný typ substrátu (Khoshnoodi et al., 2008).

4.1.1. Rodina S1

Rodina S1 peptidáz zahrnuje serinové peptidázy, což jsou enzymy, které mají aktivní místo obsahující aminokyselinu serin. Tyto enzymy mají významnou roli v proteolytických procesech (Zhang et al., 2015).

4.1.2. Rodina S8

Rodina S8 peptidáz zahrnuje také serinové peptidázy, které jsou charakterizovány svou schopností štěpit peptidové vazby za účasti kyseliny aspartové. Rodina S8, známá také jako subtilisin nebo subtiláza, je druhou nejpočetnější rodinou serinových proteáz. Proteázy z této rodiny se vyznačují katalytickou triádou aspartátu (dále jen Asp), histidinu (dále jen His), serinu (dále jen Ser) a katalytickým centrem obsahujícím sedmivláknový paralelní beta-list (Zhang et al., 2015). Termostabilní proteáza MO-1 (specifický typ proteázy, přesný název není znám) z *Geobacillus collagenovorans* byla první popsanou kolagenolytickou proteázou v rámci skupiny S8. Tento enzym má C-koncovou doménu vázající kolagen. Nedávno byly objeveny dvě kolagenolytické proteázy S8 z hlubokomořských bakterií – deseasin MCP-01 z kmene *Pseudoalteromonas sp. SM9913* a *myroikolsin* z *Myroides profundus* (Zhao et al., 2008). Deseasin MCP-01 obsahuje katalytickou doménu, linker, proproteinkonvertázovou doménu (P doména) a PKD doménu. C – koncová PKD – doména je zodpovědná za vazbu kolagenu, přičemž klíčovou roli hraje Tyrosin36 (dále jen Tyr36). PKD – doména MCP – však pravděpodobně sama o sobě nemá schopnost rozbalit trojšroubovici kolagenu (Zhang et al., 2015). Katalytická triáda MCP-01 se skládá z Asp49, His104 a Ser269. Strukturní analýzy ukázaly, že ve srovnání se subtilisinem Carlsberg má MCP-1 zvětšenou substrátovou vazebnou kapsu, která je nezbytná pro rozpoznávání kolagenu (Ran et al., 2014). Substrátová vazebná kapsa je tvořena třemi smyčkami, kde kyselé a aromatické zbytky na nich tvoří záporně nabitě hydrofobní prostředí pro vazbu kolagenu (Ran et al., 2014). Samotná katalytická doména MCP-01 může rozkládat kolagen typu I, ale s nižší účinností než intaktní MCP-01, což naznačuje významnou úlohu PKD – domény při vlastním štěpení, tedy je zde zřejmě více než pouhým linkerem (Zhang et al., 2015).

4.1.3. Rodina U32

Rodina U32 peptidáz zahrnuje cysteinové peptidázy, což jsou enzymy, které mají aktivní místo obsahující aminokyselinu cystein. Tyto peptidázy jsou často zapojeny do procesů štěpení proteinů (Zhang et al., 2015).

4.1.4. Rodina M9

Celkem dobře charakterizované jsou bakteriální „pravé“ kolagenázy z rodiny M9 (Zhang et al., 2015). Většina poznatků o těchto bakteriálních kolagenázách byla získána charakterizací kolagenázy vylučované *Clostridium histolyticum* – první bakteriální kolagenázou, která byla objevena a studována. M9 kolagenázy se dělí na třídy I a II, přičemž třída I je kódována genem *ColG* a třída II genem *ColH*. *ColG* kóduje prekurzor o 1 118 aminokyselinách a *ColH* kóduje prekurzor o 1 021 aminokyselinách (Sorusanova et al., 2019). Kromě *ColG* a *ColH* bylo identifikováno nejméně pět gelatináz, jejichž N-koncové aminokyseliny se shodují s aminokyselinami *ColG* nebo *ColH*, což naznačuje, že tyto gelatinázy jsou produkovány ze stejných prekurzorů jako kolagenázy proteolytickým odstraněním C-koncových fragmentů (Matsushita et al., 1999).

4.1.5. Kolagenázové domény

Jedná se o více doménové proteiny se signálním peptidem, pro-doménou, kolagenázovou jednotkou, jednou až dvěma spojovacími doménami typu PKD a až třemi doménami pro vazbu kolagenu (Eckhard et al., 2013). Narozdíl od eukaryotických kolagenáz není přítomna hemopexinová doména. Celková molekulová hmotnost jednotky kolagenázy je přibližně 78 kDa (Kim et al., 2002). Peptidázová doména vykazuje sedlovitou konformaci a obsahuje koordinačně vázaný zinečnatý iont, který kooperuje se dvěma histidiny (dále jen His) zbytky v konzervovaném motivu (-HEXXH), glutamátovým (dále jen Glu) zbytkem a molekulou vody (Eckhard et al., 2013; Zhang et al., 2015).

Konzervovaný motiv (-HEXXH) představuje sekvenci aminokyselin, kde "H" znamená histidin a "E" znamená glutamát, zatímco "XX" označuje dvě libovolné aminokyseliny mezi nimi. Tento motiv je charakteristický pro mnoho metaloproteáz, kde histidiny a glutamát (spolu s molekulou vody) koordinují zinečnatý iont, který je klíčový pro katalytickou aktivitu těchto enzymů (Zhang et al., 2015).

Zatímco PKD domény vykazují velkou sekvenční homologii, doména pro vazby kolagenu je definována spíše svou funkcí. Sekvenční homologie je nízká. Kromě aktivního zinečnatého iontu se v aktivním místě vyskytuje také vápenatý ion. Oba kationty jsou nutné pro plnou enzymatickou funkci (Eckhard et al., 2011). Dva vápenaté ionty jsou také koordinovány v doméně pro vazbu kolagenu a hrají důležitou roli pro zachování její funkce a stability (Zhang et al., 2015). Dosud nebylo potvrzeno, zda kolagen vázající doména může fungovat zároveň jako helikáza, která rozvolní trojšroubovici kolagenu. Dle osobního názoru si myslím, že je to však velmi pravděpodobné, protože podobné strukturní domény v jiných proteinech mají schopnost měnit konformaci svých substrátů. Vzhledem k funkcím iontů v podpoře konformačních změn a enzymatické aktivitě, může interakce s kolagenem vést k rozvolnění jeho struktury. Tato doména by mohla, podobně jako helikázy, působit změny na molekulární úrovni, které by umožnily rozvolnění kolagenové trojšroubovice. Tento mechanismus by byl v souladu s obecnými principy enzymatické aktivity a strukturní plasticity proteinů. Částečně je popsána také S1 kolagenolytická proteáza ze *Streptomyces omiyaensis*, která výrazně hydrolyzuje kolagen typu I, a to již při 37 °C. Předpokládá se, že specifitu rozpoznávání substrátu jsou zde zodpovědné N-koncové domény (Uesugi et al., 2008; Zhang et al., 2015).

4.1.6. Rodina S53

Proteázy z rodiny S53, respektive sedolisinů, obvykle vykazují maximální aktivitu při nízkém pH a vysoké teplotě a obsahují jedinečnou katalytickou triádu, motiv Ser-GluAsp, odlišný od proteáz podobných subtilisinu (Asp-His-Ser) (Zhang et al., 2015).

4.1.7. Karboanhydrázy

Identifikovány byly u zástupců řádů *Beggiatoales*, *Campylobacterales* a čeledi *Desulfobulbaceae*, které se podílejí rozkladu kostní hmoty v mořském prostředí. Většinu těchto karboanhydráz bylo možno na základě fylogenetických vztahů zařadit k dříve známým anhydrázám. Většinu do rodiny α – karboanhydráz, jednu do rodiny β (Borchert et al., 2021). Struktura karboanhydráz je zatím nejlépe prostudována u parazitických a patogenních bakterií, lze však, vzhledem k podobnosti proteinových sekvencí, předpokládat i podobnou strukturu u bakterií rozkládajících kostní hmotu (Supuran & Capasso, 2017). Trojrozměrná struktura α – karboanhydráz je známa z *Neisseria gonorrhoeae*, *Sulfurihydrogenibium azorense*, *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* a *Thermovibrio ammonificans* (Del Prete et al., 2016).

U *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* se struktura obecně podobá lidské α – karboanhydráze. Vykazuje zejména homodimerní uspořádání stabilizované velkým počtem vodíkových vazeb a několika hydrofobními interakcemi (Supuran & Capasso, 2017). Krystalizované α – karboanhydrázy jsou aktivní jako monomery a dimery (James et al., 2014). Aktivní místo se nachází v hluboké dutině, která se táhne od povrchu proteinu do středu molekuly. Je charakterizována hydrofilními a hydrofobními oblastmi. Hydrofilní část napomáhá přenosu protonu z vody vázané na zinek do rozpouštědla, zatímco hydrofobní okrasek se podílí na vazbě CO₂ a rozpoznávání ligandů. Katalytický zinečnatý ion se nachází ve spodní části této dutiny a je tetraedricky koordinován třemi His zbytky a atomem N – sulfonamidové části inhibitoru nebo pravděpodobně molekulou vody v neinhibovaném enzymu (Ferraroni et al., 2015). Bakteriální α – karboanhydrázy vykazují kompaktnější strukturu než savčí a mají oproti nim větší aktivní místo. Rentgenové krystalové struktury jsou k dispozici i pro několik Bakteriální α – karboanhydrázy vykazují kompaktnější strukturu než savčí a mají oproti nim větší aktivní místo. Rentgenové krystalové struktury jsou k dispozici i pro několik β – karboanhydráz např. z *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* a *Vibrio cholerae* (Cronk et al., 2001).

Prostorové konformace těchto enzymů jsou poměrně konzervované, i když některé z nich jsou dimery, zatímco jiné jsou tetramery. Všechny dosud vykrytalizované bakteriální β – karboanhydrázy jsou aktivní jako dimery nebo tetramery se dvěma nebo čtyřmi identickými aktivními místy. Mají tvar poměrně dlouhého kanálu, na jehož dně se nachází katalytický zinečnatý ion, tetraedricky koordinovaný dvěma cisteiny (dále jen Cis), jedním His a jedním zbytkem aminokyseliny Asp (tzv. „uzavřené aktivní místo“) (Covarrubias et al., 2006).

V neaktivní formě je hydrogenuhličitán vázán v kapse v blízkosti zinečnatého iontu. Při hodnotách pH > 8,3 se však „uzavřené aktivní místo“ mění na „otevřené“ (katalyticky aktivní), což je spojeno s přesunem zbytku Asp z katalytického iontu zinku (II) za současné koordinace přicházející molekuly vody blížící se iontu kovu (Ferraroni et al., 2015). Tato molekula vody (ve formě hydroxidového iontu) zodpovídá vlastní za katalytickou aktivitu, jak bylo ukázáno výše u α – karboanhydrázy (Supuran & Capasso, 2017).

Jednotlivé kmeny bakterií se v produkci jednotlivých druhů enzymů liší. Zatímco u *Enterobacterales* byly nalezeny prakticky všechny výše jmenované, u řádů *Campylobacteria*, *Desulfobacteria*, *Desulfobulbia*, *Desulfuromonadia*, *Desulfovibrio*, prakticky chybí α – galaktosidázy, fukosidázy, glukuronidázy, mannosidázy a sialidázy (Fernandez-Lopez et al., 2021).

4.2. Aktivita bakteriálních enzymů při dekompozici kostní tkáně

Vzhledem ke strukturní a chemické komplexitě kostní hmoty je její rozklad výsledkem synergické činnosti celého bakteriálního společenstva (Steffen et al., 2015). Fernandez-Lopez et al. (2021) podrobně zmapoval tento systém v mořském prostředí. Z kvantitativního hlediska zde přitom hlavní úlohu hrají *Proteobacteria*, (*Alteromonadaceae*, *Beggiatoaceae*, *Kangiellaceae* a *Nitrincolaceae*) produkující kolagenázu M09 i U32 a *Bacteroidota* (*Flavobacteriaceae*, *Marinifilaceae*), *Desulfobacterota* (*Desulfobacteraceae*) a *Campylobacterota* (*Sulfurimonadaceae*, *Sulfurospirillaceae*, *Sulfurovaceae* a *Thiovulaceae*) produkující pouze kolagenázu U32. K odolnosti kostní hmoty dále výrazně přispívají sialo/glykoproteiny, na jejichž rozkladu se podílí především *Bacteroidota* (z nich nejvíce *Flavobacteriaceae* a *Marinifilaceae*), a v menší míře *Verrucomicrobiota* a *Krumholzibacteriota*, produkující odlišné typy sialidáz (Sato et al., 1985).

Velké synergie působení různých enzymatických produktů je zapotřebí také při hydrolyze glykoproteinů, na níž se podílí pravděpodobně příslušníci 7 bakteriálních kmenů: *Bacteroidota* (především *Flavobacteriaceae* a *Marinifilaceae*) jsou schopná pravděpodobně rozkladu všech cukerných zbytků včetně α – mannózy, β -N – acetyl – hexosaminu, α – galaktózy, α – rhamnózy, β – glukózy, α -N – acetyl – hexosaminu, α – fukózy a β – galaktózy (Eriksen et al., 2020). *Firmicutes* (*Clostridiaceae* a *Paenibacillaceae*) se zřejmě podílí na rozkladu α – mannózy a α -N – acetyl – hexosaminu, *Proteobacteria* (*Alteromonadaceae*, *Kangiellaceae* a *Nitrincolaceae*) na degradaci β -N-acetyl-hexosaminu a částečně i β – glukózy a β – galaktózy. *Planctomycetota* štěpí α -galaktózu a α -mannózu, *Campylobacterota* (*Sulfurimonadaceae* a *Sulfurovaceae*), β -N – acetyl – hexosamin a částečně i β – glukózu, *Spirochaetota* (z nich především *Spirochaetaceae*) a konečně *Verrucomicrobiota* (např. *Victivallaceae*) α – mannózu (Fernandez-Lopez et al., 2021). Takový je alespoň předpoklad založený na sekvencích enzymů náležejících jednotlivým taxonomickým skupinám, v reálném prostředí může celková aktivita při štěpení jednotlivých složek záviset na velikosti populací a míře exprese enzymů (Freitas et al., 2019).

4.3. Mechanismus působení bakteriálních enzymů při dekompozici kostní tkáně

Odolnost trojšroubovicové struktury kolagenu a ochranný vliv komplexu proteinové a krystalitové složky kosti jsou klíčové faktory, které přispívají k postupnému rozkladu kostní tkáně. Tento proces je těsně propojen a synergicky spolupracuje s chemickou degradací hydroxyapatit (Jiang et al., 2005). Trojšroubovicová struktura kolagenu poskytuje vysokou mechanickou stabilitu, což ztěžuje enzymatickou hydrolýzu. Pevnost kolagenu je způsobena vzájemnými vazbami a interakcemi mezi proteinovými vlákny a krystalitovou složkou kosti (Turner-Walker, 2007).

Důležitým krokem v procesu rozkladu kostní tkáně je hydrolýza kolagenu na želatinu, která následně podléhá další degradaci. Tento krok je uskutečňován acidifikací, což zajišťuje karboanhydráza. Acidifikace prostřednictvím enzymatické aktivity vytváří kyselé prostředí, což je klíčové pro aktivaci enzymů, jež jsou zodpovědné za hydrolýzu kolagenu a následný rozklad kostní tkáně (Zhang et al., 2015; Borchert et al., 2021).

V kontextu synergického působení bakteriálních společenstev je důležité zmínit také koloběh síry, který hraje významnou roli v degradaci kostí v mořském prostředí. Oxidace síry a sirných sloučenin, známá jako thiotrofie, vytváří volné protony, což vede k okyselení prostředí. Některé bakterie z řádu *Campylobacterales* jsou vybaveny kompletními enzymovými systémy Sox (soxXYZABCD) a Sor, které jsou odpovědné za oxidaci síry. Tyto enzymy pomáhají aktivovat redukované sloučeniny síry a slouží jako donory elektronů (Borchert et al., 2021). V případě *Gamma*proteobakterií, především přidružených k *Beggiatoaceae* a dalším nezařazeným skupinám, existuje potenciál pro thiotrofii. Tyto bakterie jsou schopné využívat redukované sloučeniny síry jako donory elektronů, a to prostřednictvím enzymů jako flavocytochrom c-sulfiddehydrogenáza a adenosin-5'-fosfo sulfátreduktáza, (aprAB) (Bochert et al., 2021). Schopnost thiotrofie představuje další dimenzi v synergii mikrobiálního působení na rozklad kostní tkáně v mořském prostředí. Celkově lze konstatovat, že vzájemné působení trojšroubovicové struktury kolagenu, enzymů jako karboanhydráza a bakteriálních společenstev v rámci koloběhu síry vytváří komplexní síť, která usměrňuje a řídí postupný rozklad kostní tkáně (Zhang et al., 2015).

Závěr

V bakalářské práci jsem se zaměřila na prozkoumání úlohy bakterií a bakteriálních enzymů v procesu dekompozice kostní tkáně. Cílem této bakalářské práce je shrnout bakteriální rodiny zastoupené při dekompozici kostní tkáně a popsat molekulární mechanismy působení během bakteriální činnosti. Hlavním cílem je nalézt odpověď na otázku, které bakterie se účastní dekompozice kostní tkáně a jak jejich enzymatická aktivita dekompozici ovlivňuje. Z rešerše vyplývá, že mezi hlavní rodiny bakterií účastnící se dekompozice kostní tkáně patří *Bacteroidia*, *Fermentibacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Geopsychrobacteraceae*, *Krumholzibacteria*, *Planctomycetota*, *Spirochaetia* a *Thiovulaceae*. Především v rozkladu figurují jejich bakteriální enzymy. Tyto enzymy s kolagenolytickou aktivitou, patří do rodin S1, S8 a U32, a dále i rodina M9 u *Enterobacteriales*. Všechny tyto enzymy se podílejí na dekompozici organických komponent kostí. V rámci práce bylo zjištěno, že bakteriální kolagenázy jsou méně specifické než kolagenázy živočišného původu a mohou rozkládat jak denaturované, tak nativní kolagenové fibrily. Důležitým faktorem je i role PKD a domén pro vazbu kolagenu, které přispívají k rozpoznávání a rozkladu trojšroubovicové struktury kolagenu. Na bakteriálním rozkladu kostní hmoty se podílí i α -galaktosidázy, cholesteroloxidázy, fukozidázy, galaktozaminidázy, glukozaminidázy, glukuronidázy, glykosidázy, mannosidázy a sialidázy. Tato rozmanitost enzymů je důležitá pro efektivní dekompozici kostní tkáně v různých prostředích a podmínkách. Aktivita těchto enzymů byla podrobně charakterizována, což nám umožňuje lépe rozumět jejich specifickým mechanismům působení a interakcím s kostní tkání.

Bylo zjištěno, že interakce mezi bakteriálními enzymy a kostní tkání je vysoce specifická a závisí na řadě faktorů, včetně chemického složení kosti, přítomnosti minerálů a fyzikálně-chemických podmínek prostředí. Vzhledem k rozsahu dosavadních poznatků o struktuře a mechanismu působení bakteriálních enzymů schopných štěpit kostní tkáň, je velmi pravděpodobné, že stále existuje mnoho neobjevených bakteriálních kolagenolytických proteáz skrytých v rozličných prostředích. Řešení otázek v tomto tématu by mohlo přispět k hlubšímu pochopení funkce bakteriálních proteinů a také k odhalení dalších proteáz s biotechnologickým a průmyslovým potenciálem. Prostor by se naskytl i u méně probádaných druhů bakteriálních enzymů, zejména těch s karbanhydrázovou, sialidázovou a glykosidázovou aktivitou. Do budoucna rozšířením poznatků do bakteriálních enzymech lze optimalizovat vývoj nových konzervačních látek pro archeologické nálezy nebo vylepšení forenzních technik pro odhad času úmrtí.

Seznam použité literatury

- Amendt, J., Goff, M. L., Campobasso, C. P., & Grassberger, M. (Eds.). (2010). *Current concepts in forensic entomology*. Springer Netherlands.
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(10), 782–791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>
- Benbow, M. E., Pechal, J. L., Lang, J. M., Erb, R., & Wallace, J. R. (2015). The Potential of High throughput Metagenomic Sequencing of Aquatic Bacterial Communities to Estimate the Postmortem Submersion Interval. *Journal of forensic sciences*, 60(6), 1500–1510. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12859>
- Benninger, L. A., Carter, D. O., & Forbes, S. L. (2008). The biochemical alteration of soil beneath a decomposing carcass. *Forensic Science International*, 180(2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.07.001>
- Borchert, E., Garcia-Moyano, A., Sanchez-Carrillo, S., Dahlgren, T. G., Slaby, B. M., Bjerga, G. E. K., Ferrer, M., Franzenburg, S., & Hentschel, U. (2021). Deciphering a Marine Bone-Degrading Microbiome Reveals a Complex Community Effort. *mSystems*, 6(1), e01218-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01218-20>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3 Suppl 3(Suppl 3), S131-139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Covarrubias, A. S., Bergfors, T., Jones, T. A., & Högbom, M. (2006). Structural mechanics of the pH-dependent activity of beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4993–4999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510756200>
- Cronk, J. D., Endrizzi, J. A., Cronk, M. R., O'Neill, J. W., & Zhang, K. Y. (2001). Crystal structure of E. coli beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 10(5), 911–922. <https://doi.org/10.1110/ps.46301>
- Damann, F. E., Williams, D. E., & Layton, A. C. (2015). Potential Use of Bacterial Community Succession in Decaying Human Bone for Estimating Postmortem Interval. *Journal of Forensic Sciences*, 60(4), 844–850. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12744>
- Del Prete, S., Vullo, D., De Luca, V., Carginale, V., Ferraroni, M., Osman, S. M., AlOthman, Z., Supuran, C. T., & Capasso, C. (2016). Sulfonamide inhibition studies of the β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(5), 1115–1120. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.037>
- *Dent, B. B., Forbes, S. L., & Stuart, B. H. (2004). Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology*, 45(4), 576–585. <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0913-z>
- Downey, P. A., & Siegel, M. I. (2006). Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Physical Therapy*, 86(1), 77–91. <https://doi.org/10.1093/ptj/86.1.77>
- Eckhard, U., Schönauer, E., Nüss, D., & Brandstetter, H. (2011). Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(10), 1109–1114. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2127>
- Eckhard, U., Schönauer, E., & Brandstetter, H. (2013). Structural basis for activity regulation and substrate preference of clostridial collagenases G, H, and T. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20184–20194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448548>
- Emmons, A. L., Mundorff, A. Z., Hoeland, K. M., Davoren, J., Keenan, S. W., Carter, D. O., Campagna, S. R., & DeBruyn, J. M. (2022). Postmortem Skeletal Microbial Community Composition and Function in Buried Human Remains. *mSystems*, 7(2), e00041-22. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00041-22>
- Emmons, A. L., Mundorff, A. Z., Keenan, S. W., Davoren, J., Andronowski, J., Carter, D. O., & DeBruyn, J. M. (2020). Characterizing the postmortem human bone microbiome from surface-decomposed remains. *PLoS ONE*, 15(7), e0218636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218636>
- Eriksen, A. M. H., Nielsen, T. K., Matthiesen, H., Carøe, C., Hansen, L. H., Gregory, D. J., Turner-Walker, G., Collins, M. J., & Gilbert, M. T. P. (2020). Bone biodeterioration—The effect of marine and terrestrial depositional environments on early diagenesis and bone bacterial community. *PLoS ONE*, 15(10), e0240512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240512>
- Falgayrac, G., Vitale, R., Delannoy, Y., Behal, H., Penel, G., Olejnik, C., Duponchel, L., & Colard, T. (2022). Bone Molecular Modifications Induced by Diagenesis Followed-Up for 12 Months. *Biology*, 11(10), 1542. <https://doi.org/10.3390/biology11101542>
- Fernandez-Lopez, L., Sanchez-Carrillo, S., Garcia-Moyano, A., Borchert, E., Almendral, D., Alonso, S., Cea-Rama, I., Miguez, N., Larsen, Ø., Werner, J., Makarova, K. S., Plou, F. J., Dahlgren, T. G., Sanz-Aparicio, J., Hentschel, U., Bjerga, G. E. K., & Ferrer, M. (2021). The bone-degrading enzyme machinery: From multi-component understanding to the treatment of residues from the meat industry. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 6328–6342. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.027>

- Ferraroni, M., Del Prete, S., Vullo, D., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2015). Crystal structure and kinetic studies of a tetrameric type II β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 71(12), 2449–2456. <https://doi.org/10.1107/S1399004715018635>
- Fiedler, S., & Graw, M. (2003). Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. *Naturwissenschaften*, 90(7), 291–300. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0437-0>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Freitas, R. C. de, Marques, H. I. F., Silva, M. A. C. da, Cavalett, A., Odisi, E. J., Silva, B. L. da, Montemor, J. E., Toyofuku, T., Kato, C., Fujikura, K., Kitazato, H., & Lima, A. O. de S. (2019). Evidence of selective pressure in whale fall microbiome proteins and its potential application to industry. *Marine Genomics*, 45, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.11.004>
- Graw, M., Weisser, H.-J., & Lutz, S. (2000). DNA typing of human remains found in damp environments. *Forensic Science International*, 113(1), 91–95. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00221-8)
- Gupta, R., & Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>
- Haglund, W. D., & Sorg, M. H. (1997). *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. CRC Press.
- Hanson, D. B., & Buikstra, J. E. (1987). Histomorphological alteration in buried human bone from the lower Illinois Valley: Implications for palaeodietary research. *Journal of Archaeological Science*, 14(5), 549–563. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(87\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0305-4403(87)90038-0)
- Harrington, D. J. (1996). Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infection and Immunity*, 64(6), 1885–1891.
- Hart, N. H., Newton, R. U., Tan, J., Rantalainen, T., Chivers, P., Siafarikas, A., & Nimphius, S. (2020). Biological basis of bone strength: Anatomy, physiology and measurement. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 20(3), 347–371.
- Hiorns, W. D., Methé, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A., & Zehr, J. P. (1997). Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2957–2960. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2957-2960.1997>
- Child, A. M. (1995). Towards and Understanding of the Microbial Decomposition of Archaeological Bone in the Burial Environment. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 165–174.
- James, P., Isupov, M. N., Sayer, C., Saneei, V., Berg, S., Lioliou, M., Kotlar, H. K., & Littlechild, J. A. (2014). The structure of a tetrameric α -carbonic anhydrase from *Thermovibrio ammonificans* reveals a core formed around intermolecular disulfides that contribute to its thermostability. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 70(10), 2607–2618. <https://doi.org/10.1107/S1399004714016526>
- Jans, M. M., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Collins, M. J., & Kars, H. (2004). Characterisation of microbial attack on archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 31(1), 87-95.
- Jiang, Y. M., Li, X. H., Feng, B., & Weng, J. (2005). The effect of different surface modification agents on the dispersion of nano-hydroxyapatite (n-HA) crystallites. *Key Engineering Materials*, 284, 55-58.
- Kaiser, C. R., Major, B., Jurcevic, I., Dover, T. L., Brady, L. M., & Shapiro, J. R. (2013). Presumed fair: ironic effects of organizational diversity structures. *Journal of personality and social psychology*, 104(3), 504–519. <https://doi.org/10.1037/a0030838>
- Kaszubinski, S. F., Receveur, J. P., Nestle, E. D., Pechal, J. L., & Benbow, M. E. (2022). Microbial community succession of submerged bones in an aquatic habitat. *Journal of Forensic Sciences*, 67(4), 1565–1578. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15036>
- Kato, T., Takahashi, N., & Kuramitsu, H. K. (1992). Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis* prtC gene, which expresses a novel collagenase activity. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 3889–3895. <https://doi.org/10.1128/jb.174.12.3889-3895.1992>
- Kenkre, J., & Bassett, J. (2018). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry*, 55(3), 308–327. <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., & Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microscopy Research and Technique*, 71(5), 357–370. <https://doi.org/10.1002/jemt.20564>
- Kim, S. K., Yang, J. Y., & Cha, J. (2002). Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene*, 283(1-2), 277–286. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00882-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00882-4)
- Körgesaar, K., Jordana, X., Gallego, G., Defez, J., & Galtés, I. (2022). Taphonomic model of decomposition. *Legal Medicine*, 56, 102031. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2022.102031>

- Krane, S. M. (1982). Collagenases and collagen degradation. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(1), 83-86. <https://doi.org/10.1038/jid.1982.16>
- Langdahl, B., Ferrari, S., & Dempster, D. W. (2016). Bone modeling and remodeling: Potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 8(6), 225–235. <https://doi.org/10.1177/1759720X16670154>
- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., ... & Zhao, L. (2008). Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2117-2122. <https://doi.org/10.1073/pnas.071203810>
- Loy, C., Brock, F., & Dyer, C. (2023). Investigating diagenesis of archaeological bones from Etton Causewayed enclosure, UK. *Quaternary International*, 660, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2022.12.012>
- MacLennan, J. D., Mandl, I., & Howes, E. L. (1953). Bacterial digestion of collagen. *The Journal of clinical investigation*, 32(12), 1317–1322. <https://doi.org/10.1172/JCI102860>
- Matsushita, O., Jung, C. M., Katayama, S., Minami, J., Takahashi, Y., & Okabe, A. (1999). Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. *Journal of Bacteriology*, 181(3), 923–933. <https://doi.org/10.1128/JB.181.3.923-933.1999>
- Matsushita, O., Yoshihara, K., Katayama, S., Minami, J., & Okabe, A. (1994). Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology*, 176(1), 149–156. <https://doi.org/10.1128/jb.176.1.149-156.1994>
- MEROPS the Peptidase Database. (2024). *MEROPS the Peptidase Database. Version 12.5*. Retrieved March, 2024, <https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>
- Notter, S. J., Stuart, B. H., Rowe, R., & Langlois, N. (2009). The Initial Changes of Fat Deposits During the Decomposition of Human and Pig Remains. *Journal of Forensic Sciences*, 54(1), 195–201. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00911.x>
- Ohbayashi, N., Yamagata, N., Goto, M., Watanabe, K., Yamagata, Y., & Murayama, K. (2012). Enhancement of the structural stability of full-length clostridial collagenase by calcium ions. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5839-5844. <https://doi.org/10.1128/AEM.00808-12>
- Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y.-Y., Kaufman, M. J., Douglas, E. P., & Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3), 77–116. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
- Procopio, N., Mein, C. A., Starace, S., Bonicelli, A., & Williams, A. (2021). Bone Diagenesis in Short Timescales: Insights from an Exploratory Proteomic Analysis. *Biology*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/biology10060460>
- Ran, L.-Y., Su, H.-N., Zhou, M.-Y., Wang, L., Chen, X.-L., Xie, B.-B., Song, X.-Y., Shi, M., Qin, Q.-L., Pang, X., Zhou, B.-C., Zhang, Y.-Z., & Zhang, X.-Y. (2014). Characterization of a novel subtilisin-like protease myroicolsin from deep sea bacterium *Myroides profundus* D25 and molecular insight into its collagenolytic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 6041–6053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513861>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rogers, L. D., & Overall, C. M. (2013). Proteolytic Post-translational Modification of Proteins: Proteomic Tools and Methodology. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 12(12), 3532–3542. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031310>
- Sato, S., Rahemtulla, F., Prince, C. W., Tomana, M., & Butler, W. T. (1985). Acidic glycoproteins from bovine compact bone. *Connective Tissue Research*, 14(1), 51–64. <https://doi.org/10.3109/03008208509089843>
- Schoeninger, M. J., Moore, K. M., Murray, M. L., & Kingston, J. D. (1989). Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples. *Applied Geochemistry*, 4(3), 281–292. [https://doi.org/10.1016/0883-2927\(89\)90030-9](https://doi.org/10.1016/0883-2927(89)90030-9)
- Shedge, R., Krishan, K., Warriar, V., & Kanchan, T. (2023). *Postmortem changes*. StatPearls Publishing LLC.
- *Shenoy, M., Abdul, N. S., Qamar, Z., Bahri, B. M. A., Al Ghalayini, K. Z. K., & Kakti, A. (2022). Collagen Structure, Synthesis, and Its Applications: A Systematic Review. *Cureus*, 14(5), e24856. <https://doi.org/10.7759/cureus.24856>
- Siles, J. A., Öhlinger, B., Cajthaml, T., Kistler, E., & Margesin, R. (2018). Characterization of soil bacterial, archaeal and fungal communities inhabiting archaeological human-impacted layers at Monte Iato settlement (Sicily, Italy). *Scientific Reports*, 8(1), 1903. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20347-8>
- Simonsen, J. (1977). Early Formation of Adipocere in Temperate Climate. *Medicine, Science and the Law*, 17(1), 53–55. <https://doi.org/10.1177/002580247701700107>

- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A. M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., & Zeugolis, D. I. (2019). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, *31*(1), e1801651. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S. E., Fetzer, I., Bennett, E. M., ... & Sörlin, S. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *science*, *347*(6223), 1259855.
- Su, N., Yang, J., Xie, Y., Du, X., Chen, H., Zhou, H., & Chen, L. (2019). Bone function, dysfunction and its role in diseases including critical illness. *International Journal of Biological Sciences*, *15*(4), 776–787. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27063>
- *Supuran, C. T., & Capasso, C. (2017). An Overview of the Bacterial Carbonic Anhydrases. *Metabolites*, *7*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/metabo7040056>
- Turner-Walker, G. (2007). *Degradation pathways and conservation strategies for ancient bone from wet, anoxic sites*.
- Uesugi, Y., Arima, J., Usuki, H., Iwabuchi, M., & Hatanaka, T. (2008). Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1784*(4), 716–726. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.01.017>
- Vass, A.A. (2001) Beyond the Grave—Understanding Human Decomposition. *Microbiology Today*, *28*, 190-192.
- Wang, Y.-K., Zhao, G.-Y., Li, Y., Chen, X.-L., Xie, B.-B., Su, H.-N., Lv, Y.-H., He, H.-L., Liu, H., Hu, J., Zhou, B.-C., & Zhang, Y.-Z. (2010). Mechanistic insight into the function of the C-terminal PKD domain of the collagenolytic serine protease deseasin MCP-01 from deep sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: Binding of the PKD domain to collagen results in collagen swelling but does not unwind the collagen triple helix. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(19), 14285–14291. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.087023>
- Wilkins, D., Yau, S., Williams, T. J., Allen, M. A., Brown, M. V., DeMaere, M. Z., Lauro, F. M., & Cavicchioli, R. (2013). Key microbial drivers in Antarctic aquatic environments. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(3), 303–335. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12007>
- Wittig, N. K., & Birkedal, H. (2022). Bone hierarchical structure: Spatial variation across length scales. *Acta Crystallographica Section B, Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, *78*(3), 305–311. <https://doi.org/10.1107/S2052520622001524>
- *Wu, S., Zhou, X., Jin, Z., & Cheng, H. (2023). Collagenases and their inhibitors: A review. *Collagen and Leather*, *5*. <https://doi.org/10.1186/s42825-023-00126-6>
- Yoshino, M., Kimijima, T., Miyasaka, S., Sato, H., & Seta, S. (1991). Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. *Forensic Science International*, *49*(2), 143–158. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(91\)90074-S](https://doi.org/10.1016/0379-0738(91)90074-S)
- Zhang, Y.-Z., Ran, L.-Y., Li, C.-Y., & Chen, X.-L. (2015). Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(18), 6098–6107. <https://doi.org/10.1128/AEM.00883-15>
- Zhao, G.-Y., Chen, X.-L., Zhao, H.-L., Xie, B.-B., Zhou, B.-C., & Zhang, Y.-Z. (2008). Hydrolysis of insoluble collagen by deseasin MCP-01 from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: Collagenolytic characters, collagen-binding ability of C-terminal polycystic kidney disease domain, and implication for its novel role in deep-sea sedimentary particulate organic nitrogen degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(52), 36100–36107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804438200>