

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Hana Kotková

Změny ve schopnosti perzistovat u chronologických izolátů

Staphylococcus aureus

Changes in the ability to form persisters in chronological
isolates of *Staphylococcus aureus*

Diplomová práce

Školitel: **RNDr. Irena Lichá, CSc.**

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 26.4.2019

.....

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat své školitelce paní RNDr. Ireně Liché, CSc za věnovaný čas a vlídný přístup při vedení této práce. Velmi si vážím pomoci při mých začátcích práce v laboratoři, cenných rad a připomínek, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Dále děkuji laborantce Lucii Jánské za perfektní technickou asistenci v průběhu provádění našich pokusů a bc. Anetě Valtové za spolupráci a pomoc během práce v laboratoři.

Chtěla bych dále poděkovat MVDr. Jozefu Jandovi, Ph.D. za odbornou pomoc při práci na průtokovém cytometru a při vyhodnocování výsledků z tohoto přístroje. Bez něj bychom metodu měření na průtokovém cytometru nezvládly zoptimalizovat.

Mé velké poděkování patří v neposlední řadě také mým rodičům a bratrovi, kteří mě v průběhu celého studia na vysoké škole podporovali. Děkuji rovněž mému příteli Honzovi za podporu při studiu a při sepisování práce. Na závěr bych chtěla poděkovat kamarádce Janče za její rady a podporu.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2017-2019 a byla vypracována za finanční podpory grantu Ministerstva zdravotnictví AZV 17-30460A/2017.

ABSTRAKT

U imunodeficientních pacientů, např. s cystickou fibrózou (CF), oportunní patogen *Staphylococcus aureus* způsobuje chronické infekce respiračního traktu, které se léčí dlouhodobě antibiotiky (ATB). Vystavení antibiotik ovšem může vést k navození perzistence, což se v důsledku toho projeví opakovaným návratem infekce.

Cílem této práce bylo sledovat u vybraných dvojic chronologických izolátů *S. aureus* pocházejících z dýchacího traktu pacientů s CF, jak se v časovém období mění míra schopnosti perzistovat. Zjistila jsem, že schopnost perzistovat se v rámci klonální dvojice po dvou letech přežívání v hostiteli příliš nemění a že schopnost perzistovat záleží na adaptačních mutacích izolátů. Tvorba perzisterů může záviset na mutacích v operonech pro alternativní sigma B faktor (*sigB*) a hlavní regulátor virulencních genů (*agr*). Duálním barvením DioC₂(3) a To-pro-3 se mi podařilo v průběhu křivky hynutí po působení antibiotik určit změnu membránového potenciálu a propustnosti membrány. Rozdělení do subpopulací dle těchto parametrů závisí především na použitém antibiotiku. Z toho vyvozují, že různá antibiotika mohou indukovat různé mechanismy pro navození perzistentního stavu. Dále jsem pro stanovení exprese *sigB* a *agr* operonů sestavila konstrukty plazmidů se značeným promotorem (*sigB*-GFP, *agr*-GFP), avšak vzhledem k specifickému restričnímu systému se mi je nepodařilo vnést do klinických izolátů. Proto jsem testovacím pokusem metodou kvantitativní RT PCR analyzovala expresi mRNA *sigB* u klinického izolátu 2, defektního v *agrB*. Exprese *sigB* byla u tohoto mutantu nízká, což by nasvědčovalo vzájemnému propojení regulace exprese *sigB* a *agr*.

Klíčová slova: perzisteri, stresové adaptace, působení antibiotik, SigB, Agr, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

In immunodeficient patients, for example with cystic fibrosis (CF), the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* causes chronic infections of respiratory tract that are treated with antibiotics (ATB) in the long term. However, exposure to antibiotics can lead to persistence, thereby result a recurrence of infection.

The aim of this work was to examine in selected pairs of *S. aureus* chronological isolates from the respiratory tract of CF patients how their ability to form persisters is changing in time. I have found that the ability to persist within the clonal pair does not change significantly after two years of survival in the host, and that the ability to persist depends on the adaptative mutations of the isolates. Persister formation may depend on mutations in operon of the alternative sigma B factor (*sigB*) and the major virulence gene regulator (*agr*). By dual staining with DioC₂(3) and To-pro-3, I was able to determine the changes in membrane potential and membrane permeability during the killing curve with ATBs. The distribution into subpopulations according to these parameters depends primarily on the antibiotic used. I conclude that various antibiotics can induce different mechanisms causing a persistent state. Futhermore, I have constructed plasmids with a labeled promoter to determine the expression of *sigB* and *agr* operons (*sigB*-GFP, *agr*-GFP), but due to the specific restriction system, I did not succeed to introduce them into clinical isolates. Therefore, by the quantitative RT PCR method, I analyzed *sigB* mRNA expression in clinical isolate 2 which is defected in *agrB* gene. The expression of *sigB* was low in this mutant, suggesting a link between regulation of *sigB* and *agr* expression.

Key words: persisters, stress adaptation, antibiotic treatment, SigB, Agr, *Staphylococcus aureus*

OBSAH

Abstrakt

Abstract

Obsah

Seznam zkratk

1	Úvod	11
2	Přehled literatury.....	13
2.1	Perzistence	13
2.2	Životní cyklus perzistera – jeho vznik, fyziologický stav a resuscitace.....	14
2.2.1	Navození perzistence	14
2.2.2	Fyziologický stav perzisterů	16
2.2.3	Resuscitace perzisterů.....	22
2.3	Geny související s navozením stavu perzistence	23
2.3.1	Souvislost perzistence a obecné stresové odpovědi	23
2.3.2	Souvislost perzistence s Agr systémem <i>S. aureus</i>	26
2.4	Klinický význam perzistence.....	30
2.4.1	Možnosti detekce a eradikace perzisterů v klinické praxi	31
3	Materiál a Metody	34
3.1	Materiál.....	34
3.1.1	Bakteriální kmeny	34
3.1.2	Plazmidy	35
3.1.3	Kultivační média	36
3.1.4	Použitá antibiotika	36
3.1.5	Enzymy	37
3.1.6	Chemikálie.....	37
3.1.7	Roztoky.....	38
3.1.8	Primery	39
3.1.9	Komerční soupravy	40
3.1.10	Přístroje a laboratorní vybavení.....	40
3.1.11	Vyhodnocovací programy a internetové odkazy	41
3.2	Metody.....	42
3.2.1	Práce s bakteriální kulturou	42
3.2.2	Příprava konzerv pro uchovávání kmenů	42

3.2.3	Příprava kultury pro provedení pokusů	42
3.2.4	Určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) klinických izolátů	42
3.2.5	TD test (tolerance disk test).....	43
3.2.6	Křivka hynutí s antibiotiky	43
3.2.7	Sběr buněk pro izolaci RNA.....	44
3.2.8	Příprava vzorků a měření membránového potenciálu průtokovým cytometrem	45
3.2.9	Práce s bakteriální DNA	46
3.2.10	Práce s bakteriální RNA	53
3.2.11	Kvantitativní polymerázová reakce (qPCR).....	54
4	Výsledky.....	56
4.1	Fenotypová korelace s genotypem jednotlivých izolátů.....	56
4.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) klinických izolátů	58
4.3	Provedení TD testu	59
4.4	Stanovení křivek hynutí po působení antibiotik pro dvojice izolátů – 1, 2; 5, 6 a 23, 24	61
4.5	Vliv antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu na membránový potenciál v průběhu křivek hynutí u izolátů 1, 2 a 5, 6	68
4.6	Příprava konstruktů pro stanovení exprese <i>sigB</i> a <i>agr</i> operonů v jednotlivých časech křivky hynutí u klinických izolátů	75
4.7	Sledování exprese <i>sigB</i> metodou kvantitativní RT PCR	81
5	Diskuze	84
6	Souhrn.....	93
7	Přehled použité literatury	94

SEZNAM ZKRATEK

Agr systém	System účastníci se regulace exprese genů virulence (Accessory gene regulator)
AgrA	Regulátor odpovídající na fosforylaci histidinové kinázy AgrC
AgrB	Transportér quorum sensing molekuly AIP
AgrC	Histidinová kináza dvoukomponentového AgrC-AgrA systému
AgrD	Prekurzor quorum sensing molekuly AIP
AIP	Auto-indukující peptid, quorum sensing molekula
Amp	Ampicilin, β -laktamové antibiotikum
ATB	Antibiotikum
BS	Buněčná stěna
cDNA	DNA vzniklá reverzní transkripcí RNA
CF	Cystická fibróza
CFU	Jednotky tvořící kolonie (colony forming units)
Cip	Ciprofloxacin, fluorochinolonové antibiotikum
DioC₂(3)	3,3'-Diethyloxacarbokyanin, fluorogenní indikátor membránového potenciálu
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, hodnocení a třídění buněk na základě jejich odlišné fluorescence
FC	Průtoková cytometrie
FSC	Forward scatter, rozptyl vedený podél paprsku laseru
Gen	Gentamicin, aminoglykosidové antibiotikum
GFP	Zelený fluorescenční protein
HokB	Toxin hok/sok TA systému
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
Obg	GTPáza vázající (p)ppGpp
OD	Optická denzita
Oxa	Oxacilin, β -laktamové antibiotikum
PSM	Moduliny rozpustné ve fenolu (phenol soluble modulins), virulenční faktory <i>S. aureus</i>
(p)ppGpp	Guanosin tetrafosfát (pentafosfát) indukující stringentní odpověď
qPCR	Kvantitativní PCR
QS	Quorum sensing
RE	Restrikční enzym

RelA	GTP pyrofosfokináza, produkuje (p)ppGpp
RM systém	Restrikčně-modifikační systém
RPF	Faktory podporující resuscitaci
RpoS	Alternativní sigma faktor stresové odpovědi u <i>Escherichia coli</i>
RT	Reverzní transkripce
RNAIII	Jeden ze dvou transkriptů <i>agr</i> operonu
SarA	Transkripční regulátor ovlivňující virulenční faktory
SCV	Trpasličí kolonie <i>S. aureus</i> (small colony variants)
SigB	Alternativní sigma B faktor
SSC	Side scatter, rozptyl vedený v úhlu 90 ° vůči paprsku laseru
SpA	Stafylokokový protein A (na jeho sekvenci je založena typizace <i>S. aureus</i>)
TA systém	Toxin-antitoxin systém
TCA	Krebsův cyklus
Tet	Tetracyklin, tetracyklinové antibiotikum
To-pro-3	Fluorescenční barvivo vázající se na DNA
Van	Vankomycin, glykopeptidové antibiotikum

1 ÚVOD

Podle dosavadních poznatků geneticky homogenní bakteriální populace nemusí být homogenní po stránce fyziologické a fenotypové. Příkladem je právě vznik perzistentních buněk, máme-li geneticky identickou bakteriální populaci a působíme-li na ni antibiotikem, jistá subpopulace buněk léčbu antibiotiky přežije. I přesto, že je geneticky stejná jako populace, která byla antibiotiky zabita.

Fenomén perzistence byl poprvé pozorován krátce po zavedení léčby penicilinem v roce 1944 (Bigger, 1944), avšak větší pozornosti se v průběhu času věnovalo studiu rezistence a na perzistenci se pozapomnělo. Znovuobjevení tohoto fenoménu na přelomu tisíciletí a současně potvrzení jeho klinického významu v rekurentních chronických infekcích (Proctor et al. 1995) však postavilo perzistenci opět do popředí zájmu různých vědeckých skupin po celém světě.

Podle současných hypotéz mohou perzisteři v populaci vzniknout souhrou stochastických a deterministických procesů (Michiels et al. 2016). Většinou se předpokládá, že perzistence je dormantní stav, kdy buňka tlumí metabolickou aktivitu, translaci, transkripci (Kwan et al. 2013) a snižuje membránový potenciál (Verstraeten et al. 2015; Wang et al. 2018), ačkoliv i tento stav dormance může být spojen s aktivními mechanismy jako je například zvýšení efluxu antibiotika z buňky (Pu et al. 2016). V současnosti převládá názor, že mechanismy vzniku a průběhu perzistence jsou velmi heterogenní (shrnuto v review Harms et al. 2016).

Jednou z hlavních modelových grampozitivních bakterií, na které je perzistence intenzivně studována, je oportunní patogen *Staphylococcus aureus*. V reakci na stres *S. aureus* využívá obecnou stresovou odpověď, která je indukována alternativním Sigma B faktorem (SigB) (Wu et al. 1996). Je tedy otázkou, zda by SigB nemohl souviset se vznikem perzisterů (perzistentní populace). Tuto domněnku podporuje fakt, že v SigB regulonu se nachází tzv. Agr (accessory gene regulator) systém (Bischoff et al. 2001), který zásadním způsobem reguluje virulenční geny. Podle současných prací má Agr systém na navození perzistence negativní vliv (Xu et al. 2017). Indukce a represe systému Agr vede k „přepínání“ mezi dvěma odlišnými fenotypy: indukce Agr vede k produkci virulenčních faktorů způsobujících akutní infekci, represe vede k navození perzistence a vzniku chronického onemocnění (Kahl et al. 2016; Xu et al. 2017).

Ačkoliv poznání podstaty fenoménu perzistence během posledních desítek let významně pokročilo, v klinické praxi je to stále jev skoro neznámý a neprovádí se žádné testování na

perzistenci z klinického materiálu. V případě, že k perzistenci dojde, neexistuje dosud žádný způsob, jak jednoznačně tuto odolnou subpopulaci bakterií zabít a pacienta tak kompletně vyléčit. Protože perzistence způsobuje problémy především u imunokompromitovaných osob, jejichž počet každým rokem roste (Kim et al. 2018), je zavedení metod pro detekci a eradikaci perzisterů pro léčbu pacientů zcela zásadní.

Ve své práci se věnuji perzistenci u bakterie *Staphylococcus aureus*. Jednotlivé izoláty *Staphylococcus aureus*, se kterými jsem pracovala, pochází od pacientů s cystickou fibrózou (CF) z FN Motol. Celkem jsem získala 24 izolátů, kdy vždy dva jsou chronologické izoláty, které byly odebrány od pacienta ihned po léčbě antibiotiky a s přibližně dvouletým odstupem. Zároveň byly stejně genotypizačně zařazeny podle tzv. *spa* typu (jejich příbuznost byla zjištěna na základě sekvenční podobnosti v proteinu A, tzv. *spa* typizací a následně potvrzena i multilokusovou sekvenční typizací, tzv. MLST typizací). Na základě porovnání fenotypu i genotypu těchto dvojic chronologických izolátů a otestování jejich schopnosti perzistovat, posoudím, k jakým změnám u perzisterů dochází. Práce vznikla ve spolupráci s FN Motol, 2. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy a MBÚ AV ČR s.r.o.

Cíle mé diplomové práce byly následující:

1. Stanovit míru schopnosti perzistovat u klinických izolátů *S. aureus* od pacientů s CF po působení různých antibiotik a zjistit, zda dochází ke změně v míře perzistence v rámci dvou chronologických izolátů a dvojic izolátů navzájem
2. Porovnat změny fyziologických parametrů v rámci klonální dvojice a dvojic navzájem po působení různých antibiotik v průběhu křivek hynutí
 - A. Sledované parametry – membránový potenciál, integrita membrány
3. Vytvořit konstrukt, který by dovolil sledovat expresi *sigB*, případně *agr* operonu *in vivo* a stanovit expresi alternativního transkripčního faktoru obecné stresové odpovědi (*sigB*) po působení antibiotik

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Perzistence

Perzistence je definována jako schopnost bakterií přežít letální koncentrace antibiotik, přičemž tuto schopnost nemá celá populace a není geneticky kódovaná, jako je tomu u rezistence, nýbrž jde o fenotypovou změnu. O těchto fenotypových variantách se již od počátků výzkumů uvažuje jako o dormantní či metabolicky neaktivní subpopulaci bakterií (Bigger, 1944).

Aby mohla být buňka bakterie označena jako perzister musí vykazovat následující charakteristiky:

- 1) Musí zastavit svou buněčnou aktivitu a navodit stav dormance
- 2) Odolnost k antibiotiku se nedědí z buňky na buňku
- 3) V přítomnosti antibiotika se buňky nedělí a přeživší subpopulace bakterií neroste
- 4) V případě eliminace antibiotika a dodání živin se rychle obnoví růst přeživší subpopulace

(shrnutí v review Trastoy et al. 2018)

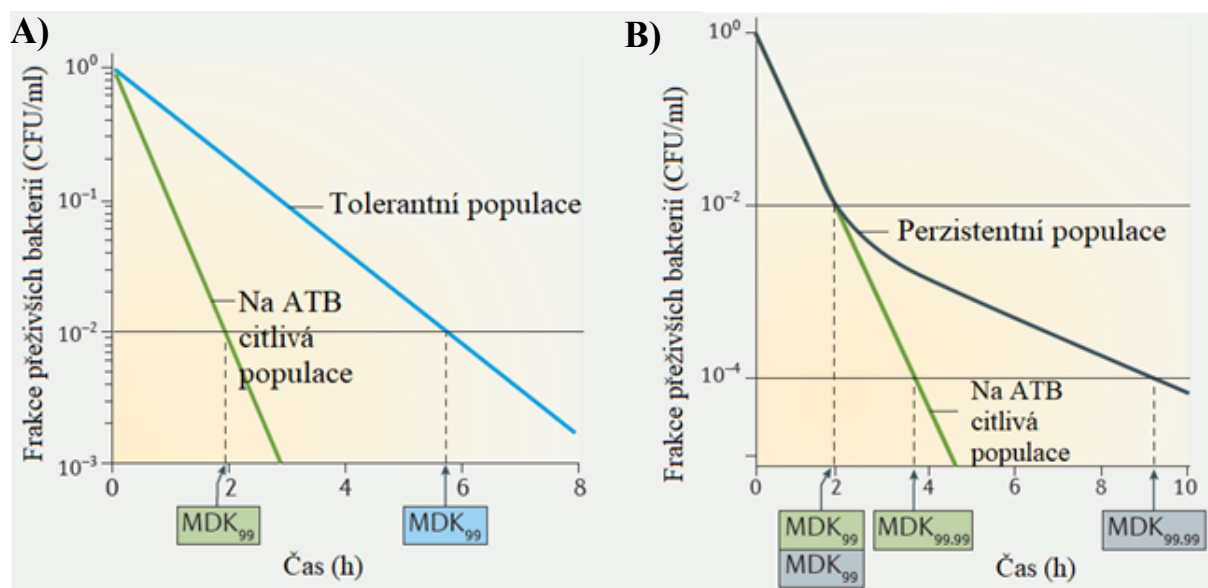
Nutno však na úvod poznamenat, že pohled vědecké komunity na perzistenci není úplně jednoznačný a definice perzisterů jsou formulovány různými způsoby. Také není vždy v literatuře odlišena perzistence vnitrobuněčná v hostitelských buňkách od bakteriální perzistence na antibiotika (shrnutí v review Fisher et al. 2017). Z důvodu, že se termíny v naprosté většině případů nerozlišují, není vyjasněno, zda spolu tyto dva jevy souvisí. V některých pramenech literatury může být perzistence zaměňována s tolerancí (Kint et al. 2012; Michiels et al. 2016), i když v současnosti se vědci snaží tyto termíny odlišit (Brauner et al. 2016). Stejně tak vědecká komunita není jednotná v hypotézách o vzniku a významu perzisterů. V následujícím přehledu uvedu životní cyklus perzistera, to, jakým způsobem podle známých hypotéz pravděpodobně vzniká a jaké poznatky jsou známy o výstupu z perzistentního stavu (resuscitaci). V další části uvedu souvislost obecné stresové odpovědi a Agr systému se vznikem perzistence u *Staphylococcus aureus*. Nakonec se budu věnovat významu tohoto fenoménu v klinické praxi. V této poslední kapitole uvedu jednu z metod, která bude využita v experimentální části práce.

2.2 Životní cyklus perzistera – jeho vznik, fyziologický stav a resuscitace

2.2.1 Navození perzistence

Již podle první studie je za standardních podmínek frekvence vzniku perzisterů velmi nízká – obvykle se udává vznik 1 perzistera na 10^6 buněk (Bigger, 1944). Tato frekvence však může být o dva či více řády zvýšena v přítomnosti stresu nebo hladovění nebo přechodem do stacionární fáze (Balaban et al. 2004; Keren et al. 2004; Conlon et al. 2016). Velikost frakce perzisterů může záviset také na použitém antibiotiku a jeho koncentraci (Lechner et al. 2012; Kubistova et al. 2017). Perzisteri mohou být odolní k více antibiotikům zároveň, nebo se liší svou citlivostí k různým antibiotikům (shrnutí v review Fisher et al. 2017).

Po vystavení kultury bakterií antibiotiku dochází v populaci k rychlému úbytku, po kterém následuje mírně se snižující ubývání malé frakce subpopulace – perzisterů. Tento průběh chování vystihuje tzv. bifázická křivka hynutí, která charakterizuje perzistenci (Balaban et al. 2004) (viz obrázek č. 1). Tolerance je oproti perzistenci vlastnost celé populace, kdy minimální doba zabití (MDK_{99}) je delší než u perzistence (shrnutí v Brauner et al. 2016), jak je ukázáno na obrázku číslo 1.



Obrázek č. 1: Křivka hynutí u perzistence má nelineární bifázický průběh (B), u tolerance je úbytek bakterií krátce po přidání antibiotika mírnější než u perzistence (A), proto je minimální doba zabití (MDK_{99} , doba, za kterou je zabita 99 % populace bakterií) u tolerantních bakterií výrazně delší než u perzisterů. MDK_{99} je u perzistentních a citlivých bakterií podobná, ale liší se $MDK_{99,99}$ (minimální dobou, za kterou je zabita 99,99 % populace), u perzistentních buněk je $MDK_{99,99}$ větší než u bakterií citlivých na antibiotikum (převzato a upraveno z Brauner et al. 2016).

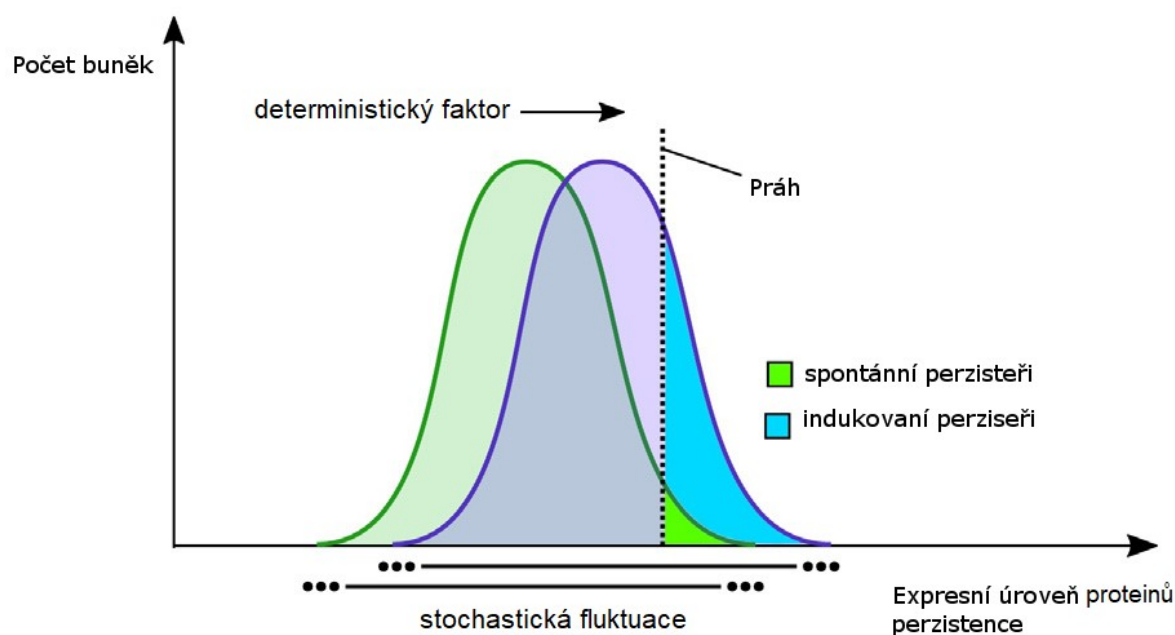
Perzistence může být pravděpodobně navozena různými způsoby a je zřejmé, že neexistuje pouze jeden mechanismus vzniku, ale jde o kombinaci různých mechanismů

(shrnuto v review Harms et al. 2016). Současně je tedy nahlíženo na perzistery jako na heterogenní subpopulaci, která může vznikat různým způsobem a vykazovat různé fenotypy. Podle výzkumů laboratoře vedené Nathalií Balaban bývají perzisteri rozdělováni na dvě skupiny, perzistery typu I, kteří se generují po přechodu do stacionární fáze limitací živin, a perzistery typu II, kteří vznikají zcela náhodně a proporcčně k vzrůstajícímu počtu buněk v průběhu růstu populace (Balaban et al. 2004; Gefen & Balaban 2009).

Otázka vzniku perzistence zaměstnává vědce už po dvě desetiletí a není dosud zcela objasněná (Balaban, 2011). První hypotéza formulovala perzistenci jako děj stochastický, kdy kvůli variabilitě v genové expresi některé buňky náhodně navodí stav perzistence bez ohledu na přítomnost antibiotika. Během exponenciální fáze se tak zcela náhodně tvoří určitá frakce perzisterů (Balaban et al. 2004). Podle studie Maisonneuve a jeho kolegů (2013) může být stochasticita vzniku perzisterů u *Escherichia coli* navozena fluktuací alarmonu (p)ppGpp (Maisonneuve et al. 2013), jehož vliv na perzistenci bude popsán v kapitole 2.2.2. Tato stochasticita je spojována s bet-hedging strategií kdy heterogenita fenotypů zahrnující perzistenci vzniká před stresem (environmentálním nebo antibiotickým). (De Jong et al. 2011). Podle modelu bet-hedging strategie perzistence poskytuje ochranu určité subpopulace před událostmi, které mohou v budoucnu nastat a mohou být pro populaci letální. Její význam z evolučního hlediska je však širší – snížená růstová rychlost může vést ke snížení kompetice o zdroje živin a k ovlivnění druhové selekce (Gardner et al. 2007).

Stochastický vznik perzistence však nevysvětluje zvýšený výskyt perzisterů po působení některých stresů. Například změny ve využití zdroje uhlíku (při tzv. diauxiálním růstu) vedly ke zvýšení perzistence k ofloxacinu a k ampicilinu (Amato et al. 2013). Pokud bakterie byly vystaveny tepelnému, oxidativnímu nebo osmotickému stresu vedlo to po vystavení antibiotik ke zvýšení schopnosti perzistovat (Murakami et al. 2005; Wu et al. 2012; Kubistova et al. 2017). Také vystavení bakterií jiným antibiotikům před určitou antibiotickou léčbou podle literatury zvyšuje perzistenci. Pokud totiž byly buňky *E. coli* vystaveny rifampicinu (inhibující transkripci), tetracyklinu (inhibující translaci) významně (asi 10 000x) to po následné léčbě baktericidními antibiotiky (ciprofloxacin, ampicilin) zvýšilo perzistenci (Kwan et al. 2013).

Tyto poznatky mohou vést k druhé hypotéze, která říká, že perzistence není děj stochastický, ale navozený stresovou odpovědí, tedy deterministický (Michiels et al. 2016). Stresy, které mohou vést ke vzniku perzisterů, mohou být rozděleny do dvou skupin – stres vyvolaný vnějším prostředím (např. antibiotickou léčbou) nebo bez vnějšího stresoru vycházející z vnitřního prostředí buňky (např. hladověním během stacionární fáze) (Amato et al. 2013). Je tedy možné, že jakékoliv působení stresu vede k formaci perzisterů (Lewis, 2010). Vzhledem k již zmíněné heterogenitě perzisterů je však pravděpodobné, že platí obě výše zmíněné hypotézy. Jak je ukázáno na obrázku 2, perzistence může být souhrou jak stochastických, tak environmentálních (deterministických) faktorů. Expresí jistých předpokládaných proteinů indukujících perzistenci v populaci buněk fluktuuje a pokud náhodně v jisté buňce tento protein převládne, je navozen stav perzistence. Faktory prostředí mohou expresi těchto proteinů zvyšovat, a tím se zvýší počet buněk, které překročí práh pro vstup do perzistentního stavu (Michiels et al. 2016, obrázek č. 2).



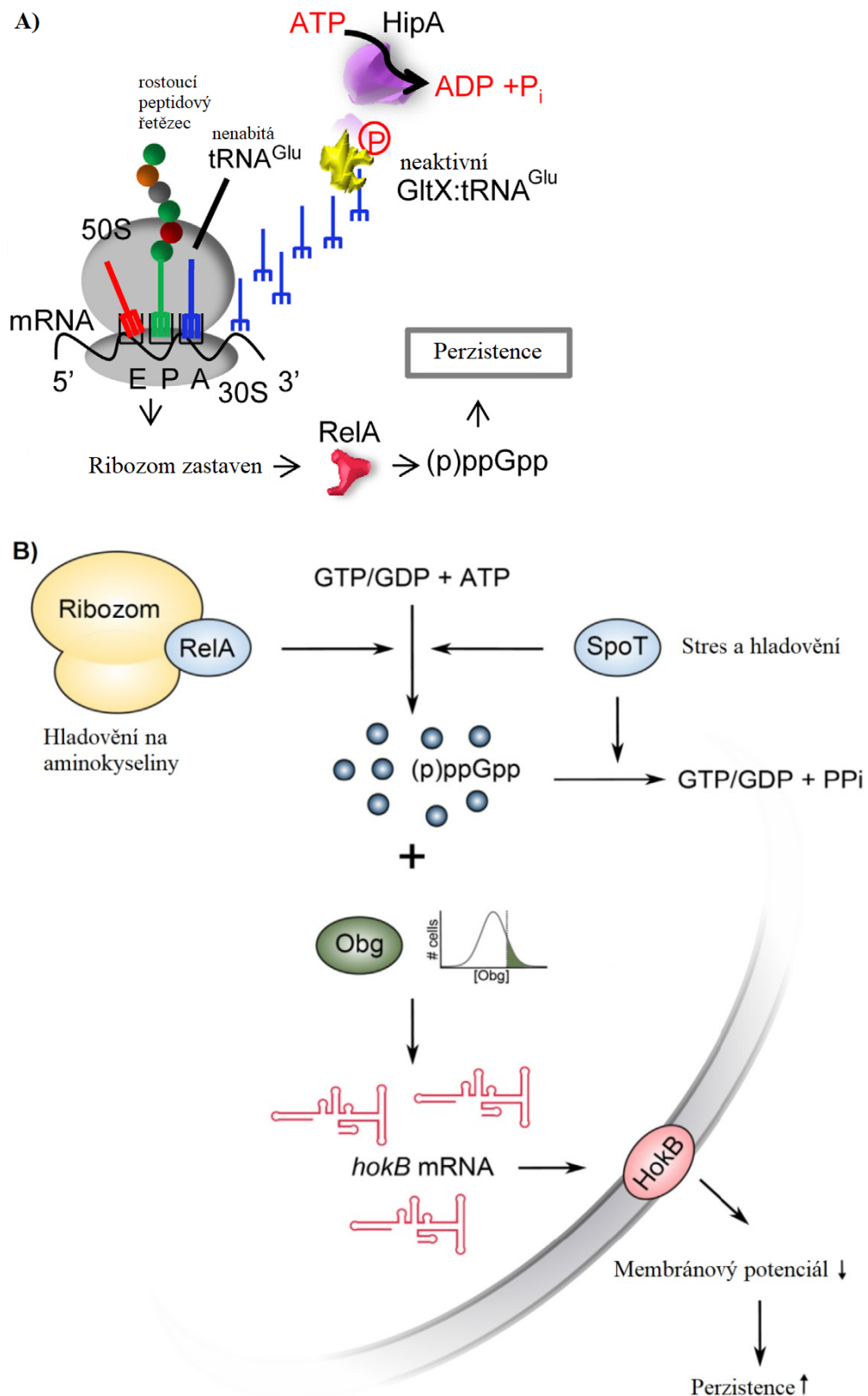
Obrázek č. 2: Grafické znázornění vzniku perzisterů souhrou stochastických a deterministických faktorů. Osa x znázorňuje expresní úroveň proteinů, které indukují perzistenci, na ose y je vynesena počet buněk (převzato a upraveno z Michiels et al. 2016).

2.2.2 Fyziologický stav perzisterů

Počátky výzkumů formulovaly perzistenci jako děj pasivní, dormantní, kdy buňky jsou v přítomnosti antibiotika metabolicky neaktivní a nerostou, což jim umožňuje léčbu přežít (Bigger 1944). Pro ověření této teorie skupina vedená Shah fúzovala promotor pro ribozomální geny, které se exprimují jen za podmínek rychlého růstu, s GFP, a to jim

umožnilo oddělit perzistery od zbytku populace (Shah et al. 2006). Výzkumníci usoudili, že perzisteri mají redukovanou proteosyntézu a pravděpodobně také transkripci a dále u nich pozorovali sníženou proton-motivní sílu (Keren et al. 2004; Kwan et al. 2013), což potvrzuje domněnku o dormantním stavu perzisterů.

Zastavení proteosyntézy je jedním z dobře prozkoumaných mechanismů účinku toxin-antitoxin systémů (TA), které ve spojitosti s perzistencí byly dlouho zkoumány u bakterie *E. coli*. Moyed a Bertrand již v roce 1983 izolovali tzv. vysoce perzistentní mutanty *E. coli* K12 (Hip) a později bylo potvrzeno, že geny *hipA* a *hipB* kódují TA systém (Moyed & Bertrand 1983; Falla & Chopra, 1998) HipA je kináza fosforylující glutamyl-tRNA synthetázu, čímž dojde k deaktivaci této tRNA (viz obrázek č. 3A). To spouští stringentní odpověď, produkuje se (p)ppGpp, který má vliv na inhibici translace a dalších buněčných procesů a je navozen dormantní stav charakteristický pro perzistenci (Germain et al. 2013; Maisonneuve et al. 2013). Zvýšení hladiny alarmonu (p)ppGpp může například vést k inhibici biosyntézy buněčné stěny (BS), čímž se zabrání účinku β -laktamových antibiotik (Amato & Brynildsen 2015). Kromě toho může zvýšená hladina (p)ppGpp inhibovat DNA-vazebné proteiny spolupracující s DNA gyrázou účastníci se negativní spiralice DNA. Tímto způsobem mohou buňky přežít vystavení fluorochinolonům, které na DNA gyrázu cílí (Amato et al. 2013). Alarmon (p)ppGpp se také váže do konzervované GTPázy Opg, která následně pozitivně ovlivňuje transkripci toxinu TA systému HokB stabilizací jeho transkriptu. Předpokládá se, že toxin HokB, podobně jako toxin TisB indukovaný SOS odpovědí a GhoT (u něhož je indukce zatím neznámá) navozuje porušení struktury buněčné membrány, což vede u perzisterů *E. coli* ke snížení membránového potenciálu (viz obrázek č. 3B) (Gurnev et al. 2012; Cheng et al. 2014; Verstraeten et al. 2015). Nedávno bylo zjištěno, že HokB indukuje perzistenci u buněk s vysokým membránovým potenciálem, protože jen u nich dochází ke kompletní maturaci pórů HokB toxinu (Wilmaerts et al. 2018). To opět potvrzuje, že mechanismy vzniku perzistence jsou heterogenní a závislé na fyziologickém stavu buněk.



Obrázek č. 3:

A) Vliv HipA na snížení translace. HipA fosforyluje GltX:tRNA^{Glu} (glutamyl tRNA syntetázu), čímž se hromadí nenabitá tRNA^{Glu} (není schopna vázat AMK), ribozom je zastaven a indukuje se stringentní odpověď (převzato a upraveno podle Germain et al. 2013).

B) Vliv HokB na snížení membránového potenciálu vedoucí k perzistenci (převzato a upraveno podle Verstraeten et al. 2015).

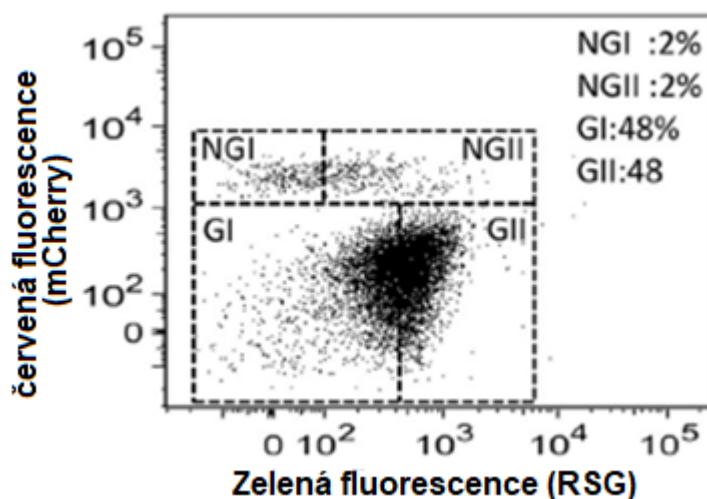
Je ovšem nutné zmínit, že pro grampozitivní bakterie mechanismus dormantního stavu navozený TA systémem nebyl potvrzen. Dřívější práce spojovaly TA systém MazEF *S. aureus* s perzistencí, neboť se pomocí qPCR ukázalo, že působení antibiotik stimuluje transkripci *mazEF* genů (Donegan & Cheung, 2009; Proctor et al. 2014). Naproti tomu Conlon a jeho kolegové (2016) zjistili, že delece dosud známých TA systémů u *S. aureus* (*mazEF*, *axe1/txe1*, *axe2/txe2*) neovlivnila vznik perzisterů ani v exponenciální ani ve stacionární fázi (Conlon et al. 2016). Avšak bylo již dokázáno, že (p)ppGpp se může podílet na navození dormantního stavu i u *S. aureus*, protože se podobně jako u gramnegativních bakterií váže do GTPáz RsgA, RbgA, Era a HlfX, čímž se jejich GTPázová aktivita inhibuje, dochází k narušení procesu tvorby ribozomu a výsledkem je výrazné zpomalení buněčného růstu a zvýšení odolnosti k antibiotikům (Corrigan et al. 2016). Také u perzisterů *S. aureus* dochází ke snížení membránového potenciálu, avšak mechanismus snížení není pravděpodobně prostřednictvím pórotvorných toxinů TA systémů (jak bylo popsáno pro HokB *E. coli* výše), ale podle experimentů Wang a jeho kolegů (2018) ke snížení membránového potenciálu dochází inhibicí enzymů Krebsova cyklu (TCA) (Wang et al. 2018), jak bude popsáno dále. Tvorba perzisterů v exponenciální fázi u *S. aureus* je spojena se snížením množství ATP v buňce. To může vysvětlovat, že ATP-závislé cíle antibiotik (DNA-gyráza, topoizomeráza či RNA polymeráza) jsou částečně nefunkční, což vede k perzistenci (Conlon et al. 2016).

Na dormanci se kromě TA systémů mohou podílet rovněž globální regulátory. U *E. coli* v práci Hansen a jeho spolupracovníků (2008), ve které se v rozsáhlé knihovně inaktivovaných genů identifikovaly mutanty se zvýšenou perzistencí, bylo objeveno mnoho globálních regulátorů různých buněčných procesů i dráhy biosyntézy nukleových kyselin. Zmínila bych například regulátor DksA, o kterém je známo, že za podmínek hladovění na uhlík a aminokyseliny (a po vazbě (p)ppGpp) inhibuje transkripci z rRNA a tRNA promotorů (Paul et al. 2004). Po deleci *dksA* u *E. coli* došlo k významnému snížení schopnosti perzistence (Hansen et al. 2008; Amato et al. 2013). Také delece genů pro stringentní odpověď, které syntetizují (p)ppGpp (*relA* a *spoT*) vedla u *E. coli* ke snížení perzistence (Amato et al. 2013), což je v souladu s významem (p)ppGpp popsáným výše.

Dalším znakem perzisterů spojeným s dormantním stavem je snížená metabolická aktivita. Při analýze transkriptomu byla exprese genů pro energetické procesy u perzisterů (např. *glpD*, *glpC* pro metabolismus glycerolu) významně redukována (Shah et al. 2006). Také mutace v *nanK*, který kóduje N-acetyl-manosamin kinázu, která se účastní centrálního

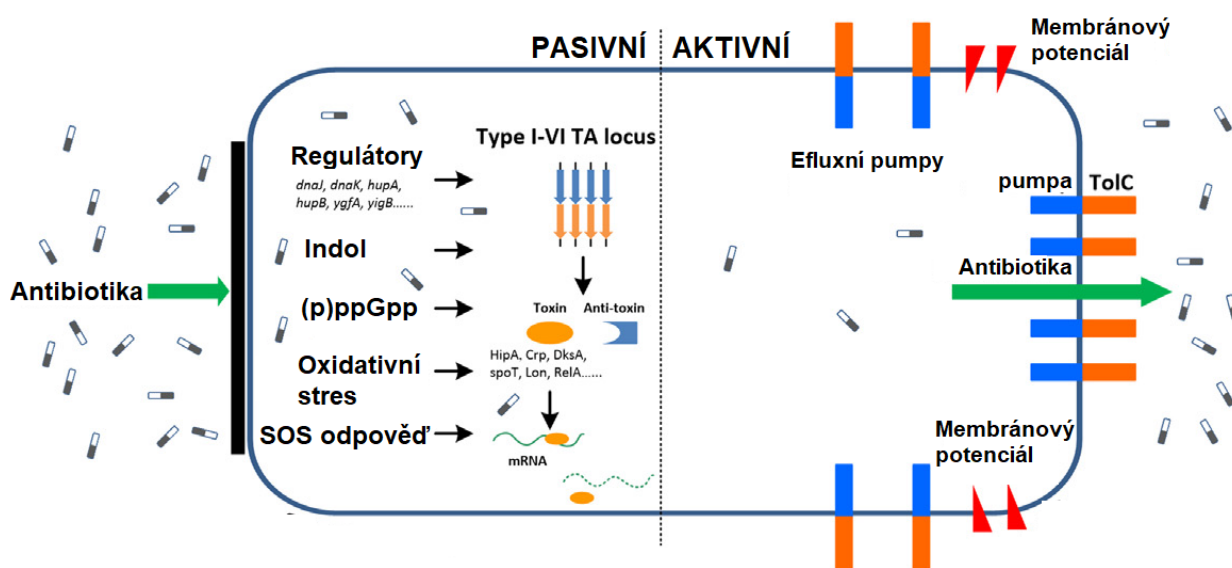
metabolismu a metabolismu buněčné stěny, snížila perzistenci k levofloxacinu (Xu et al. 2017). U *S. aureus* mutantů v genech pro alfa-ketoglutarát dehydrogenázu (*sucA* a *sucB*), enzymu TCA, došlo během stacionární fáze k 10-100 násobnému zvýšení přežívání po působení ciprofloxacinu. Delece genů *sucA* a *sucB* v exponenciální fázi neměla na vznik perzistence žádný vliv, což skupina vedená Wang vysvětluje tím, že během exponenciální fáze u *S. aureus* vzhledem k dostupnosti živin TCA není aktivní a ATP vzniká na substrátové úrovni acetogenezí (Somerville & Proctor 2009; Wang et al. 2018). Delece genů pro podjednotky sukcinát dehydrogenázy (*sdhA*, *sdhB*) v jiné práci naopak vedla u *S. aureus* ke snížení míry perzistence (Wang et al. 2015), což mohlo být způsobeno rozdílným způsobem testování či různými použitými kmeny bakterií (Wang et al. 2018).

Orman a jeho spolupracovníci (2013) pro studium metabolismu metodou 2D FACS použili fluorogenní redoxní indikátor (RSG), který vykazuje zelenou fluorescenci pokud je redukován bakteriálními reduktázami. U nerostoucí subpopulace představující perzistery byla změřena nižší míra zelené fluorescence než u rostoucí, jak je ukázáno na obrázku z průtokového cytometru (viz obrázek č. 4). Závěrem této práce bylo, že, buňky perzisterů jsou metabolicky aktivní, i když je jejich metabolická aktivita nižší (Orman et al. 2013). K podobnému výsledku dospěla i skupina Radzikowského a dalších vědců (2016), kteří zjistili, že perzisteri jsou metabolicky aktivní a vyžadují dokonce i jistou míru exprese proteinů, aby mohli zůstat ve stavu perzistence (Radzikowski et al. 2016).



Obrázek č. 4: Výsledek 2D FACS experimentu. Červená fluorescence představuje fluorescenci reportéru buněčného dělení (mCherry proteinu), zelená fluorescenci senzoru redoxního potenciálu (RSG) po jeho redukcii bakteriálními reduktázami. Při dělení buněk se koncentrace mCherry proteinu ředí, čím je fluorescence mCherry menší, tím buňka rychleji roste. Nerostoucí subpopulace (NGI a NGII) mají nižší metabolickou aktivitu než rostoucí subpopulace (GI a GII), protože vykazují menší zelenou fluorescenci (převzato a upraveno podle Orman et al. 2013).

I když perzistence je spojena s pasivními mechanismy, které pomáhají buňce odolávat antibiotikům, jak bylo referováno výše, uvažuje se také o tom, že jde o soubor pasivních a aktivních mechanismů (viz obrázek č. 5). Přesvědčivý důkaz aktivního mechanismu byl objeven u *E. coli* roku 2016. Bylo zjištěno, že fluorescenčně značené β -laktamové antibiotikum se u perzisterů akumuluje mnohem méně než uvnitř citlivých buněk. Po sekvenaci RNA se navíc zjistilo, že u perzisterů je více než trojnásobně zvýšená exprese genů spojených s efluxními pumpami. Tyto pumpy, jako např. TolC, aktivně odstraňují antibiotikum z vnitrobuněčného prostředí, čímž přispívají k přežití buněk (Pu et al. 2016).



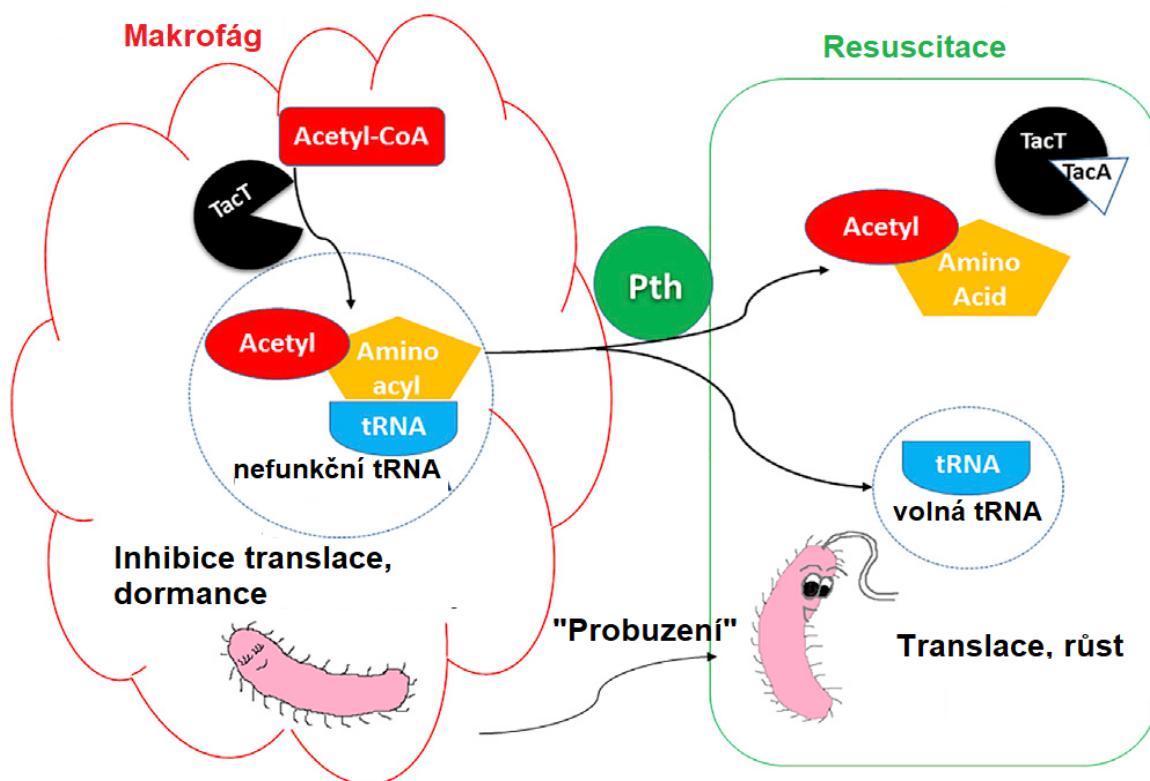
Obrázek č. 5: Rozdělení pasivních a aktivních aspektů perzisterů podle Pu et al. 2017. Perzisteři např. na základě indukce TA systémů nebo různých regulátorů se stávají metabolicky dormantní, avšak metabolicky aktivní, co se týká zvýšené efluxní aktivity (převzato a upraveno podle Pu et al. 2017).

Avšak podle dizkuze Kim a Wood (2016) předchozí dvě práce Ormana z roku 2013 a Pu z roku 2016 nejsou relevantní, protože obě obsahují chybu v metodice, která je častou chybou při výzkumech perzisterů – někteří perzisteři byly při přípravě vzorků revertovány na buňky neperzistující a tudíž vykazující metabolickou aktivitu. V obou případech bylo chybou poskytnutí zdroje uhlíku v minimálním médiu, ve kterém byli perzisteři promýváni pro odstranění antibiotika. Perzisteři ve své definici jsou tedy podle Kim a Wood (2017) buňky metabolicky dormantní, což je odlišuje od tolerantních, které jisté aspekty metabolismu mohou vykazovat (Kim & Wood 2016; Kim & Wood 2017). Různé vědecké skupiny na dormantní stav perzisterů pohlíží s větší či menší důvěrou, ale shodují se, že metabolismus, membránový potenciál a procesy replikace, transkripce a translace jsou u perzisterů více či méně redukovány.

2.2.3 Resuscitace perzisterů

Existuje poměrně málo studií, které se zabývají resuscitací perzisterů, ačkoliv je tento děj pro klinickou praxi neméně důležitý jako její vznik. Podobně jako v otázce indukce perzistentního stavu, ani v otázce resuscitace není jasné, zda se jedná o stochastický nebo deterministický jev (Michiels et al. 2016). Kinetika obnovení růstu perzisterů je ovlivněna změnou prostředí, například změnou kultivačního média (Jöers et al. 2010). Pokud dormantní buňky *S. aureus* byly přeneseny do přefiltrovaného vyčerpaného média (pocházející ze stacionární fáze kultury), vedlo to k resuscitaci těchto dormantních buněk, což se projevilo nárůstem bakteriální kultury více než 600x (Pascoe et al. 2014). Nejvíce je resuscitace perzisterů studována u perzistence vnitrobuněčné, kdy bakterie po resuscitaci opouští bezpečné prostředí uvnitř hostitelské buňky. U *Listeria monocytogenes*, patřící do stejné skupiny Firmicutes jako *S. aureus*, byly nalezeny tzv. faktory podporující resuscitaci (resuscitation promoting factors, RPF) (Pinto et al. 2013). Tyto malé proteiny jsou sekretovány do supernatantu a pomáhají různými enzymatickými aktivitami obnovit růst u dormantní populace buněk (shrnuto v review Rosser et al. 2017). Přepokládá se, že i u *S. aureus* se mohou RPF nacházet (Pascoe et al. 2014), i když u genů, u kterých se předpokládalo, že kódují RPF, nebyla účast na resuscitaci prokázána (Bojer et al. 2018).

Na molekulární úrovni pravděpodobně resuscitace nastává represí TA systémů, která může být způsobena zastavením degradace antitoxinu a snížením koncentrace volného toxinu. Většina TA systémů, (až na některé výjimky jako je např. MazEF *S. aureus* (Donegan & Cheung, 2009)), je schopna transkripční autoregulace. Vazba antitoxinu a toxinu do oblasti promotorů genů pro TA způsobí represi tohoto operonu (Overgaard et al. 2008). Způsoby, jakými může být zastavena degradace antitoxinů, nejsou dosud známy. Na úrovni translace může resuscitace nastat odstraněním nežádoucích funkčních skupin na „poškozených“ tRNA. U bakterie *Salmonella enterica* serovar Typhimurium je navozena dormance prostřednictvím toxinu TacT, který acetyluje aminoacyl-tRNA a tím inhibuje translaci (viz obrázek č. 6). Resuscitace je poté navozena aktivací hydrolázy Pth, která odštěpí acetylovanou aminokyselinu a uvolní nenabitou tRNA, čímž se obnoví translace (Cheverton et al. 2016).



Obrázek č. 6: Resuscitace vnitrobuněčného perzistera u *S. enterica* serovar Typhimurium. Když je hydroláza Pth aktivní, odštěpuje acetylovou skupinu z amino-acyl-tRNA a tato volná tRNA poté může vázat AMK a dochází k obnově translace. TacT/TacA představuje TA systém, který u této bakterie může navodit stav dormance (převzato a upraveno podle Lewis & Shan, 2016).

2.3 Geny související s navozením stavu perzistence

Ačkoliv perzistence je fenotypová změna určité subpopulace bakterií, která se nedědí z buňky na buňku, jak bylo popsáno v úvodu práce, předpokládá se, že signalizace vedoucí k perzistenci a mechanismy vzniku perzisterů jsou geneticky kódovány (Lewis, 2007). Toto poznání souvisí s tím, že některé mutace v genech mohou zvýšit nebo snížit schopnost navození stavu perzistence. Mezi geny, které tuto schopnost ovlivňují, mohou být geny pro TA systémy, nejvíce prozkoumané u mutantů v genech *hipA*, *hipB* (Moyed & Bertrand, 1983), jak bylo již popsáno výše. V následujícím textu uvedu možný vliv obecné stresové odpovědi na vznik perzistence u *E. coli* a *S. aureus*.

2.3.1 Souvislost perzistence a obecné stresové odpovědi

Obecná stresová odpověď představuje komplexní ochranu proti různým typům stresu. Zahrnuje nespécifické globální změny na úrovni metabolismu a genové exprese s cílem přežít příchozí stres. Na úrovni genové exprese je obecná stresová odpověď indukována expresí alternativního sigma faktoru – u *E. coli* se jedná o RpoS, někdy označovaný SigmaS (SigS; σ^S), u grampozitivních bakterií například *Bacillus subtilis* a *S. aureus* jde o SigmaB faktor

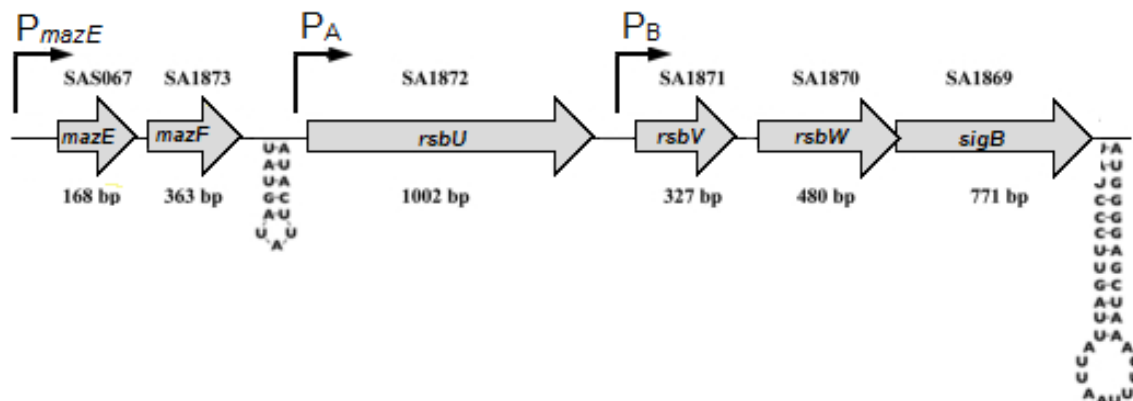
(SigB; σ^B). Převládnutí exprese této sigma podjednotky vede k indukci transkripce odlišného regulonu genů, a tedy k navození obecné stresové odpovědi (shrnuto v review Battesti et al. 2011).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.2 alarmon (p)ppGpp u *E. coli* ovlivňuje perzistenci na úrovni navození dormance. Molekula (p)ppGpp však také reguluje expresi RpoS na několika úrovních. Na transkripční úrovni (p)ppGpp pozitivně reguluje transkripci genu *rpoS*. Na úrovni aktivity RpoS, (p)ppGpp vazbou na RpoS preferuje jeho schopnost vázat se do promotorových sekvencí DNA oproti faktoru RpoD. Dále se alarmon (p)ppGpp účastní i proteolytické regulace aktivity RpoS (shrnuto v review Battesti et al. 2011). Kromě toho je transkripce genu *rpoS* reprimována přímou vazbou antitoxinu MqsA TA systému MqsR-MqsA. Během stresu je MqsA degradován proteázou Lon, což vede k převládnutí RNázy MqsR a k derepresi transkripce a tím k akumulaci RpoS. Zároveň MqsR degraduje většinu transkriptů a zcela zastavuje translaci, čímž může být navozena perzistence (Wang et al. 2011).

Dalším důkazem propojení obecné stresové odpovědi s perzistencí může být nedávná práce skupiny vědců Radzikowski a jeho spolupracovníků (2016). Při charakterizaci proteomu perzisterů bylo zjištěno, že RpoS je zodpovědný za změnu v expresi proteinů u *E. coli* při navození perzistence, i když jeho význam není pro navození perzistence esenciální (Radzikowski et al. 2016). U příbuzných bakterií, např. u *Pseudomonas aeruginosa* bylo u mutantu *rpoS* zjištěno čtyřiceti až sedmdesátinásobné snížení přežívání po aplikaci antibiotik biapenem a imipenem. (Murakami et al. 2005) Též bylo popsáno, že aktivace obecné stresové odpovědi u *P. aeruginosa* uvnitř biofilmu přispívá k ochraně před ciprofloxacinem (Stewart et al. 2015).

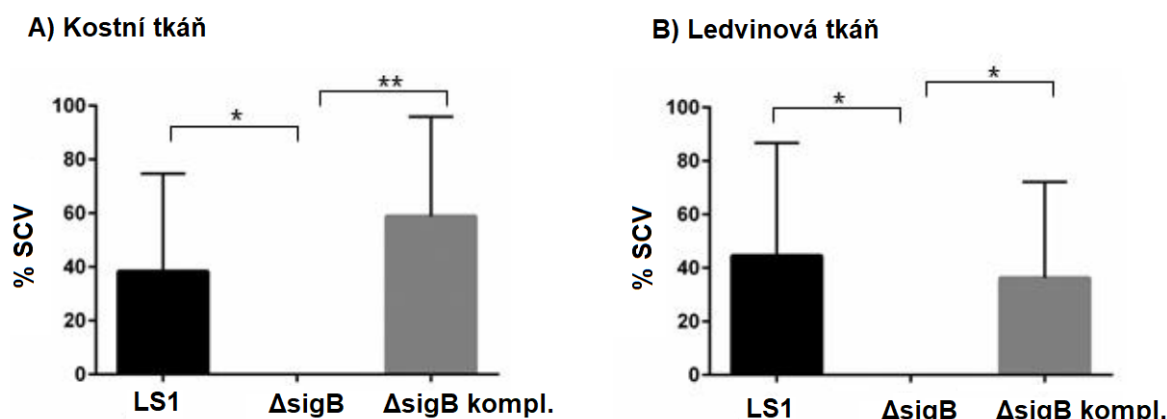
Obecná stresová odpověď u *S. aureus* je zajištěna alternativním faktorem SigB (Kullik et al. 1998), ale je indukována jinými mechanismy než u *E. coli*, ačkoliv význam této odpovědi se zdá podobný. SigB je indukován za podmínek vnějšího stresu vyvázáním z vazby na anti-sigma faktor RsbW, který se následně váže na anti-anti-sigma faktor RsbV fosforylovaný kinázou RsbU (shrnuto v review Hecker et al. 2007). Geny *rsb* (regulation of SigmaB) ukázány na obrázku č. 7 jsou geny kódující regulátory podjednotky RNA polymerázy SigB. Operon *rsbUVW-sigB* je z promotoru P_{mazE} kontranskribován společně s geny pro MazEF TA systém, který byl v dřívějších pracích spojován s perzistencí (Proctor et

al. 2014). V současnosti se však účast MazEF na navození perzistence nepředpokládá (Conlon et al. 2016).



Obrázek č. 7: Operon *sigB* *S. aureus* zahrnuje geny pro regulátory SigB *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* a 3 promotory, z toho jeden SigB-závislý (P_B). Součástí operonu jsou geny pro TA systém MazEF (převzato a upraveno podle Donegan & Cheung, 2009).

S perzistencí *S. aureus* je spojován tzv. fenotyp SCV (small colony variants) (Proctor et al. 1995) – fenotyp drobných, nepigmentovaných kolonií schopných revertovat se zpět do původního fenotypu mateřského kmene. Tyto kolonie rostou mnohem pomaleji a produkce virulenčních faktorů je u nich nižší. Mohou perzistovat také uvnitř hostitelských buněk bez vyvolání imunitní odpovědi (Tuchscher et al. 2010; Kahl et al. 2016). Po infekci savčích (hovězí) buněk mutanty s delecí v *sigB* ($\Delta sigB$) se prokázala menší míra vnitrobuněčné perzistence než po infekci divokým kmenem *S. aureus*. (Moisan et al. 2006). Podobného výsledku dosáhla i skupina pod vedením Tuchscher (2017), kdy po infekci kostní a ledvinové tkáně myšího modelu mutantem *S. aureus* $\Delta sigB$ nedošlo k tvorbě SCV (Tuchscher et al. 2017), jak je ukázáno na obrázku č. 8.



Obrázek č. 8: Výsledek experimentu, který ukazuje, že mutant $\Delta sigB$ oproti divokému kmeni *S. aureus* (LS1) netvoří SCV ani v ledvinové ani v kostní tkáni. Po komplementaci ($\Delta sigB$ kompl.) se tvorba SCV obnovila. Na ose y jsou vyneseny hodnoty % SCV z celkové populace se směrodatnými odchylkami. Hvězdičkami jsou značeny p-hodnoty, * $p > 0.05$, ** $p > 0.01$ (převzato a upraveno podle Tuchscher et al. 2017).

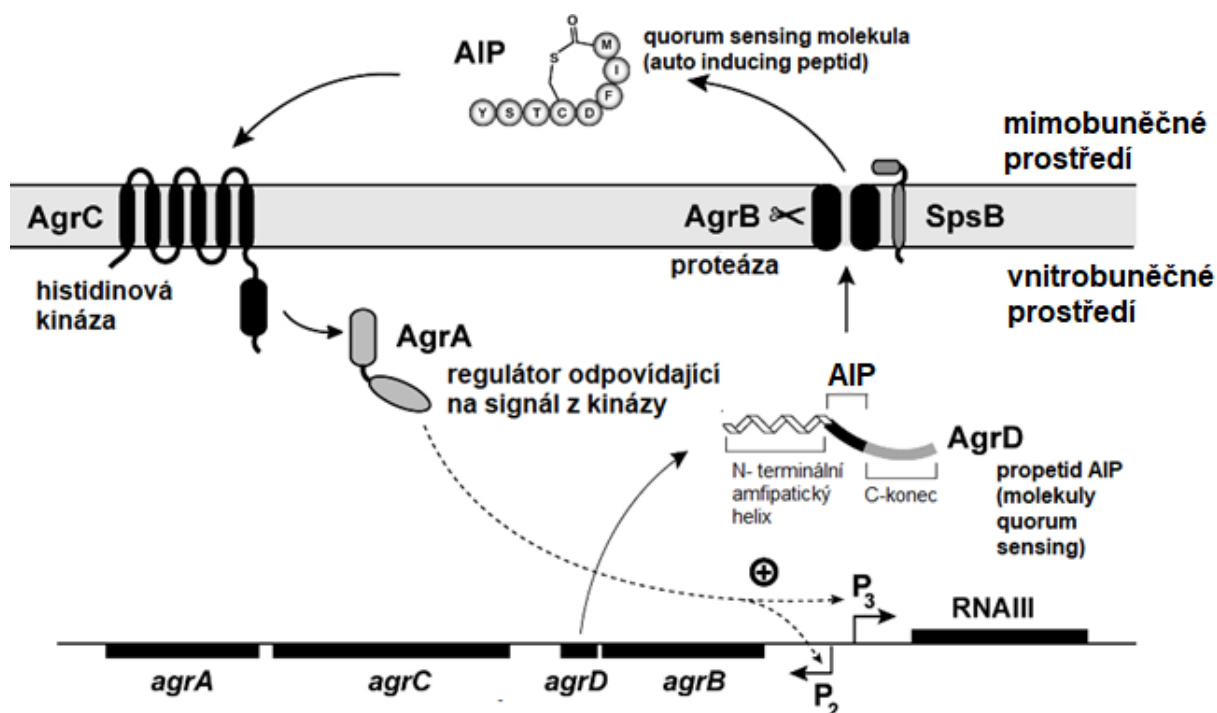
Naše laboratoř provedla metodou qPCR stanovení hladiny transkriptu *sigB*. Tento experiment dokázal, že množství transkriptu *sigB* vzrostlo po 10 min působení ciprofloxacinu v koncentraci 100x MIC. Nárůst hladiny *sigB* mRNA byl pozorován i po osmotickém stresu. Zároveň bylo dokázáno, že pokud buňky byly vystaveny osmotickému stresu před aplikací ciprofloxacinu, zvýšilo se množství přeživších perzisterů (Kubistova et al. 2017).

I když vliv SigB na tvorbu perzisterů zatím nebyl přímo potvrzen, některé literární prameny tuto souvislost poměrně přesvědčivě naznačují. Vliv SigB na perzistenci je pravděpodobně nepřímý. Jednou z uvažovaných propojení obecné stresové odpovědi a perzistence je propojení přes Agr systém, který je součástí SigB regulonu a má negativní vliv na navození perzistentního stavu (Xu et al. 2017).

2.3.2 Souvislost perzistence s Agr systémem *S. aureus*

Poprvé byl Agr systém pojmenován a popsán v souvislosti se sekrecí exoproteinů v roce 1988 (Peng et al. 1988). Jeho hlavní význam byl však objeven až o pár let déle – u myši nakažených *S. aureus* indukující u těchto myši arthritidu, došlo mnohem méně ke vzniku destruktivních lézí, pokud šlo o *S. aureus* mutanty v *agr* operonu (Abdelnour et al. 1993). To vedlo poprvé k úvahám o významu Agr systému v regulaci virulence u *S. aureus*.

Agr systém je soubor genů, jehož produkty zajišťují regulaci virulence v souvislosti s quorum sensing (QS), vyskytující se u některých grampozitivních patogenů. Operon *agr* genů obsahuje dva divergentní promotory P2 a P3. Z promotoru P2 se transkribuje RNAII (kódující geny *agrA*, *agrB*, *agrC* a *agrD*), z promotoru P3 transkript RNAIII, který kóduje gen pro delta toxin. AgrB, produkt genu *agrB*, je integrální membránová endopeptidáza, která proteolyticky štěpí AgrD. AgrB rozpoznává C-terminální sekvenci v AgrD, kterou odštěpuje současně za tvorby thiolaktonu AIP. AgrD je propeptid pro AIP (auto-inducing peptid). Swartz a jeho kolegové (2014) objevili, že AgrD je funkčně podobný PSM rodině toxinů (moduliny rozpustné ve fenolu, phenol soluble modulins, viz dále), protože má rovněž cytotoxické vlastnosti proti eukaryotickým buňkám. AgrC je receptorový membránový protein, histidinová kináza. AIP se váže na N-konec AgrC a konformační změna způsobí spojení senzoru a kinázy, což vede k autofosforylaci a aktivaci AgrC kinázy. AgrC potom fosforyluje regulátor dvoukomponentového systému AgrA. Fosforylovaný AgrA se váže s vysokou afinitou do místa v oblasti P2-P3 *agr* lokusu, přičemž jeho afinita je silnější k P2 promotoru než k P3 (viz obrázek č. 9) (Schwartz et al. 2014; shrnuto v review Tan et al. 2018).



Obrázek č. 9: Schéma *agr* operonu a jeho regulace mechanismem QS. SpsB je peptidáza, která pomáhá při tvorbě AIP (převzato a upraveno podle Thoendel & Horswill, 2009).

Geny pro Agr systém jsou v populaci bakterií velmi často mutovány a operon *agr* je tudíž označován jako místo genetické nestability (McNamara & Iandolo 1998). Akumulace mutací v *agr* operonu je výsledkem selekčního tlaku – bylo prokázáno, že *agr* mutanty mají vyšší fitness (Somerville et al. 2002). U divoké populace (wilde type) se zjistilo, že u přibližně 3 % buněk je během stacionární fáze navozena buněčná smrt, na které se nevyjasněným způsobem podílí RNAIII. U mutantů v *agr* operonu dochází oproti buňkám divokého kmene méně k tvorbě RNAIII, a tudíž méně k buněčné lýzi, což poskytuje těmto mutantům kompetitivní výhodu (Paulander et al. 2018). Další současný výzkum prokázal, že nefunkční Agr systém může poskytovat lepší přizpůsobení se hostitelským podmínkám (Suligoy et al. 2018).

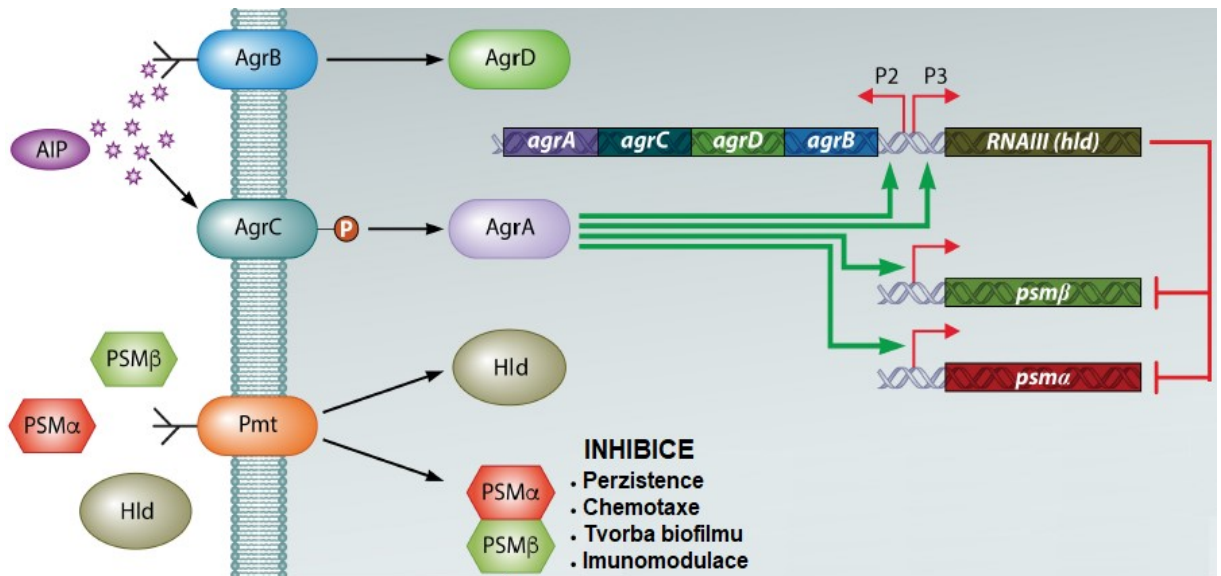
Tento fenomén byl popsán i u jiných druhů bakterií, kdy se tvorbou avirulentní subpopulace může podpořit evoluční stabilita virulence, jak bylo referováno u mutantů pro sekreční systém typu 1 (T1SS) *Salmonella typhimurium*. Virulentní subpopulace *S. typhimurium* produkující T1SS umožňuje tvorbu zánětu a invazi do epitelu, čehož využívá avirulentní subpopulace, která T1SS neprodukuje a její růstová rychlost je tudíž větší (Diard et al. 2013). Tento fenomén bývá řazen vedle fenoménu bet-hedging strategie jako další vysvětlení fenotypové heterogenity a je označován jako „strategie dělby práce“, kdy jedna

z populací se za velkých ztrát energie obětuje, aby zvýšila fitness populace jako celku (Ackermann et al. 2008; Healey et al. 2016).

První domněnka o souvislosti Agr systému a perzistence byla vyslovena již v roce 2000, kdy bylo prokázáno, že Agr systém má negativní vliv na tvorbu biofilmu (Vuong et al. 2000), který představuje důležitou ochrannou niku perzisterů. Výskyt *agr* mutantů byl pozorován v respiračním traktu pacientů s CF, což vedlo k spekulaci, zda ztráta funkce Agr systému napomáhá perzistenci u chronických onemocnění (Goerke et al. 2003). Následně bylo u SCV kolonií *S. aureus* metodou qPCR zjištěno, že Agr systém není u těchto fenotypových variant aktivován (Moisan et al. 2006).

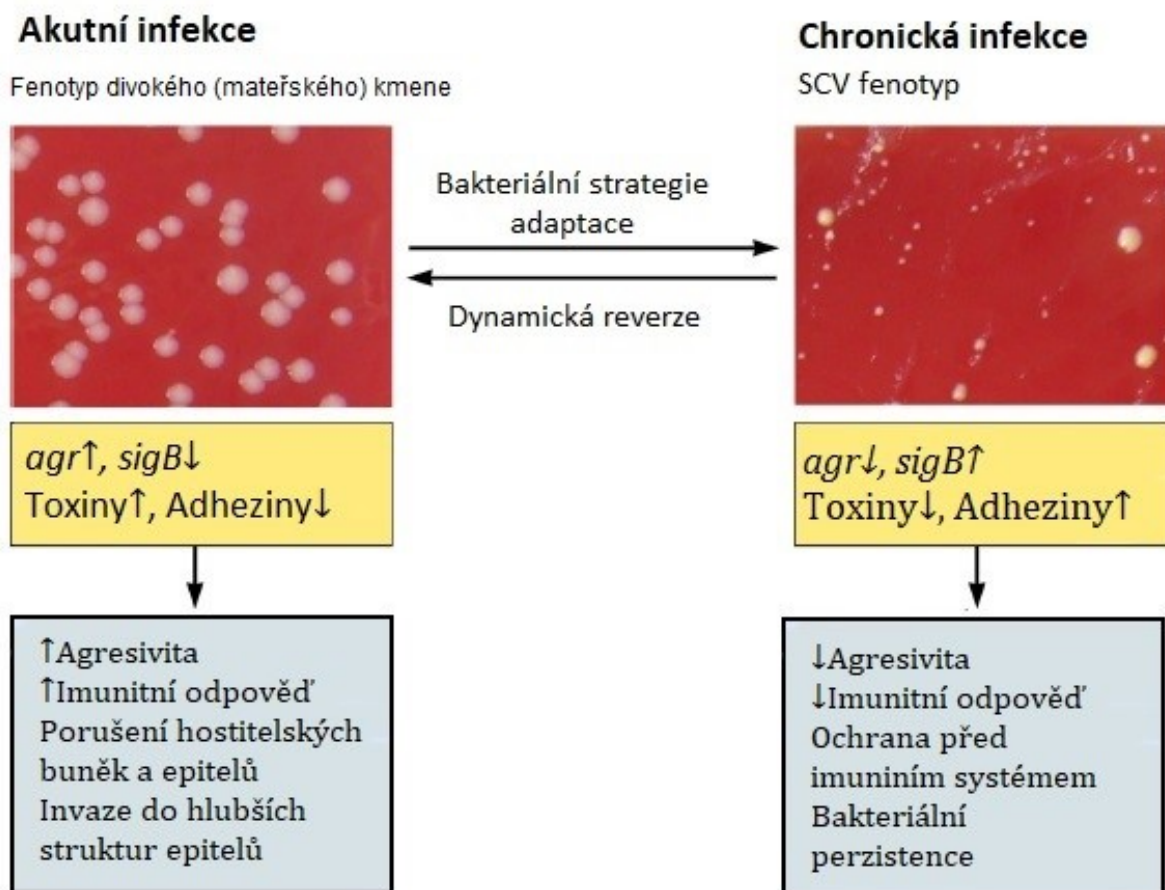
Podle současných poznatků Agr systém může fungovat jako regulátor virulenčních genů dvěma různými způsoby. První typ regulace je nepřímým prostřednictvím RNAIII, regulační RNA, která se váže na transkripty virulenčních genů nebo dalších regulátorů a moduluje jejich expresi (Boisset et al. 2007). Druhý je přímá regulace prostřednictvím proteinu AgrA, který se po fosforylaci AgrC kinázou váže nejen do promotorů P2, P3 *agr* operonu (jak bylo popsáno výše), ale i do promotorů virulenčních genů, např. tzv. *psm* (phenol soluble modulins) genů – *psmA* a *psmβ* (viz obrázek č. 10) a umožňuje jejich expresi. (Queck et al. 2008). Geny *psmA* a *psmβ* kódují amfipatické peptidy PSM α 1–PSM α 4 (kratší) a PSM β 1, PSM β 2 (delší), klíčové molekuly v patogenezi *S. aureus*, které ovlivňují tvorbu biofilmu a také mají vliv na imunitní systém hostitele (shrnuto v review Peschel 2013). Mohou například fungovat jako antagonisté toll-like receptorů hostitele, což napomáhá patogenu uniknout imunitnímu systému (Chu et al. 2018).

Ve studii Xu a jeho kolegů (2017) se potvrdilo, že aktivace Agr systému má negativní vliv na nastolení perzistence. U mutantů v genech *agrC* a *agrD*, stejně jako mutantů *psmA1-4* nebo *psmβ1-2* ve stacionární fázi došlo ke zvýšení perzistence k levofloxacinu a zároveň mutace v *agrC* a v *agrA* významně reprimovala expresi PSM (Xu et al. 2017). To vedlo k úvahám, že negativní vliv Agr systému může být zprostředkován prostřednictvím exprese PSM. Účast Agr systému v regulaci nastolení virulence nebo perzistence byl testován také *in vivo*, kdy mutanty v *agrC* *S. aureus*, které způsobovaly chronickou kostní osteomyelitidu u krys, méně produkovaly virulenční faktory a infekce těmito mutanty vedla méně k zánětlivé reakci (Suligoy et al. 2018).



Obrázek č. 10: Význam Agr systému v nastolení perzistence. Fosforylovaný AgrA indukuje vazbou do promotorů *psmA* a *psmβ* expresi modulinů PSM α a PSM β , které reprimují tvorbu perzisterů (převzato a upraveno podle Trastoy et al. 2018).

Již dříve bylo popsáno, že Agr systém je u *S. aureus* pod vlivem obecné stresové odpovědi prostřednictvím regulátoru SarA, který přímou vazbou do oblasti mezi promotory P2 a P3 *agr* operonu způsobuje aktivaci Agr systému (Chien & Cheung, 1998). Kromě toho se spekuluje o mechanismu negativní regulace SigB a Agr, pravděpodobně nepřímo přes dosud neobjevený regulátor (Bischoff et al. 2001; Horsburgh et al. 2002; Andrey et al. 2015). Obecná stresová odpověď je tudíž provázána s klíčovým regulátorem virulencních genů Agr a tím také s perzistencí, ačkoliv souvislost mezi těmito drahami nebyla dosud prozkoumána. Podle současné představy *S. aureus* pravděpodobně pomocí Agr systému reverzibilně „přepíná“ mezi dvěma fenotypy – u jednoho z nich dochází k aktivaci exprese *agr*, čímž dochází k aktivaci virulencních faktorů prostřednictvím RNAIII, a to vede k akutní infekci. Naopak represe *agr* operonu a exprese *sigB* způsobuje navození stavu perzistence, jehož výsledkem je chronická infekce (viz obrázek č. 11) (Kahl et al. 2016; Tuscherr et al. 2017; Xu et al. 2017). Na této regulaci se pravděpodobně mohou podílet právě peptidy PSM, které jsou produkovány do supernatantu a v akutní fázi infekce neznámým mechanismem moduluji membránu perzisterů, čímž zvyšují jejich citlivost k antibiotikům. Vzhledem k deaktivaci PSM u chronických infekcí je citlivost buněk k antibiotikům redukována a tvoří se subpopulace perzisterů (Bojer et al. 2018). Peptidy PSM se mohou působením přímo na perzistery účastnit jako faktory podporující resuscitaci, které zajišťují přepnutí mezi akutní a chronickou infekcí, ačkoliv tato hypotéza dosud čeká na své potvrzení.



Obrázek č. 11: „Přepínání“ mezi různými bakteriálními strategiemi. Indukce exprese *agr* vede k aktivaci transkripce toxinů, což zvyšuje agresivitu infekce a dochází k invazi do epitelů. Naopak umlčení transkripce *agr* a aktivace transkripce *sigB* vede do stavu bakteriální perzistence (převzato a upraveno podle Kahl et al. 2016).

2.4 Klinický význam perzistence

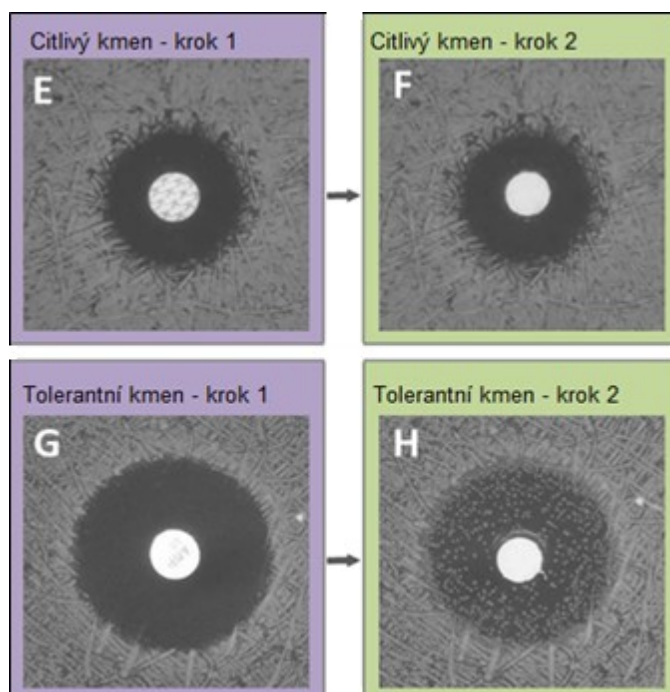
U zdravého jedince je po nasazení antibiotik malá frakce přeživších bakterií zlikvidována imunitním systémem, což je také důvod, proč perzistence byla po mnoha desetiletí přehlížena a větší pozornost byla věnována studiu rezistence. Avšak u imunokompromitovaných osob způsobují přeživší perzisteri velké problémy vedoucí k opakovanému návratu infekcí. To je důsledkem selhání imunitního systému a jeho neschopností rozpoznat příslušného patogena (Fisher et al. 2017). Předpokládá se, že perzisteri mohou přežívat v ochranných nikách jako je například biofilm nebo, v případě perzistence vnitrobuněčné, cytoplazma eukaryotických buněk, čímž se zvyšuje jejich schopnost přežití (Tuchscher et al. 2010). Zničení této malé subpopulace buněk je proto velmi obtížné, avšak zásadní pro klinickou praxi při léčbě chronických infekcí.

Typickým příkladem imunokompromitované osoby může být pacient s cystickou fibrózou. Toto genetické onemocnění vede mimo jiné ke změně prostředí plic, které jsou poté

náchylnější k napadení patogenní bakterií *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*, a protože imunita těchto lidí není dostatečná, antibiotická léčba proti nim selhává (shrnutí v Hauser et al. 2011). Infekce dýchacího traktu bakterií *S. aureus* nastává u cystických fibrotiků již v raném dětství (Ridder-Schaphorn et al. 2007). Vzhledem k tomu, že léčba antibiotiky u těchto pacientů trvá téměř celý jejich život, jsou izoláty z pacientů s CF vhodnými vzorky pro studium perzistence a všeobecně pro studium adaptačních a evolučních strategií, protože zde bakterie žijí pod velkým selekčním tlakem (Langhanki et al. 2018). V současnosti je tedy hlavním problémem klinické praxe detekce a eradikace perzistentních buněk.

2.4.1 Možnosti detekce a eradikace perzisterů v klinické praxi

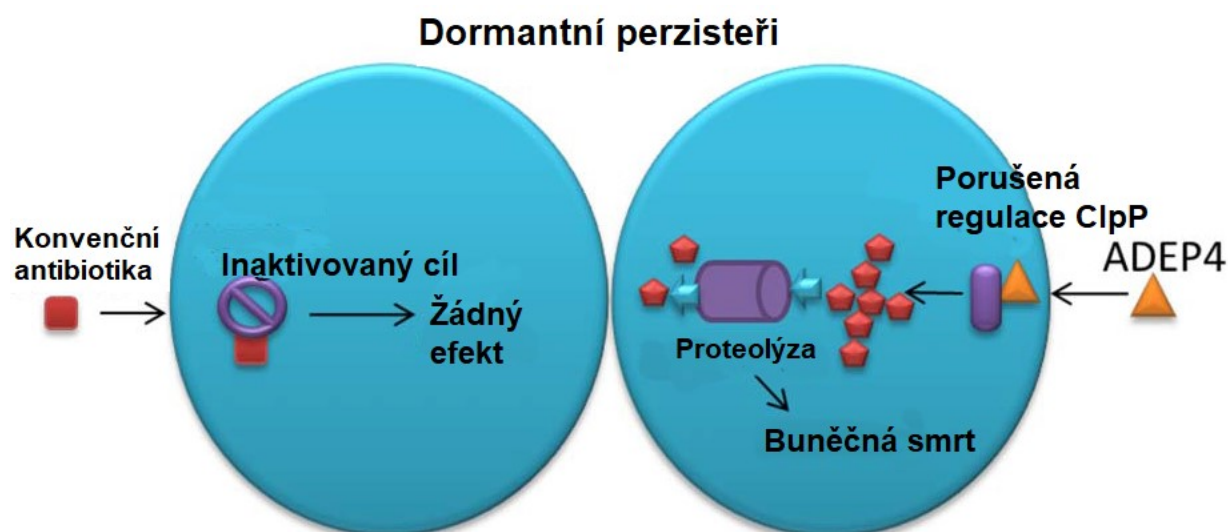
Detekce a kvantifikace perzisterů se pro vědecké účely nejčastěji provádí stanovením křivek hynutí, což je však z hlediska časové a finanční náročnosti pro klinickou praxi neproveditelné. V současné době se v literatuře objevují snahy zavést jednoduchou techniku pro stanovení perzistence. TD test navrhovaný skupinou Nathalie Balaban z roku 2017 (viz obrázek č. 12) je nadějnou možností rychlého otestování, částečně je možná i kvantifikace perzisterů, ačkoliv podle autorů tohoto testu se zdá, že nedokáže rozlišit perzistery od tolerantních bakterií (Gefen et al. 2017).



Obrázek č. 12: Ukázka provedení TD testu. TD test u citlivého (E, F) a tolerantního kmene (perzistentního; G, H). Antibiotický disk umístěný na kultuře rozetřené na misce (E, G) se následně vymění za disk s živinami (glukózou; F, H). V inhibiční zóně lze potom pozorovat resuscitované perzistery (převzato a upraveno podle Gefen et al. 2017).

Eradikace perzisterů je vzhledem k jejich omezenému metabolismu obtížná, protože je těžké cílit na buňky v dormantním stavu s redukovánými životními procesy. Důležitá je tedy možnost jejich resuscitace, to především znamená obnovení jejich metabolismu a tím následné zabití antibiotiky (shrnutí v review Wood, 2017).

Udává se, že jednou z možností eradikace je kombinace antibiotik s jinými metabolity, či různými aktivátory metabolických procesů. Například indukce ClpP proteázy Acyldepsipeptidem (ADEP) aktivuje u perzisterů konstitutivní degradaci všech proteinů v buňce, což vede k samo-požírání a k degradaci buněk (viz obrázek č. 13). Kombinace ADEP s rifampicinem vedla ke kompletní eliminaci perzisterů u rostoucích, stacionárních buněk, i buněk v biofilmu, *in vitro* ale také *in vivo* u myšího modelu (Conlon et al. 2013). Kombinace metabolitů začátku glykolýzy (manitol, fruktóza, glukóza), příp. pyruvátu, s gentamicinem vedla k úplné eliminaci perzisterů. Katabolismus těchto metabolitů totiž vede k tvorbě proton-motivní síly, která usnadňuje transport gentamicinu do buněk a zlepšuje tedy jeho účinek (Allison et al. 2011). Podobně glukóza v kombinaci s daptomycinem vedla k účinnějšímu zabíjení perzisterů *S. aureus*, tento mechanismus je však oproti Allison (2011) nezávislý na proton-motivní síle (Prax et al. 2016).



Obrázek č. 13: Účinek Acyldepsipeptidu (ADEP4) na perzistentní buňky v porovnání s konvenčním antibiotikem. ADEP4 způsobuje aktivaci ClpP, která vede k autoproteolýze a k buněčné smrti perzisterů (převzato a upraveno podle Conlon et al. 2013).

Naděje léčby chronických infekcí také může spočívat ve vyvinutí nového antibiotika zacíleného speciálně proti perzisterům. Schmidt a jeho kolegové v roce 2014 vyvinuli antibiotikum z krátkého peptidu penetratinu (pocházejícího z peptidu penetrujícího buněčnou

membránou, CPP) a tobramycinu a toto nové antibiotikum pojmenoval pentobra. Aminoglykosid tobramycin sám o sobě na perzistery není účinný kvůli nízké transportní aktivitě perzisterů. Penetratin navázaný na tobramycinu však indukuje negativní nanoskopické zakřivení membrány, což vede k její destabilizaci a porušení. Pentobra je proto na perzistery mnohonásobně účinnější než tobramycin (Schmidt et al. 2014).

Kromě toho nesmím opomenout, že možným řešením by bylo cílit právě na regulátory, které umožňují navození perzistentního stavu. Cílem proti chronickým infekcím by mohl být například SigB (Tuchscherr et al. 2017), jehož vlivem na perzistenci jsem se zabývala v kapitole 2.3.1. Ačkoliv je schopnost perzistence skoro stejně dlouho známá jako rezistence, metody detekce a eradikace perzisterů v klinické praxi dosud chybí. Dostupná antibiotika jsou většinou poměrně účinná v léčbě akutních infekcí, pro dlouhodobou léčbu chronických infekcí jsou ale nedostačující. Vzhledem k tomu, že počet imunokompromitovaných osob roste (Kim et al. 2018), je výzkum v oblasti perzistence den ode dne zásadnější.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

V této práci jsem pracovala s bakteriálními kmeny:

- referenčním kmenem *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (Seattle 1945) (ATCC® 25923™)
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* RN4220 s defektním restričním systémem, ale zachovalým modifikačním systémem (Nair et al. 2011)
- 24 klinickými izoláty z FN Motol, k nimž byly dodány následující informace:

Izolát	<i>spa</i> typ	Pacient/odběr	Datum odběru	Rezistence	MLS _B rezistence	Rezistence k dalším ATB
1	t13495	16/1	24.08.2011	<i>ermC</i>	MLS _B	citlivý
2	t13495	16/4	06.03.2013	-	citlivý	citlivý
3	t002	21/1	29.08.2011	<i>ermC</i>	MLS _B	citlivý
4	t002	21/3	15.05.2013	<i>ermC</i>	MLS _B	citlivý
5	t13503	24/1	16.11.2011	-	ery	citlivý
6	t3272	24/4	04.09.2013	-	ery	citlivý
7	t2275	28/1	15.08.2011	-	MLS _B	citlivý
8	t2275	28/8	06.11.2013	-	MLS _B	citlivý
9	t3682	34/2	19.10.2011	-	citlivý	oflo
10	t3682	34/8	06.11.2013	-	citlivý	citlivý
11	t224	49/1	22.08.2011	-	citlivý	citlivý
12	t224	49/6	18.12.2013	-	citlivý	citlivý
13	t6906	50/1	06.09.2011	-	MLS _B	citlivý
14	t6906	50/6	11.11.2013	-	MLS _B	citlivý
15	t1510	52/1	01.08.2011	-	MLS _B	citlivý
16	t1510	52/10	24.04.2013	-	MLS _B	citlivý
17	t831	88/1	30.08.2011	-	MLS _B	citlivý
18	t831	88/4	18.09.2013	-	MLS _B	citlivý
19	t012	92/2	15.11.2011	-	MLS _B	SXT, genta, rif
20	t012	92/6	15.01.2013	-	MLS _B	genta
21	t003	97/1	17.07.2011	<i>ermA</i>	MLS _B	MRSA
22	t003	97/7	16.10.2013	<i>ermA</i>	MLS _B	MRSA
23	t13497	107/1	11.08.2011	-	MLS _B	citlivý
24	t13497	107/6	15.07.2013	-	MLS _B	oflo

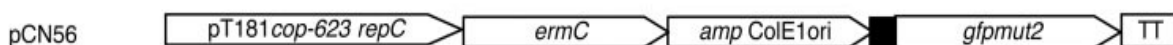
Tabulka č. 1: 24 izolátů, 11 dvojic stejného *spa* typu a jedna dvojice s odvozeným *spa* typem (izoláty 5 a 6 – inserce jedné repetice – lze je však považovat za klonální (Tkadlec et al. 2015)), které se navzájem liší dobou odběru (přibližně 2 roky). Dále je zde ukázána rezistence těchto izolátů k antibiotikům – erytromycinu (*ermC*, *ermA*, *ery*), makrolidům, linkosamidům a streptograminu B (MLS_B), trimethoprimu a sulfametoxazolu (SXT), gentamicinu (genta), rifampicinu (rif) a ofloxacinu (oflo). Izoláty 21 a 22 jsou methicilin-rezistentní bakterie (MRSA), proto jsem s nimi v této práci nepracovala.

- kmeny *Escherichia coli*:
 - ***E. coli* K12 IM08B**
 - Genotyp: *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ*M15 Δ *lacX74* *recA1*, *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG* Δ *dcm*, Ω *Phelp-hsdMS* (CC8-2) Ω PN25-*hsdS* (CC8-1)
 - Charakterizace: Kmen *E. coli* IM08B obsahuje *hsdM* a *hsdS* geny ze *S. aureus* NRS384 (jsou součástí RM systému typu I u tohoto kmene), produkty těchto genů umožňují specifickou metylaci genomu podle *S. aureus*
 - Poskytnutý výzkumným centrem Biocev (Mgr. Gabriela Balíková-Novotná, Ph.D.)
 - ***E. coli* DH5 α**
 - Genotyp: *deoR endA1 gyrA96 hsd R17*(*rk*⁻, *mk*⁺) *recA1 relA1*, *supE44 thi-1* (*lac ZYA-arg F*)U169 ϕ 80*lacZ* M15 F⁻ λ ⁻)
 - Charakterizace: Kmen *E. coli* DH5 α obsahuje nejružnější mutace v genech (například mutace v endonukleáze *endA1* a rekombináze *recA1*), což se u tohoto kmene projevuje vysokou transformační účinností
 - Poskytnutý společností CLONTECH

3.1.2 Plazmidy

pCN56 – vysokokopiový plazmid, ERYr (*ermC*), MCS, GFP, TT (Charpentier et al. 2004) poskytnutý výzkumným centrem Biocev (Mgr. Gabriela Balíková-Novotná, Ph.D.), velikost plazmidu 6772 bp

- Mapa pCN56:



pT181cop-623repC je replikační počátek *S. aureus*, *ermC* kazeta erytromycinová rezistence, *ampColE1ori* replikační počátek *E. coli* spojený s kazetou ampicilinové rezistence (gen *bla*), ■ je multikopiové místo (MCS) – místo vložení inzerty, *gfpmut2* je gen kódující GFP a TT je transkripční terminátor

pCN36 – nízkokopiový plazmid, TETr (*tetM*), MCS (Charpentier et al. 2004) poskytnutý výzkumným centrem Biocev (Mgr. Gabriela Balíková-Novotná, Ph.D.), velikost plazmidu 7020 bp

- Mapa pCN36:



pT181cop-wt repC je replikační počátek *S. aureus*, *tet(M)* kazeta pro tetracyklinovou rezistenci, *ampColE1ori* replikační počátek *E. coli* spojený s kazetou ampicilinové rezistence (gen *bla*), ■ je multikopiové místo (MCS) – místo vložení inzerty

3.1.3 Kultivační média

Všechna média byla sterilizována v autoklávu při 120 °C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa po dobu 20 minut. Před sterilizací byl při přípravě pevného média přidáván agar (Oxoid) na konečnou koncentraci 2 % (w/v).

Kultivační médium pro *E. coli*:

- LB médium (10 g tryptonu, 5 g kvasničného autolyzátu, 10 g NaCl)

pH upraveno na 7,0 pomocí 1 M NaOH. Doplněno destilovanou vodou na objem 1 litr. Přidáno antibiotikum v potřebné koncentraci (ampicilin 100 µg/ml)

Kultivační médium pro *S. aureus*

- BHI médium (12,5 g extrakt z mozku, 5 g extrakt z hovězího srdce, 10 g pepton, 2 g glukóza, 5 g chlorid sodný, 2,5 g fosforečnan disodný)

37 g BHI média (Oxoid) rozpuštěno v 1 litru destilované vody, sterilizováno

- TSB médium (17 g tryptonu, 3 g sóji, 5 g NaCl, 2,5 g fosforečnan didraselný, 2,5 g glukózy)

7,5 g TSB (Sigma) rozpuštěno v destilované vodě na objem 250 ml. Přidáno příslušné antibiotikum v potřebné koncentraci (erytromycin 10 µg/ml, tetracyklin 10 µg/ml)

3.1.4 Použitá antibiotika

Antibiotikum	Zkratka	Výrobce	Koncentrace zásobního roztoku (mg/ml)
Ampicilin	Amp	Roth	100
Ciprofloxacin	Cip	Fluka	25
Gentamicin	Gen	Roth	50
Erytromycin	Erm	Fluka	9
Tetracyklin	Tet	Fluka	10
Oxacilin	Oxa	Bristol-Myers Squibb	50
Vancomycin	Van	MP Biomedicals	50

Zásobní roztoky antibiotik byly uchovávány v -20 °C.

Dále byly použity antibiotické disky od výrobce Oxoid pro:

Antibiotikum	Množství ATB v disku
Ciprofloxacin	1 µg, 10 µg
Gentamicin	10 µg
Oxacilin	1 µg
Vankomycin	5 µg
Tetracyklin	30 µg

3.1.5 Enzymy

Enzym	Výrobce
ApaI RE	Thermo Scientific
BamHI RE	Thermo Scientific
BamHI RE Fast Digest	Thermo Scientific
DNáza	Thermo Scientific
EcoRI RE	Thermo Scientific
EcoRI RE Fast Digest	Thermo Scientific
Lyzostafin	Sigma
Maxima H Minus Reverzní transkriptáza	Thermo Scientific
Polymeráza Dream Taq	Thermo Scientific
RNáza A	Thermo Scientific
T4 DNA ligáza	Thermo Scientific
XhoI RE	Thermo Scientific

3.1.6 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
Agaróza – TopVision Agarose	Thermo Scientific
CCCP (karbonyl kyanid m-chlorofenylhydrazon)	Sigma
DMSO	Merck
DNA loading dye	Fermentas
dNTP mix (10 mM)	Fermentas
EDTA	Lachema

Ethanol	Lachema
Ethidium bromid	Sigma
Gene Ruler, DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl)	Fermentas
Glukóza	Merck
Glycerol	Sigma
Inhibitor RNáz (RiboLock)	Thermo Scientific
Isopropanol	Lachema
Kyselina octová	Lachema
MgSO ₄	Penta
NaCl	Roth
NaOH	BDH
Octan sodný	Lachema
PEG 8000	Sigma
Random hexamer primer	Thermo Scientific
Sacharóza	Penta
SDS (dodecylsírán sodný)	Sigma
To-Pro-3	Thermo Scientific
Tris HCl	Sigma

3.1.7 Roztoky

2 M NaCl (116,88 g NaCl rozpustit v 1 l vody, sterilizovat)

1x PBS: (5 ml 10x PBS + 45 ml destilované vody, zfiltrováno)

Roztoky pro izolaci plazmidu *E. coli*:

Roztok 1 (50mM glukóza, 10 mM EDTA, 10 mM Tris)

Roztok 2 (1 M NaOH, 5% SDS, voda, vždy připravován čerstvý)

Roztok 3 (2 M octan sodný)

Roztok pro izolaci plazmidu *S. aureus*:

TSM pufr (1 ml 0,5 M Tris HCl, 50 µl 2 M MgSO₄, 1,71 g sacharózy, 10 ml H₂O)

Roztoky pro horizontální elektroforézu:

50x TAE pufr - (36,3 g Tris, 8,57 ml ledové kyseliny octové,
126 ml destilované vody, 15 ml 0,5 M EDTA)

1x TAE pufr – (20 ml 50x TAE naředit do 1 l destilované vody)

Roztok na přípravu kompetentních buněk *S. aureus*:

0,5 M sacharóza (25,68 g sacharózy rozpustit v 150 ml destilované vody, sterilizováno)

3.1.8 Primery

3.1.8.1. PRIMERY PRO KLONOVÁNÍ

Podtržená je část se sekvencí pro RE BamHI (GGATCC) a EcoRI (GAATT)

Primer	Sekvence	T_m
SigB	F: 5'-TCT <u>GGA TCC</u> GCA ATT TTA AAG CTT CA-3' R: 5'-CAT <u>AGA ATT CTT</u> CAT TAC ACT CCT ACTT-3'	60,1 °C 59,3 °C
Agr	F: 5'-TCT <u>GGA TCC</u> CAA CTA TTT TCC ATC ACA-3' R: 5'-CAT <u>AGA ATT CTT</u> TTA CAC CAC TCT CCT CA-3'	61,9 °C 62,4 °C
Primer z plazmidu pCN56	5'-CTC ATA TGT ATA TCT CCT TCT TA-3'	53,5 °C

3.1.8.2. PRIMERY PRO qPCR

Primer	Sekvence	T_m
SigB	F: 5'-GGT TAG TTC ATC GCTC ACTT-3' R: 5'-CTG TAA TCG GTG AAA TCA AAA G-3'	53,4 °C 54,7 °C
GyrB	F: 5'-ACT GAT GCC GAT GTG GA-3' R: 5'-AAC GGT GGC TGT GCA ATA-3'	52,0 °C 52,6 °C

Uvedené primery (viz kap. 3.1.8.1 a 3.1.8.2) od komerčního výrobce (Eurofins genomics) jsem naředila množstvím vody uvedeným v příbalové informaci. Primery použité při klonování (viz kap. 3.1.8.1) jsem poté ještě jednou zředila 10x na zásobní roztok, který jsem potom používala v reakcích.

3.1.9 Komerční soupravy

Kit	Výrobce	Využití
GeneJET Plasmid DNA Kit	Thermo Scientific	izolace plazmidu
HighPrep PCR	MagBio	purifikace PCR produktů
MagJET RNA Kit	Thermo Scientific	izolace RNA
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific	extrakce DNA z gelu
BacLight™ Bacterial membrane potential kit	Molecular Probes	obarvení buněk DiOC ₂ (3)
Luna Universal qPCR Master Mix	NE BioLabs	Kvantitativní PCR
Souprava pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro gentamicin, ciprofloxacin, oxacilin a vankomycin (výrobce Microlatest)		

3.1.10 Přístroje a laboratorní vybavení

Přístroj	Výrobce
Termostat	Memmert
Třepačka	N-Biotek, NB 205
DNA/RNA UV Cleaner Box	Boeco Germany
Centrifugy	
Micro 20	Hettich
Micro 22 R	Hettich
Centra CL3R	IEC
Minispin	Eppendorff
Routina 3800	Hettich
Centrifuge 5430	Eppendorf
Spektrofotometr Helios γ	Thermo scientific
NanoDrop 1000 Spektrofotometr	Thermo scientific
PCR thermocykler	VWR Doppio
Real-time PCR cycler	Bio-Rad IQ5
Průtokový cytometr	BC Cytoflex
UV lampa	Vilber Lourmat
Elektroporátor Gene Pulser	BIO-RAD

Zařízení na elektroforézu (Power Pac 3000)	Bio-Rad
Magnetický stojánek	Dynal Biotech
Fotoaparát	Olympus SP-565UZ
Mikrovlnná trouba	LG
Hlubokomrazicí box (deep freeze)	Schoeller

3.1.11 Vyhodnocovací programy a internetové odkazy

Cytextpert – program na vyhodnocení výsledků z průtokové cytometrie

FloJo – program na vyhodnocení výsledků z průtokové cytometrie

Chromas – program na vyhodnocování výsledků ze sekvenace

Geneious – program na zpracování molekulárně-biologických dat

<https://app1.unmc.edu/fgx/?offset=569848&width=10000/> mapa genomu *S. aureus*

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> program na navrhování primerů

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> Oligonucleotide Properties Calculator

– jednoduchý nástroj na převod forward-reverse primerů

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> analýza sekvencí

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html> analýza fluorescenčních spekter

3.2 Metody

3.2.1 Práce s bakteriální kulturou

S kulturou jsem pracovala sterilně, při naočkování čerstvého média jsem pracovala v UV boxu. *S. aureus* patří do bezpečnostní třídy (Biosafety level) 2, je třeba s ním proto pracovat opatrně a dodržovat hygienická pravidla. Hustotu bakteriální populace (OD) jsem měřila na spektrofotometru Helios γ při 600 nm.

3.2.2 Příprava konzerv pro dlouhodobé uchovávání kmenů

Pro dlouhodobé skladování jsem bakteriální kmeny uchovávala v 20% glycerolu (v/v) v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C. Přechodně mohou být uchovávány na pevných agarových médiích při $2-4$ °C.

Pro přípravu konzerv pro uchovávání kmenů jsem do označené mikroskopické pipety napipetovala 0,5 ml média (pro *S. aureus* BHI, pro *E. coli* LB, viz kap. 3.1.3) do kterého jsem pomocí kličky resuspendovala biomasu z agarové misky příslušného bakteriálního klonu, případně jsem použila již narostlou kulturu v tekutém médiu. Potom jsem do mikroskopické pipety přidala 0,5 ml 40% (v/v) glycerolu a nechala jsem chvíli inkubovat na ledu. Potom jsem takto připravenou kulturu uchovávala v hlubokomrazícím boxu v -80 °C.

3.2.3 Příprava kultury pro provedení pokusů

Dva dny před pokusem jsem z hlubokomrazícího boxu naočkovala pevné BHI médium nebo jiné kultivační médium a nechala přes noc růst v termostatu v 34 °C.

Den před pokusem jsem následujícím způsobem připravila noční inokulační kulturu: do 10 ml média BHI jsem naočkovala kličkou buňky z Petriho misky a tuto kulturu jsem nechala růst přes noc v třepačce při 34 °C při 180 RPM.

3.2.4 Určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) klinických izolátů

MIC každého izolátu jsem určila použitím komerční sady Microtatest. Bakteriální kulturu kultivovanou přes noc jsem přeočkovala do čerstvého SM média (je součástí sady) a napěstovala na $OD_{600} = 0,5-0,6$. Následně jsem buněčnou suspenzi naředila SM médiem na hodnotu $OD_{600} = 0,05$ a rozpipetovala po 100 μ l do každé jamky podle návodu. Destičku jsem kultivovala při 34 °C po dobu 20 hodin a vyhodnotila.

3.2.5 TD test (tolerance disk test)

I. Příprava inhibiční zóny

1. Kulturu kultivovanou přes noc (viz kap. 3.2.3) jsem naředila čerstvým BHI tak, aby obsahovala cca 10^6 – 10^7 bakterií
2. Kultivovala jsem na třepačce po dobu 3 h (37 °C, RPM: 180)
3. Potom jsem z kultury vysela 200 µl na pevné BHI médium a rozetřela hokejkou
4. Doprostřed jsem sterilně vložila ATB disk (pinzetou)
5. Vyšeté misky s ATB diskem jsem kultivovala při teplotě 33 °C v termostatu po dobu 24 hodin
6. Misky s narostlou kulturou a s inhibiční zónou jsem vyfotografovala

II. Resuscitace perzisterů:

1. Připravila jsem si glukózové disky: 20% (w/v) glukóza – 2 kapky (asi 20 µl) jsem nanesla na referenční disk bez ATB nebo filtrační papír o velikosti disku (např. „odpad“ z klasické děrovačky), sterilizovala jsem v sušárně ve 120 °C po dobu 3 hodin
2. Sterilně jsem pomocí pinzety vyměnila ATB disk za glukózový disk
3. Misky jsem kultivovala s glukózou 24 a 48 hodin v termostatu v 34 °C
4. Misky jsem po 24 a 48 hodinách vyfotografovala a vyhodnotila

Poznámka: Lze předpokládat další alternativy tohoto testu a test přizpůsobit MIC daného kmene. Před pokusem je žádoucí zvážit, zda koncentrace komerčně dodaného ATB disku není příliš velká pro daný kmen a pokud ano, měl by se tento disk rozpúlit či rozčtvrtit. Pokud by totiž byla koncentrace antibiotika příliš vysoká, antibiotikum by nemohlo dostatečně rozdifundovat médiem (nekleslo by pod hodnotu MIC), což by znemožňovalo růst perzisterů v inhibiční zóně.

3.2.6 Křivka hynutí s antibiotiky

1. Připravila jsem si kulturu kultivovanou přes noc z izolátu, ze kterého jsem stanovovala křivku hynutí (viz kap. 3.2.3)
2. Do několika baněk (kontrola a vybraný počet antibiotik) jsem sterilně nalila 10 ml čerstvého BHI média
3. Změřila jsem OD_{600} kultury, podle toho spočítala množství kultury k naočkování do čerstvého BHI na počáteční OD_{600} 0,05 a tímto množstvím kultury jsem naočkovala

4. Takto naočkované kultury jsem nechala růst 1–2 hodin dle izolátu až do $OD_{600}=0,5$ (34 °C, RPM: 180)
5. Po dosažení OD_{600} přibližně 0,5 jsem odebrala z jedné kultury 100 μ l do mikrozkuřavky
6. Potom jsem ke zbývajícím kulturám přidala jednotlivá antibiotika – dle MIC a koncentrace zásobního roztoku jsem vypočítala množství přidaného ATB
7. Zpracování vzorku v každém odběru po každé hodině od přidání ATB:
 - a. Odebrala jsem 100 μ l kultury do mikrozkuřavky a přidala 900 μ l 2 M NaCl
 - b. Odebrala jsem 200 μ l kultury do kyvety, přidala 1800 μ l 2M NaCl a změřila OD_{600} kultury
 - c. Mikrozkuřavky jsem zcentrifugovala (3200 x g, 10 min, laboratorní teplota) (neprovádí se u prvního odběru)
 - d. U zcentrifugovaných mikrozkuřavek jsem odebrala supernatant (900 μ l) a přidala 900 μ l 2 M NaCl
 - e. Vytvořila jsem dekadickou ředící řadu v počtu ředění odpovídající OD_{600}
 - f. Jednotlivá ředění jsem vysela na pevné BHI médium metodou kapkového výsevu: 10 μ l daného ředění jsem napipetovala do matrice na pevném BHI médiu
 - g. Protože bakterie v kapkových výsevech nerostly (viz kap. 4.4), přistoupila jsem ke klasickému stanovení CFU: 200 μ l daného ředění jsem napipetovala na pevné BHI médium a sterilně rozetřela hokejkou

3.2.7 Sběr buněk pro izolaci RNA

1. Postupovala jsem podle bodu 1–4, jak je uvedeno v předchozím bodu v návodu pro křivku hynutí (viz kap. 3.2.6), s tím, že jsem pracovala s dvojnásobným množstvím bakteriální kultury (20 ml)
2. Po dosažení $OD_{600} = 0,5$ jsem přidala ATB v určité koncentraci (10x nebo 100x MIC) a potom od tohoto času ve stanovených časových intervalech jsem odebrala 2 ml kultury do silnostěnné mikrozkuřavky
3. Při každém odběru jsem mikrozkuřavky centrifugovala (3200 x g, 10 min, laboratorní teplota), odebrala supernatant a ihned zamrazila v tekutém dusíku
4. Takto připravené buňky jsem uchovávala v hlubokomrazícím boxu v -80 °C

3.2.8 Příprava vzorků a měření membránového potenciálu průtokovým cytometrem

1. Postupovala jsem podle bodu 1–6, jak je uvedeno v návodu pro křivku hynutí (viz kap. 3.2.6), s tím, že jsem v každém čase odběru odebírala 200 μ l kultury
2. Odebrané vzorky jsem centrifugovala (3200 x g, 10 min, laboratorní teplota), potom jsem odebrala supernatant a buňky resuspendovala v 200 μ l PBS sterilizovaného filtrací
3. K buňkám jsem přidala 4 μ l pracovního roztoku (working solution) DioC₂(3) (1:20 v DMSO naředěný 3 mM roztok DioC₂(3)), inkubovala 15 min ve tmě při laboratorní teplotě a poté přidala 0,5 μ l pracovního roztoku To-pro-3 (1:100 v DMSO naředěný 1mM roztok To-pro-3)

Pro kontrolní vzorky jsem k buňkám před obarvením přidala 10 μ l 500 μ M CCCP (buňky nerespirující), nebo jsem je zahřívala v termobloku po dobu 10 min na 90 °C (buňky permeabilizované), nebo jsem je obarvila pouze DioC₂(3) nebo pouze To-pro-3

4. Každou hodinu od přidání antibiotika jsem provedla odběry T₁–T₄ a v každém odběru jsem postupovala podle bodu 1–3, vzorky jsem uchovávala na ledu do doby měření
5. Vzorky jsem změřila na průtokovém cytometru BC Cytotflex, který je součástí servisního pracoviště PřF UK sekce Biologie: DioC₂(3) jsem analyzovala na přístroji použitím excitace při 480 nm (modrý laser), To-Pro-3 jsem excitovala při 630 nm (červený laser). Zelenou fluorescenci DioC₂(3) jsem detekovala fluorescenčním kanálem při 525 nm (FITC, nastavení napětí na fotonásobiči 500 V), červenou při 610 nm (BV605, nastavení napětí na fotonásobiči 2000 V) a červenou fluorescenci To-pro-3 jsem detekovala při 660 nm (APC, nastavení napětí na fotonásobiči 376 V). Rychlost průtoku vzorku cytometrem byla 11 μ l/min a v každém vzorku bylo zaznamenáno 10 000 událostí. Vzorky jsem měřila při následující kompenzaci: z kanálu Dioc-red jsem odečetla 8 % intezity Dioc-green, z Dioc-green 5 % Dioc-red

3.2.9 Práce s bakteriální DNA

3.2.9.1. IZOLACE PLAZMIDU *E. COLI*

I. Klasický způsob izolace plazmidu

1. Jednotlivé narostlé kultury kultivované přes noc (připravené do cca 3 ml LB média) jsem přepipetovala do mikrozkušavek a centrifugovala jsem je (3200 x g, 10 min, laboratorní teplota)
2. Odebrala jsem supernatant a buňky jsem resuspendovala v 100 µl roztoku 1 (viz kap. 3.1.7)
3. Do každé mikrozkušavky jsem přidala 5 µl RNázy A
4. Dále jsem k buňkám přidala 200 µl roztoku 2 (viz kap. 3.1.7), který jsem si připravila čerstvý (1 ml 1 M NaOH, 1 ml 5% SDS, 3 ml sterilní H₂O), promíchala opatrným převrácením mikrozkušavky a vložila do ledu na 5 min
5. Nakonec jsem přidala 150 µl roztoku 3 (viz kap. 3.1.7), promíchala opatrným převrácením mikrozkušavky a vložila do ledu
6. Mikrozkušavky jsem centrifugovala (22000 x g, 10 min, 4 °C)
7. Opatrně jsem odsála supernatant do nové mikrozkušavky a přidala jsem 300 µl isopropanolu, nechala jsem 10 min stát při laboratorní teplotě
8. Potom jsem mikrozkušavky opět centrifugovala (22000 x g, 10 min, 4 °C)
9. Odebrala jsem supernatant a přidala 200 µl 70% ethanolu (v/v) a znovu centrifugovala (viz bod 8)
10. Izolovaný plazmid jsem nechala usušit, aby v něm nebyly zbytky ethanolu, v 37 °C po dobu 15–20 min
11. Plazmid jsem rozpustila v deionizované vodě

II. Izolace plazmidu použitím GeneJET plasmid DNA kit (Thermo Scientific)

1. Jednotlivé narostlé kultury kultivované přes noc (připravené do cca 3 ml LB média) jsem přepipetovala do mikrozkušavek a centrifugovala jsem je (3200 x g, 10 min, laboratorní teplota)
2. Odebrala jsem supernatant a přidala 250 µl resuspendačního roztoku, a resuspendovala pomocí vortexu
3. Potom jsem přidala 250 µl lyzačního roztoku a obsah zkumavky promíchala otočením 4–6x

4. Nakonec jsem přidala 350 μ l neutralizačního roztoku a zkumavku opět promíchala otočením 4–6x
5. Zkumavku jsem centrifugovala (12 000 x g, 5 min, laboratorní teplota)
6. Supernatant jsem přenesla do speciální kolonky (Thermo Scientific GeneJET Spin Column), která je součástí kitu a kterou jsem umístila do mikrozukumavky
7. Kolonku s mikrozukumavkou jsem centrifugovala (12 000 x g, 1 min, laboratorní teplota)
8. Přidala jsem 500 μ l promývacího roztoku a opět jsem kolonku centrifugovala (12 000 x g, 30–60 s, laboratorní teplota). Odstranila jsem supernatant z mikrozukumavky.
9. Opakovala jsem krok 8
10. Centrifugovala jsem prázdnou kolonku s mikrozukumavkou (12 000 x g, 1 min, laboratorní teplota)
11. Krátce jsem nechala kolonku uschnout
12. Kolonku jsem přemístila do nové sterilní mikrozukumavky a přidala do ní 50 μ l elučního pufru, 2 min jsem nechala stát
13. Mikrozukumavku s kolonkou jsem centrifugovala (12 000 x g, 1 min, laboratorní teplota), do mikrozukumavky se mi uvolnil vyizolovaný plazmid

3.2.9.2. IZOLACE PLAZMIDU *S. AUREUS*

1. Jednotlivé narostlé kultury kultivované přes noc (připravené do cca 3 ml BHI média) jsem přepipetovala do mikrozukumavek a centrifugovala jsem je (3200 x g, 10 min, laboratorní teplota)
2. Odstranila jsem supernatant a buňky jsem resuspendovala ve 100 μ l TSM pufru (viz kap. 3.1.7) s přídavkem 2,5% (v/v) pracovního roztoku lyzostafinu o koncentraci 2 mg/ml
3. Buňky jsem inkubovala 15 min v 37 °C
4. Potom jsem buňky centrifugovala (3200 x g, 5 min, laboratorní teplota) a odstranila supernatant
5. Následně jsem při izolaci plazmidu postupovala podle kap. 3.2.9.1. bod I. nebo II.

3.2.9.3. ŠTĚPENÍ PLAZMIDŮ POMOCÍ RESTRIKČNÍCH ENZYMŮ (RE)

Pro štěpení plazmidu jsem do malé mikrozkušavky napipetovala:

Pufr Fast Digest	3 μ l
Fast Digest REI	1 μ l
Fast Digest REII	1 μ l
Plazmid	0,1 μ g – 1 μ g

Voda do celkového objemu 20 μ l

Mikrozkušavky jsem krátce centrifugovala (short spin) a poté inkubovala při 37 °C po dobu 15 min.

3.2.9.4. AMPLIFIKACE PROMOTOROVÉ OBLASTI GENŮ

Do malé mikrozkušavky pro PCR jsem napipetovala:

Pufr pro Dream Taq polymerázu	5 μ l
dNTP mix (2 mM)	1 μ l
primer Forward	1 μ l
primer Reverse	1 μ l
Taq DNA polymeráza	0,5 μ l
Templát (chromozomální DNA)	v množství 200 μ g – 1 μ g
Voda	doplněna na celkový objem 50 μ l

Zkušavku jsem krátce centrifugovala, dala do termocykleru a nastavila daný program.

Program zahrnuje tyto kroky:

1)	Zahřívání	95 °C	3 min	} <table border="1"><tr><td>Opakování</td></tr><tr><td>35x</td></tr></table>	Opakování	35x
Opakování						
35x						
2)	Denaturace	95 °C	30 s			
3)	Nasednutí primerů	58 °C ¹	30 s			
4)	Elongace (replikace)	72 °C	30 s			
5)	Ochlazení	4 °C				

¹ Teplota odpovídající teplotě tání (T_m) konkrétních primerů (viz kap. 3.1.8)

3.2.9.5. PŘEČIŠTĚNÍ PCR PRODUKTU

Inzert jsem přečistila použitím HighPrep PCR Kit (MagBio). Postupovala jsem podle přiloženého návodu.

1. PCR produkt (50 μ l) jsem přepipetovala do mikrozkušavky a přidala 90 μ l magnetických kuliček (jsou součástí kitu), několikrát jsem pipetou promíchala
2. Inkubovala jsem 5 min při pokojové teplotě
3. Potom jsem umístila mikrozkušavku do magnetického stojánu a po 2 min odsála supernatant
4. Mikrozkušavku umístěnou na magnetickém stojánu jsem 2x propláchla 200 μ l 80% (v/v) ethanolu
5. Mikrozkušavku jsem sušila po dobu 10–15 min při 37 °C, aby v ní nebyly zbytky ethanolu (stále na magnetickém stojánu)
6. Mikrozkušavku jsem vyjmula z magnetického stojánu a kuličky rozpustila v 50 μ l vody předehřáté na 55 °C, inkubovala jsem 2 min při pokojové teplotě
7. Potom jsem opět mikrozkušavku umístila do magnetického stojánu a nechala chvíli stát
8. Odsála jsem supernatant a napipetovala jej do nové čisté mikrozkušavky

3.2.9.6. LIGACE RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ DNA

Do malé mikrozkušavky jsem napipetovala:

Pufř pro T4 DNA ligázu	1 μ l
Inzert	odpovídající dvojnásobné molární koncentraci plazmidu
Plazmid	odpovídající množství 0,1 – 0,5 μ g
T4 DNA Ligáza	2 μ l
Celkový objem	10 μ l

Mikrozkušavky jsem vložila do termocykleru na následující program:

1)	Zahřívání	16 °C	50 min	} Opakování 20x
2)	Zahřívání	20 °C	3 min	
3)	Zahřívání	24 °C	5 min	
4)	Zahřívání	37 °C	1 min	
5)	Ochlazení	4 °C		

3.2.9.7. HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Příprava 1,5% (w/v) gelu pro elektroforézu:

1. Do 50 ml 1x TAE jsem přidala 0,75 g agarózy a zamíchala v baňce
2. Nastavila jsem mikrovlnku na 1 min a krátce gel povařila, až se agaróza v baňce úplně rozpustila
3. Chvíli jsem nechala chladnout a během toho jsem do baňky přidala 2,5 µl ethidium bromidu
4. Baňku jsem zamíchala a její obsah vylila do formičky na gel
5. Do vybraných míst jsem umístila dva hřebínky a gel nechala ztuhnout

3.2.9.8. IZOLACE FRAGMENTU Z HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÉ ELEKTROFORÉZY

Izolaci fragmentu z horizontální agarózové elektroforézy jsem provedla pomocí kitu GeneJET Gel Extraction Kit. Postupovala jsem podle přiloženého návodu.

1. Gel obsahující požadovaný fragment jsem vyřízla co nejbližší k fragmentu a umístila jsem ho do předem zvážené mikroskopické míchanice
2. Určila jsem hmotnost vyříznutého gelu a přidala jsem stejné množství objemu (1:1 objem:hmotnost) vazebního pufru (Binding Buffer)
3. Nechala jsem inkubovat při 60 °C po dobu 10 min, až se gel rozpustil
4. Přenesla jsem 800 µl rozpuštěného gelu do přiložené kolonky (GeneJET purifikační kolonka). Kolonku jsem umístila do mikroskopické míchanice a centrifugovala jsem (12 000 x g, 5 min, laboratorní teplota)
5. Přidala jsem 700 µl promývacího pufru (Wash Buffer), centrifugovala (12 000 x g, 1 min, laboratorní teplota) a odstranila jsem supernatant
6. Ještě jednou jsem centrifugovala prázdnou kolonku s mikroskopické míchanicí po dobu 1 min (viz bod 5)
7. Kolonku jsem přenesla do nové mikroskopické míchanice a přidala do kolonky 50 µl pufru pro eluaci (Elution Buffer), centrifugovala (12 000 x g, 1 min, laboratorní teplota)
8. Do mikroskopické míchanice se mi při centrifugaci uvolní požadovaný DNA fragment

3.2.9.9. SEKVENACE DNA

Sekvenování proběhlo na servisním pracovišti biologické sekce PřF UK v laboratoři sekvenování. Pro sekvenaci byl přidán specifický primer z plazmidu pCN56 (viz kap. 3.1.8).

3.2.9.10. PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK *E. COLI*

1. Do 25 ml LB média jsem přidala 250 μ l 20% glukózy (w/v) a 125 μ l 2 M $MgSO_4$ (výsledná koncentrace $MgSO_4$ v LB je 10 mM a glukózy 0,2 %)
2. Do připraveného média z bodu 1 jsem naočkovala 0,25 ml kultury kultivované přes noc (viz kap. 3.2.3)
3. Kulturu jsem nechala růst při třepání (180 RPM, 37 °C) do OD_{600} v rozmezí 0,3–0,4
4. Potom jsem buňky přelila do centrifugační kyvety (předchlazené) a zchladila na ledu po dobu 20 min
5. Následně jsem buňky centrifugovala (3200 x g, 10 min, 4 °C)
6. Potom jsem buňky resuspendovala v 0,25 ml LB s přídatkem glukózy a $MgSO_4$ (viz bod 1)
7. K takto resuspendovaným buňkám jsem přidala 2,5 ml uchovávacího média (36% glycerin, 12% PEG 8000, 12 mM $MgSO_4$ v LB médiu, pH 7, sterilizováno filtrací)
8. Objem v centrifugační kyvetě jsem rozdělila po 200 μ l do popsaných mikrozkušavek a uchovávala v hlubokomrazícím boxu v –80 °C

3.2.9.11. PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK *S. AUREUS*

Pro přípravu kompetentních buněk *S. aureus* jsem použila postup popsaný v metodách pro genetickou manipulaci *S. aureus* (Schneewind & Missiakas, 2014).

1. Připravila jsem si kulturu kultivovanou přes noc (viz kap. 3.2.3) z kmenů, ze kterých jsem připravovala kompetentní buňky
2. Tuto kulturu jsem zředila 1:100 do 10 ml vytemperovaného TSB média
3. Nechala jsem kultivovat do OD_{600} přibližně 0,5 (34 °C, RPM: 180)
4. Kulturu jsem potom slila do centrifugačních kyvet a centrifugovala (5000 x g, 15 min, laboratorní teplota)
5. Odstranila jsem supernatant a pelet jsem resuspendovala v 5 ml vychlazené 0,5 M sacharózy (připravené v deionizované vodě)
6. Centrifugovala jsem (8000 x g, 10 min, 4 °C)
7. Odstranila jsem supernatant a poté rozpustila buněčný pelet v 2,5 ml vychlazené 0,5 M sacharózy
8. Opět jsem centrifugovala (8000 x g, 10 min, 4 °C)
9. Opakovala jsem krok 7 a 8
10. Nakonec jsem buňky resuspendovala v 300 μ l vychlazené 0,5 M sacharózy

11. Objem v centrifugační kyvetě jsem rozpipetovala po 100 μ l do označených mikrozkuvek a uchovávala v -80 $^{\circ}$ C

3.2.9.12. TRANSFORMACE PLAZMIDU DO KOMPETENTNÍCH BUNĚK *E. COLI*

1. Kompetentní buňky (viz kap. 3.2.9.10) jsem přemístila z hlubokomrazícího boxu do krabice s ledem. K buňkám na ledu jsem napipetovala příslušné množství plazmidu (0,1–1 μ g plazmidové DNA)
2. Nechala jsem stát na ledu po dobu 20 min
3. Potom jsem mikrozkuvku umístila na 2 min do termobloku rozehrátém na 42 $^{\circ}$ C
4. Mikrozkuvku jsem poté umístila na 9 min do ledu
5. Potom jsem přidala 1 ml čerstvého LB média a nechala růst při 37 $^{\circ}$ C po dobu 1 hodiny
6. Následně jsem buňky zamíchala na vortexu a vysela 100 μ l na LB médium s ATB, zbytek v mikrozkuvce jsem zcentrifugovala (3200 x g, 10 min, laboratorní teplota), odebrala supernatant, aby zbylo 100 μ l, a toto množství jsem opět zamíchala na vortexu a vysela na další LB médium s ATB
7. Transformanty na LB médiu jsem nechala přes noc růst v termostatu při 34 $^{\circ}$ C

3.2.9.13. ELEKTROPORACE PLAZMIDU DO KOMPETENTNÍCH BUNĚK *S. AUREUS*

Pro elektroporaci *S. aureus* jsem použila postup popsany v metodách pro genetickou manipulaci *S. aureus* (Schneewind & Missiakas, 2014).

1. Kompetentní buňky *S. aureus* (viz kap. 3.2.9.11) jsem na ledu nechala částečně rozmrazit a potom k nim napipetovala 1 μ l vyizolovaného plazmidu (množství by mělo odpovídat 0,1–1 μ g plazmidové DNA)
2. Obsah mikrozkuvky (cca 100 μ l) jsem napipetovala do elektroporační kyvety (0,1 cm), stále jsem uchovávala na ledu
3. Elektroporátor jsem nastavila na následující parametry:
Napětí – 2,5 kV, Odpor – 100 Ω , Kapacita – 25 μ F
Po nastavení jsem aplikovala na kyvetu s buněčnou suspenzí elektrický puls
4. Okamžitě jsem do kyvety přidala 1 ml TSB, obsah jsem přenesla do mikrozkuvky a nechala 1 hodinu růst při 34 $^{\circ}$ C
5. Po jedné hodině jsem 100 μ l vysela na TSB média s příslušným antibiotikem, na které jsem selektovala

3.2.10 Práce s bakteriální RNA

3.2.10.1. IZOLACE BAKTERIÁLNÍ RNA

Izolaci RNA z buněk odebraných v průběhu křivky hynutí (viz kap. 3.2.7) jsem provedla kitem (MagJET RNA Kit, viz kap. 3.1.9) a postup jsem modifikovala oproti postupu doporučeného výrobcem

1. Do mikrozkušavky s buňkami (viz kap. 3.2.7) jsem přidala 100 μl beznukleázové vody. Obsah jsem napipetovala do třecí misky s tloučkem
2. Pod tekutým dusíkem jsem pomocí tloučku buňky roztřela na prášek
3. Do třecí misky jsem přidala 450 μl lyzačního pufru z příslušného kitu a obsah třecí misky jsem nechala trochu rozmraznout, abych ho mohla přepipetovat do nové čisté mikrozkušavky
4. K rozbitým a zlyzovaným buňkám jsem přidala 40 μl MagJet Magnetic Beads (magnetických kuliček, na které se váže RNA), zamíchala na vortexu a přidala 400 μl 96% (v/v) ethanolu
5. Potom jsem umístila mikrozkušavku do magnetického stojánku a po 1 min odsála supernatant
6. Přidala jsem 200 μl 1x reakčního pufru pro DNázu I (180 μl beznukleázové vody a 20 μl 10x reakčního pufru pro DNázu I s MgCl_2) a 5 μl DNázy I. Vzorek jsem inkubovala 15 min v 37 °C za současného míchání v termobloku
7. Potom jsem přidala 200 μl 96% (v/v) ethanolu a promíchala na vortexu
8. K tomu jsem napipetovala 700 μl promývacího roztoku 1 (Wash buffer 1). Důkladně jsem promíchala na vortexu a krátce centrifugovala (short spin). Vzorek jsem umístila do magnetického stojánku, po 1 min jsem odstranila supernatant
9. Následně jsem 2x promývala v 700 μl promývacího roztoku 2 (Wash buffer 2). Důkladně jsem promíchala na vortexu a krátce centrifugovala (short spin). Vzorek jsem umístila do magnetického stojánku, po 1 min jsem odstranila supernatant
10. Vzorky jsem nechala chvíli sušit, aby se odstranily zbytky ethanolu
11. Přidala jsem 100 μl beznukleázové vody, zamíchala jsem na vortexu a potom inkubovala 5 min při 60 °C za současného míchání v termobloku
12. Mikrozkušavky jsem umístila do magnetického stojánku, po 1 min jsem supernatant přemístila do nových sterilních mikrozkušavek a ihned přidala 1 μl inhibitoru RNáz (RiboLock 20 U/ μl)

- Co nejrychleji jsem vzorky zamrazila v tekutém dusíku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při této teplotě je uchovávala v hlubokomrazícím boxu

3.2.10.2. PŘEVOD RNA NA cDNA

- 20 μl vyizolované RNA (viz kap. 3.2.10.1.1) jsem použila na převedení na cDNA, která je potřeba jako templát pro qPCR. K 20 μl RNA jsem přidala 2 μl Random hexamer primerů a nechala inkubovat 5 min při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$
- K 22 μl RNA s primery z bodu 1 jsem potom přidala 8 μl pufru pro reverzní transkriptázu (5x koncentrovaný), 0,8 μl dNTP mix (10mM), 1 μl inhibitoru RNázy (20 U/ μl) a 6,2 μl beznukleázové vody
- Na termocykleru jsem si nastavila program:

Zahřívání	25 $^{\circ}\text{C}$	5 min
Zahřívání	25 $^{\circ}\text{C}$	10 min
Průběh reverzní transkripce	42 $^{\circ}\text{C}$	1 hodina
Ukončení reverzní transkripce	70 $^{\circ}\text{C}$	10 min

Po uplynutí prvních 5 min jsem termocykler otevřela a do zkumavek jsem přidala **0,2 μl RT enzymu** (Maxima H reverzní transkriptáza)

- Kvalitu cDNA jsem ověřila pomocí horizontální gelové elektroforézy

3.2.11 Kvantitativní polymerázová reakce (qPCR)

- Pro kvantitativní RT PCR jsem použila komerční kit Luna Universal qPCR Master Mix. Do dvou mikrozkušavek jsem si připravila dva premixy – jeden s referenčními primery *gyrB*, druhý se sledovanými primery *sigB*. Pro jeden templát měl premix následující složení:

Komerční kit Luna	10 μl
Primer F (<i>gyrB</i> , <i>sigB</i>)	1 μl
Primer R (<i>gyrB</i> , <i>sigB</i>)	1 μl
Beznukleázová voda	3 μl
Celkový objem	15 μl

- Premixy jsem rozpipetovala do destičky pro qPCR po 15 μl a do každé jamky jsem přidala 5 μl templátu (v případě kontrolní reakce 5 μl beznukleázové vody)
- Destičku jsem zalepila folií a krátce zcentrifugovala na Centrifuge 5430 (Eppendorfy)

4. Destičku jsem vložila do Real-time PCR cykleru IQ5 (BioRad), kde jsem spustila následující program:

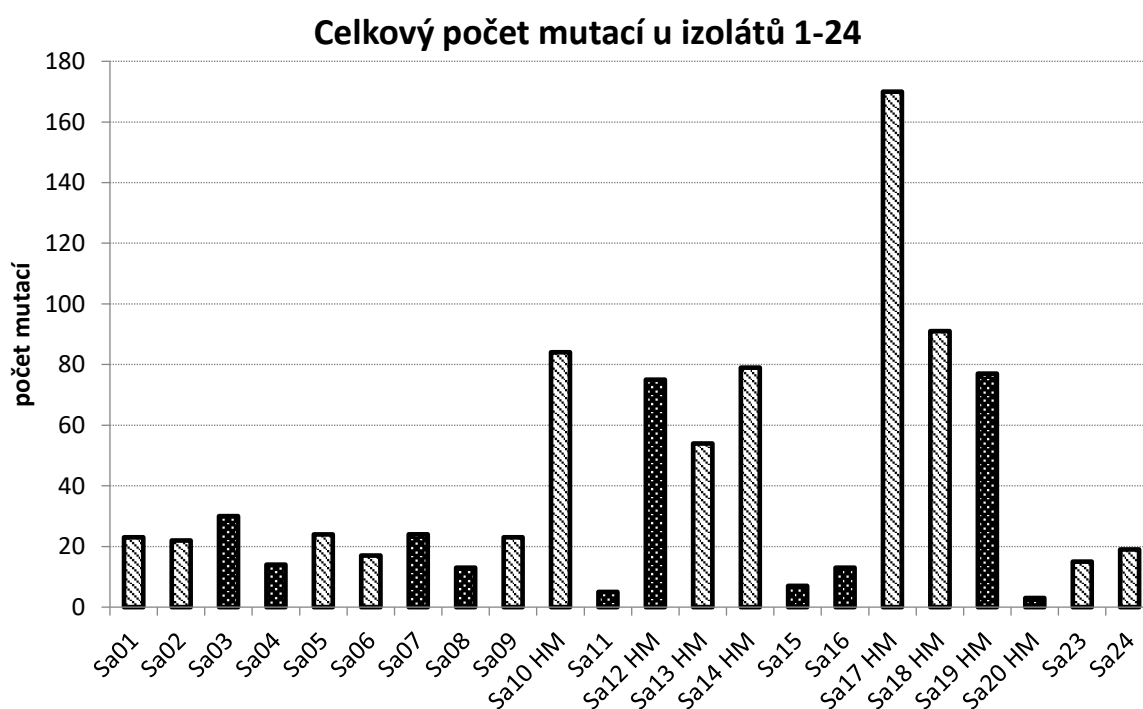
Úvodní denaturace	94 °C	10 min	
Denaturace	94 °C	10 s	} Opakování 42x
Nasednutí primerů	52 °C	10 s	
Prodlužování primerů	72 °C	25 s	
Hybridizace	72 °C	1 min	
High resolution melting analýza: Denurační analýza (křivka)			
Kontinuální zvyšování teploty na 70 °C		70x 10 s	

4 VÝSLEDKY

4.1 Fenotypová korelace s genotypem jednotlivých izolátů

Cíl: Porovnat fenotyp a genotyp jednotlivých izolátů, zaměřit se na mutace v kandidátních genech sigB a agr a vybrat vhodné dvojice pro podrobnější experimenty.

Pro svou diplomovou práci jsem využívala údaje ze sekvenace, která byla provedena v MBÚ AV ČR s.r.o. Všech 24 izolátů *S. aureus* (viz kap. 3.1.1) bylo na tomto pracovišti osekvenováno, a přitom byly identifikovány mutace lišící se v porovnání s nejbližším klonálním předkem, určeným podle MLST (Multi Locus Sequence Typing) i *spa* genotypizace. Mutace se i v rámci dvojice odlišovaly, i když by mělo jít o klonální dvojice stejných *spa* typů, a i podle MLST typizace se příbuznost dvojice potvrdila. Nejvíce mutací se po sekvenaci našlo u izolátu 17, nejméně pak u izolátu 20 (viz graf č. 1). Izoláty č. 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19 a 20 byli tzv. hypermutátoři, kteří mají porušený jeden nebo více genů kódující systém na opravu mutací v DNA (mismatch repair system). Tyto izoláty jsem vyloučila z následných podrobnějších studií.



Graf č. 1: Počet mutací srovnáním k nejbližšímu společnému předku u izolátů 1–24 vycházející ze sekvenace MBÚ AV ČR s.r.o, HM (*S. aureus* izoláty 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20) jsou hypermutátorové kmeny. Dvojice jsou odlišeny šrafováním.

Ve své práci se ve stanovení křivek hynutí a v testování membránového potenciálu zaměřím na dvojice izolátů 1, 2 dále 5, 6, případně 23, 24. Jak je ukázáno v tabulce 2, izolát 1

má substituční mutaci v genu *agrC* (vedoucí k záměně glycinu za serin), izolát 2 má nonsense mutaci v genu *agrB* (viz kap. 2.3.2) a *clpX*, podjednotce proteázy, izolát 5 obsahuje deleční mutaci v *rsbV*, jehož produkt kontroluje aktivitu SigB faktoru (viz kap. 2.3.1), naproti tomu klinický izolát 6 tuto mutaci neobsahuje. Izolát 24 má mutaci v genu *mcsB* kódující protein, který cílí proteiny k degradaci, izolát 23 tuto mutaci neobsahuje.

	Sa01	Sa02	Sa05	Sa06	Sa23	Sa24
<i>clpC</i>	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	39PT (McsB)
<i>clpP</i>	b.r.	b.r. (ClpX)	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.
<i>mazF</i>	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.
<i>mazE</i>	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.
<i>sigB</i>	b.r.	b.r.	64delVG (RsbV)	b.r.	b.r.	b.r.
<i>relA</i>	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.
<i>agrABCD</i>	379GS (AgrC)	83stop (AgrB)	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.
<i>obg</i>	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.
<i>rnall</i>	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.
<i>sarA</i>	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.	b.r.

Tabulka č. 2: Výskyt mutací v kandidátních genech vztahujících se k perzistenci (v genech pro Agr systém – modře, v genu pro regulátor SigB – růžově) u vybraných izolátů, ClpX je podjednotka proteázy ClpP, McsB argininová kináza cílící proteiny k degradaci; b.r. znamená bez rozdílu ke klonálnímu předku

Každý z 24 izolátů vykazoval různý fenotyp, především barva kolonií byla od bílé (například u izolátu 5 a 7), přes různé odstíny žluté až do oranžova. I v rámci dvojice se barva kolonií lišila (viz tabulka č. 3). Izolát 11 vytvářel přes noc v tekutém médiu agregáty. Na agaru i některé další izoláty (9, 15, 16, 20, 21 a 22) vytvářely agregované kolonie, což znesnadňovalo nabírání kultury bakteriální kličkou a roztěr po agaru.

izolát	barva mycelia na BHI	tvorba agregátů	izolát	barva mycelia na BHI	tvorba agregátů
1	bílá	Ne	13	žlutá	Ne
2	bílá	Ne	14	žlutá	Ne
3	světle žlutá	Ne	15	světle žlutá	Ano
4	světle žlutá	Ne	16	bílá	Ano
5	bílá	Ne	17	světle žlutá	Ne
6	světle žlutá	Ne	18	světle žlutá	Ne
7	bílá	Ne	19	žlutá	Ne
8	žlutá	Ne	20	žlutá	Ano
9	bílá	Ano	21	žlutá	Ano
10	bílá	Ne	22	žlutá	Ano
11	světle žlutá	Ano (i v tekutém médiu)	23	bílá	Ne
12	žlutá	Ne	24	bílá	Ne

Tabulka č. 3: Barvy mycelia jednotlivých izolátů a jejich schopnost agregace

4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) klinických izolátů

Cíl: Stanovit MIC všech 24 klinických izolátů.

Pro další pokusy bylo potřeba stanovit MIC pro vybraná antibiotika u všech klinických izolátů. Pro stanovení MIC jsem použila komerční sadu Microlatest (postup v kap. 3.2.4). Hodnoty MIC jsem zaznamenala do tabulky (viz tabulka č. 4). Stanovení MIC jsem provedla i pro MRSA izoláty 21 a 22, u kterých se potvrdila rezistence k oxacilinu a zároveň byla nalezena i jejich rezistence k ciprofloxacinu. K ciprofloxacinu byl podle stanovené MIC rezistentní i izolát 23. Izoláty 19 a 20 byly rezistentní ke gentamicinu. Ostatní izoláty byly ke všem testovaným antibiotikům citlivé.

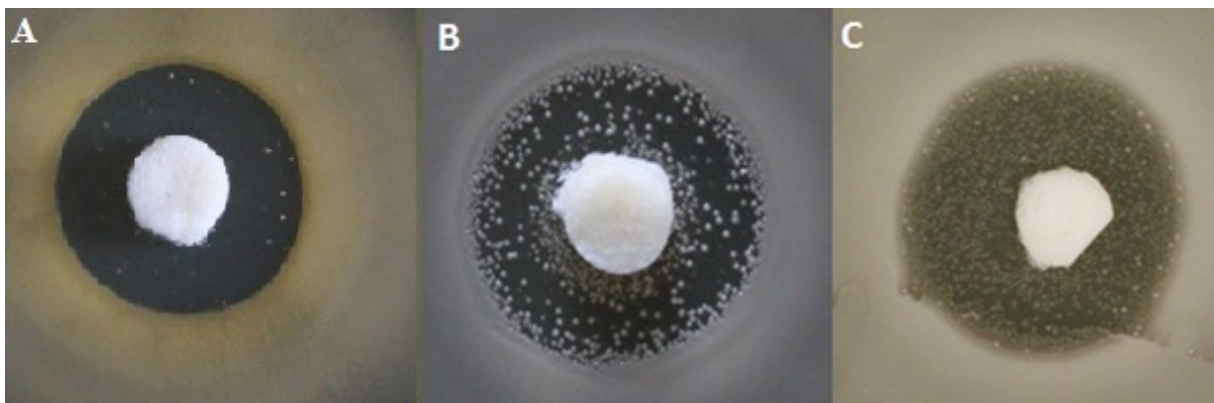
Izolát	Ciprofloxacin (µg/µl)	Gentamicin (µg/µl)	Oxacilin (µg/µl)	Vankomycin (µg/µl)
1	1,00	0,5	0,5	1
2	1,00	1	0,5	1
3	1 až 2	0,5	0,25	1
4	0,50	0,5	0,25	1
5	1,00	0,5	0,25	1
6	1,00	0,5	0,5	2
7	1,00	0,5	0,25	2
8	0,25	0,5	0,25	1
9	> 4	2	1	1
10	> 4	0,5	0,5	2
11	0,25	0,5	0,5	1
12	0,25	0,75	0,5	1
13	2,00	1	0,5	1
14	2,00	1	0,5	1
15	1,00	0,5	0,25	1
16	1,00	0,5	0,12	1
17	1,00	0,5	0,5	1
18	1,00	0,5	0,12	1
19	1,00	>32	0,5	1
20	1,00	>32	0,5	1
21	>8	1	>256	1
22	>8	1	>256	1
23	>8	0,5	0,5	1
24	4,00	0,5	0,5	1

Tabulka č. 4: Hodnoty MIC klinických izolátů 1–24

4.3 Provedení TD testu

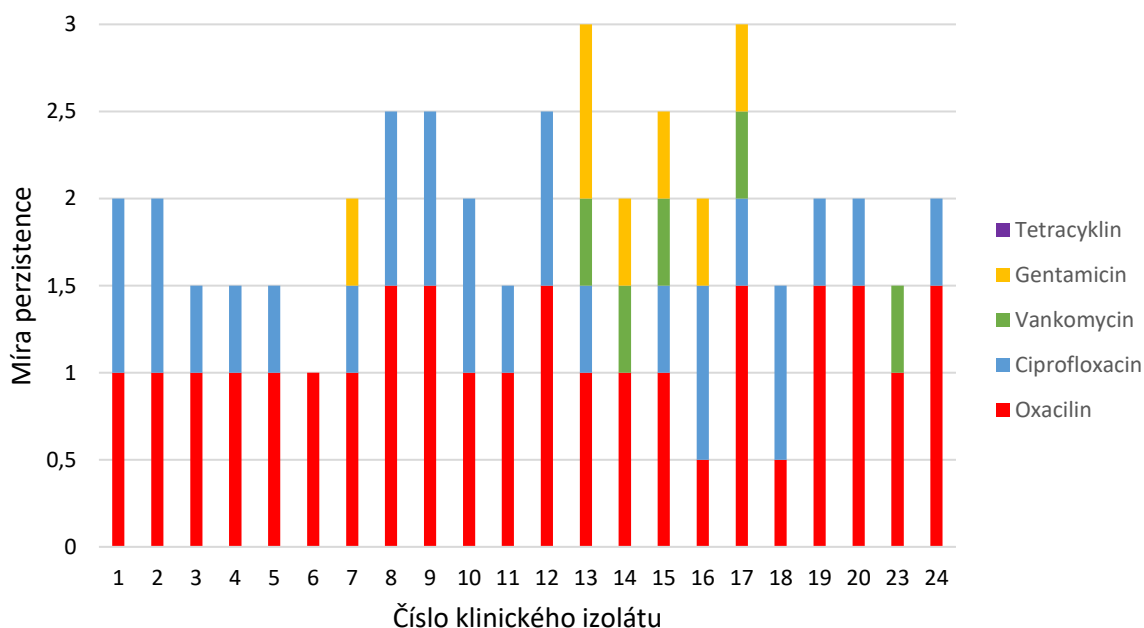
Cíl: TD testem orientačně otestovat 22 izolátů na schopnost perzistovat po působení antibiotik ciprofloxacinu, gentamicinu, oxacilinu, tetracyklinu a vankomycinu.

Na schopnost perzistovat jsem použitím TD testu (Gefen et al. 2017) otestovala 22 izolátů (nepracovala jsem s MRSA izoláty 21 a 22) (viz kap. 3.2.5). Tento test dosud nebyl použit u *S. aureus*, nicméně jsem zjistila, že i u této bakterie se dá perzistence TD testem sledovat. Zároveň jsem se pokusila množství perzisterů kvantifikovat (viz obrázek č. 14). Při kvantifikaci jsem se řídila publikací Gefen a jejích spolupracovníků (2017), kdy nízká perzistence znamená jedna až deset kolonií v inhibiční zóně, střední představuje deset až několik stovek kolonií a u silné perzistence kolonie zcela pokrývají inhibiční zónu (Gefen et al. 2017). Nejvíce perzisterů u všech kmenů vyrostlo na antibiotikum oxacilin, v podstatě každý izolát vykazoval určitou perzistenci k oxacilinu. Ciprofloxacin se jevil jako druhý v pořadí co se týče množství perzisterů, u sedmi izolátů (1, 2, 8, 9, 10, 12, 18) jsem jejich nárůst vyhodnotila tak, že se jedná o střední perzistery, u izolátu 23 byla inhibiční zóna nezřetelná (šlo o izolát rezistentní k ciprofloxacinu). Nejvíce perzistentní na gentamicin se mi jevil izolát 13, na vankomycin 23, jinak však byla perzistence na tato dvě antibiotika poměrně nízká. Dalším testovaným antibiotikem byl tetracyklin, na který jsem žádné perzistery nepozorovala. Výsledky vychází jen z jednoho biologického replikátu.



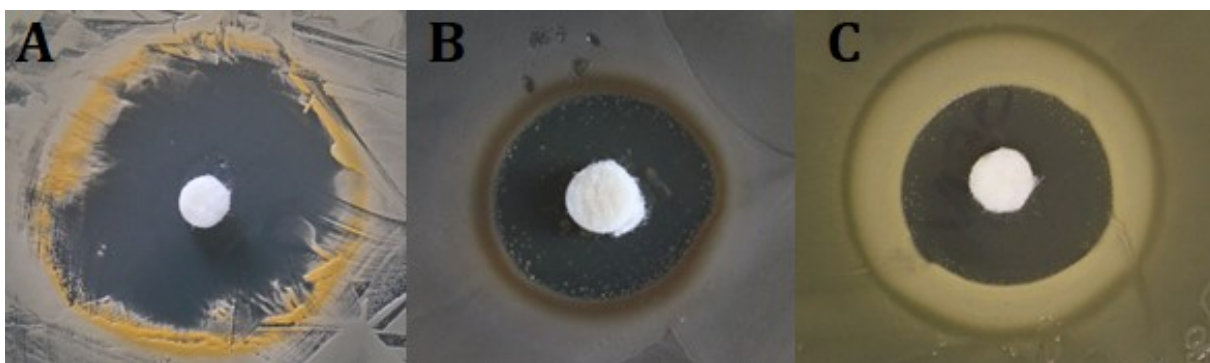
Obrázek č. 14: Různá míra perzistence u vybraných izolátů: (A) izolát 15 pro ciprofloxacin jako příklad **slabé perzistence**, (B) izolát 1 pro oxacilin jako příklad **střední perzistence**, (C) izolát 24 pro oxacilin jako příklad **silné perzistence**.

Výsledky TD testu jsem shrnula do výsledného grafu (viz graf č. 2). Míra perzistence je zde hodnocena subjektivně, slabé perzistenci bylo přiděleno číslo 0,5, střední 1 a silné 1,5. Graf č. 2 ukazuje, že míra perzistence se v rámci klonální dvojice někdy liší, jindy nikoliv a nelze jednoznačně říct, že by zvýšená perzistence k jednomu antibiotiku znamenala zvýšenou míru perzistence i k dalším antibiotikům. Perzistenci k více antibiotikům jsem pozorovala u izolátů 13, 17, které byly hypermutátory.



Graf č. 2: Shrnutí výsledků TD testu u 22 klinických izolátů, slovně vyjádřená míra perzistence je zde převedena na číselné hodnoty: slabá perzistence = 0,5, střední perzistence=1, silná perzistence=1,5.

Poměrně zajímavým jevem, který jsem při provedení TD testu pozorovala, bylo různě zbarvené okolí inhibiční zóny. Může mít barvy od zářivě bílé až po hnědou (viz obrázek č. 15), kdy k úplnému zbarvení kolem inhibičních zón dochází až po 48 hodinách. Jeden kmen může vykazovat vznik různě zbarvené inhibiční zóny na různá antibiotika. Tento jev může souviset s indukcí obecné stresové odpovědi na antibiotikum (viz diskuze).



Obrázek č. 15: Různě zbarvení okolí inhibičních zón: A) izolát 4 na tetracyklin, B) izolát 7 na oxacilin, C) izolát 17 na gentamicin.

4.4 Stanovení křivek hynutí po působení antibiotik pro dvojice izolátů – 1, 2; 5, 6 a 23, 24

Cíl: Stanovit křivky hynutí po působení vybraných antibiotik a určit podle nich míru schopnosti perzistovat, výsledky porovnat s předchozím TD testem.

V této části diplomové práce jsem stanovila křivky hynutí v exponenciální fázi růstu v BHI médiu v časech 1–5 hodiny po působení různých antibiotik (viz kap. 3.2.6). Stejně jako v předchozí diplomové práci L. Kubištové (Kubištová, 2015) jsem zvolila metodu kapkového výsevu, která však u mých klinických izolátů nešla použít, protože bakterie v kapkových výsevech nerostly. Proto jsem nakonec přistoupila ke klasickému stanovení CFU roztěrem kultury na celou plochu média; rozdíl nárůstu bakterií mezi kapkovým výsevem a celoplošným roztěrem byl více než jeden řád. Všechny pokusy jsem provedla ve třech biologických replikátech.

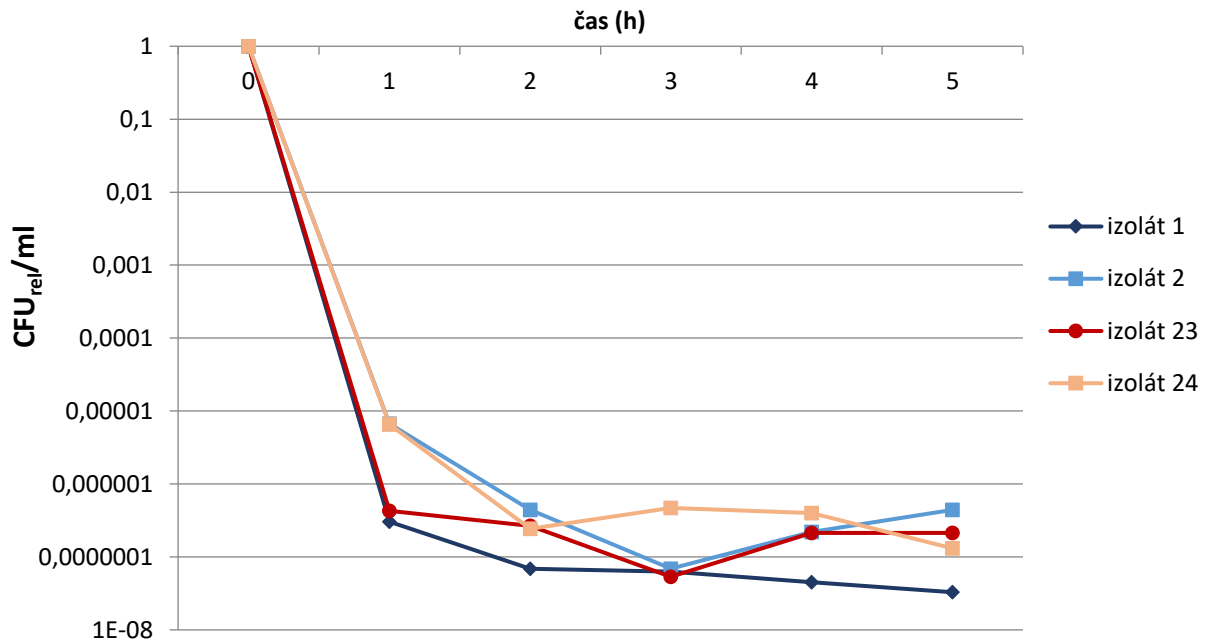
Aby bylo možné porovnávat jednotlivé biologické replikáty, hodnoty CFU jednotlivých vzorků jsem vztáhla na CFU kontroly (čas T_0 před přidání antibiotik) podle vzorce:

$$CFU_{rel} = \frac{CFU_{T_1-T_5}}{CFU_{T_0}}$$

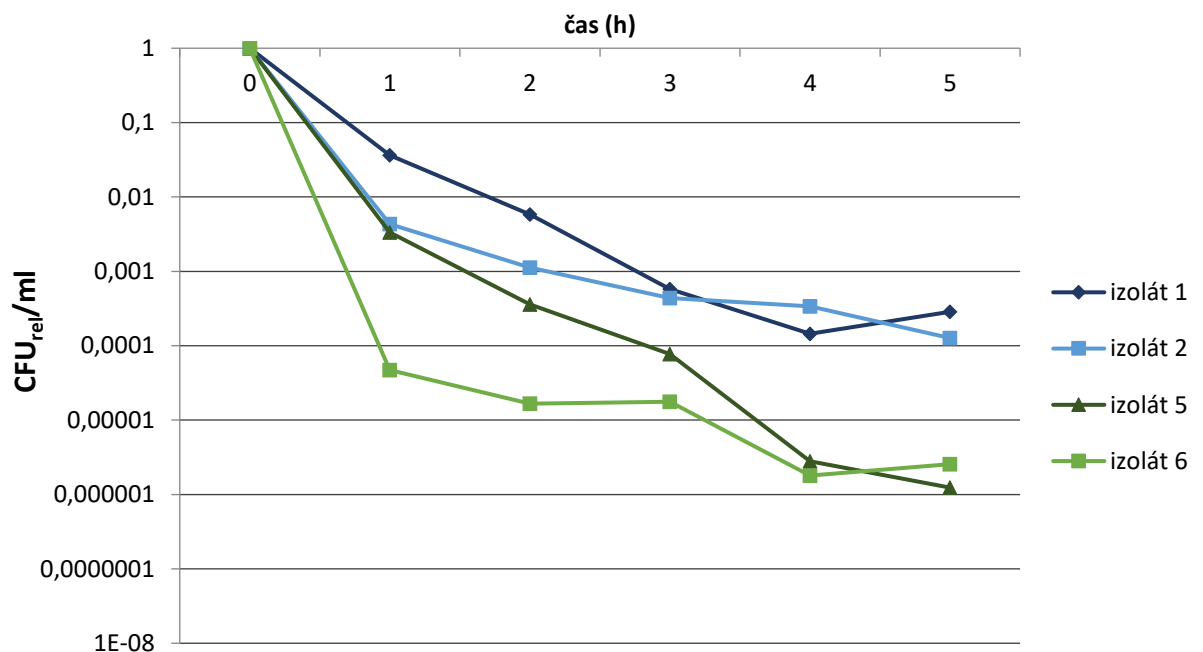
Pro stanovení křivek hynutí jsem vybrala různé druhy antibiotik, které se běžně používají na léčbu stafylokokových infekcí. Jedná se o fluorochinolonové antibiotikum ciprofloxacin (použita 100x MIC), aminoglykosid gentamicin (použita 10x i 100x MIC), β -laktamové antibiotikum oxacilin (použita 100x MIC) a glykopeptidové antibiotikum vankomycin (použita 100x MIC). U dvojice 5 a 6 nebyl otestován gentamicin, protože množství perzisterů na toto antibiotikum bylo velmi nízké a naší metodou nedetekovatelné, u dvojice 23 a 24 nebyl testován ciprofloxacin, protože izolát 23 k němu byl rezistentní (viz kap. 4.2).

Aby bylo možné srovnat izoláty navzájem, vynesla jsem z výsledků křivek hynutí pro jednotlivá antibiotika samostatné grafy (viz graf č. 3, 4, 5, 6). Dvojice izolátů 1, 2 je podle výsledků křivek hynutí v porovnání s ostatními dvěma dvojicemi nejvíce perzistentní. Následuje dvojice 23, 24 a nejméně perzistentní podle výsledků křivek hynutí se zdá dvojice 5 a 6. Po působení gentamicinu ve výsevech u všech izolátů vyrostlo jen opravdu málo perzisterů (viz graf č. 3). Křivky hynutí u izolátů 1, 2 a 5 po působení ciprofloxacinu

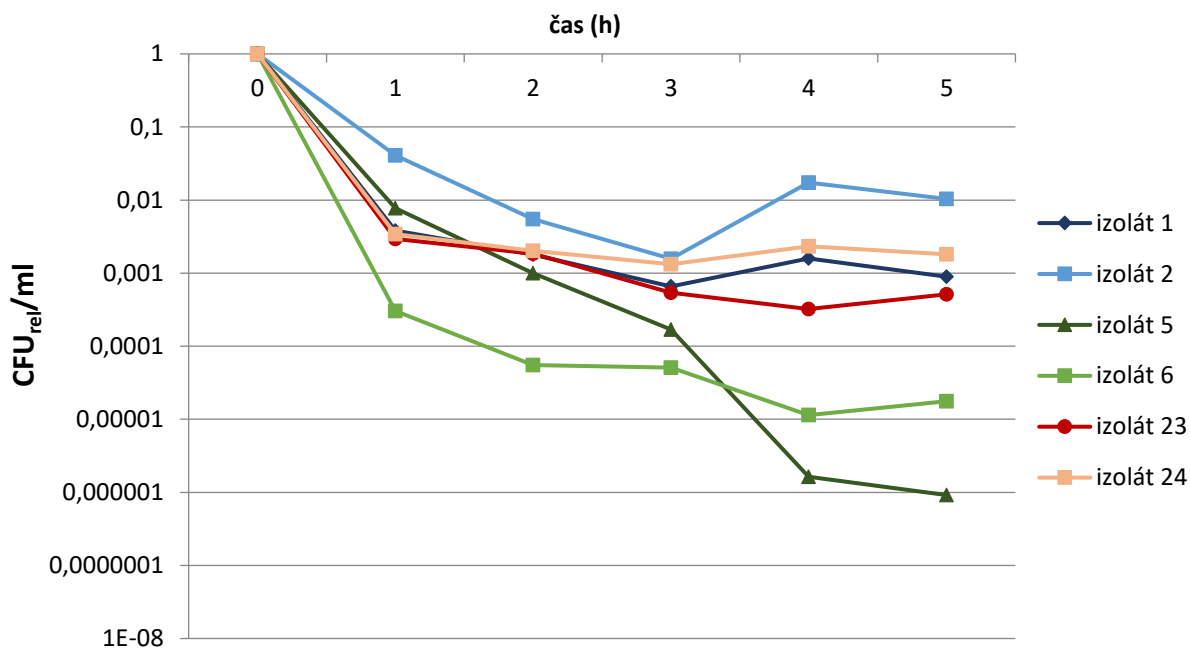
vykazovaly spíše průběh charakteristický pro toleranci (viz graf č. 4). Nejvíce perzisterů vyrostlo po působení 100x MIC oxacilinu (viz graf č. 5), o něco méně však také po působení 100x MIC vankomycinu (viz graf č. 6).



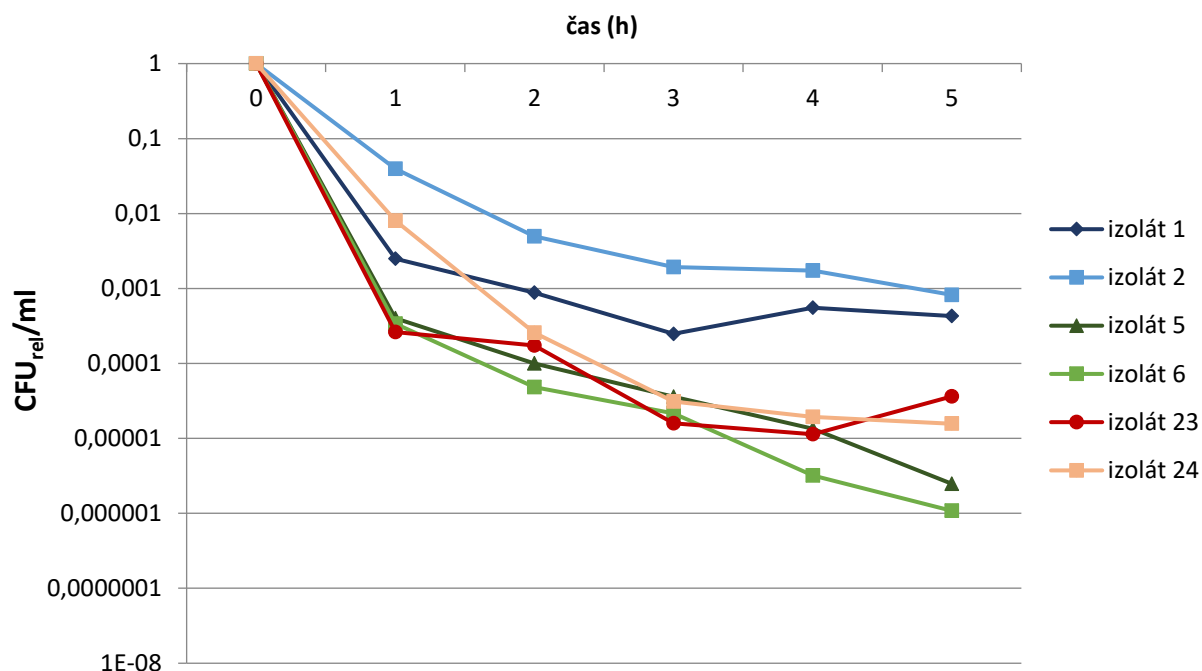
Graf č. 3: Křivka hynutí u izolátů 1, 2, 23, 24 po působení 100x MIC **gentamicinu**. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmicky. Z důvodu přehlednosti nejsou zahrnuty standardní odchylky, ale jsou zahrnuty v obr. 16, 17, 18 ve vynesení pro jednotlivé izoláty.



Graf č. 4: Křivka hynutí u izolátů 1, 2, 5, 6 po působení 100x MIC **ciprofloxacinu**. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmicky. Z důvodu přehlednosti nejsou zahrnuty standardní odchylky, ale jsou zahrnuty v obr. 16, 17, 18 ve vynesení pro jednotlivé izoláty.



Graf č. 5: Křivka hynutí u izolátů 1, 2, 5, 6, 23, 24 po působení 100x MIC **oxacilinu**. Hodnoty na ose y jsou vynesené logaritmicky. Z důvodu přehlednosti nejsou zahrnuty standardní odchylky, ale jsou zahrnuty v obr. 16, 17, 18 ve vynesení pro jednotlivé izoláty.



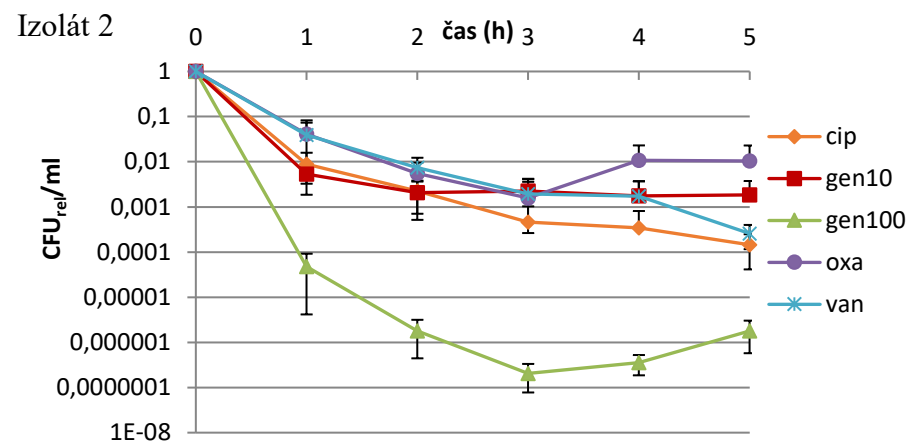
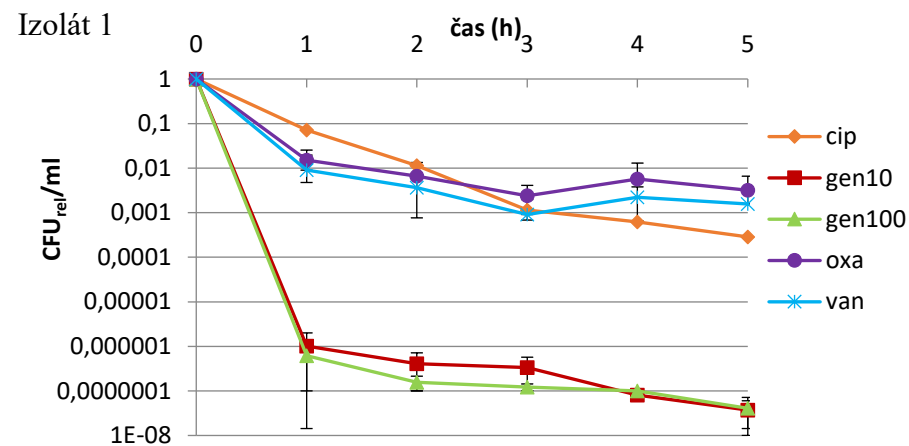
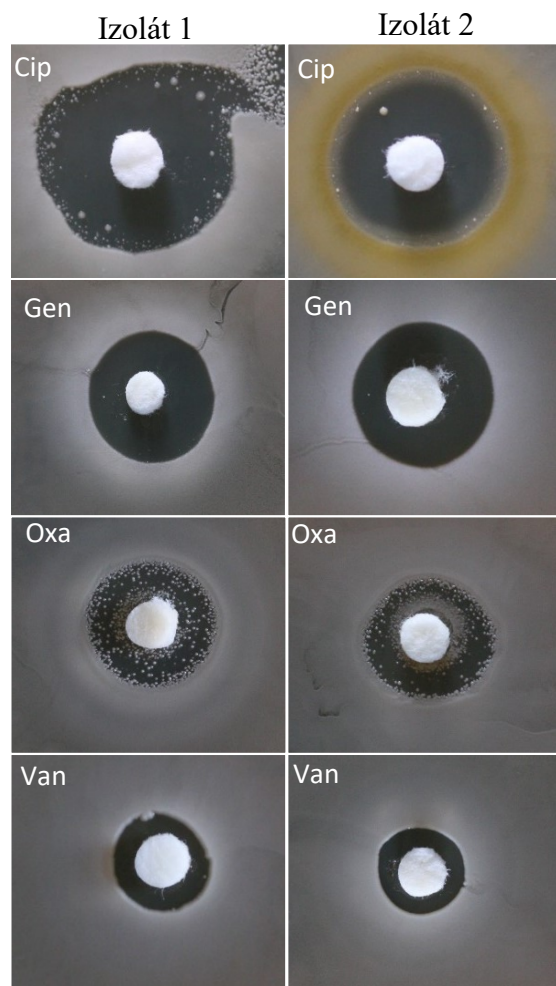
Graf č. 6: Křivka hynutí u izolátů 1, 2, 5, 6, 23, 24 po působení 100x MIC **vancomycinu**. Hodnoty na ose y jsou vynesené logaritmicky. Z důvodu přehlednosti nejsou zahrnuty standardní odchylky, ale jsou zahrnuty v obr. 16, 17, 18 ve vynesení pro jednotlivé izoláty.

Dále jsem se pokusila porovnat výsledky z TD testu s výsledky z křivek hynutí (viz obrázek č. 16, 17, 18). Nejvíce perzisterů jsem u TD testů pozorovala pro antibiotikum oxacilin, což je v souladu s výsledky z křivek hynutí. Poměrně vysoký výskyt perzisterů naznačuje také křivka hynutí pro vankomycin, avšak po provedení TD testu na vankomycin (5 µg) jsem příliš mnoho perzisterů nepozorovala a pokud ano, jednalo se o velmi malé kolonie v okolí inhibiční zóny. Perzisteři někdy nerostli v inhibiční zóně náhodně, ale vyskytovali se především po okrajích inhibiční zóny nebo okolo glukózového disku (viz obrázek č. 16, izolát 2 po působení oxacilinu).

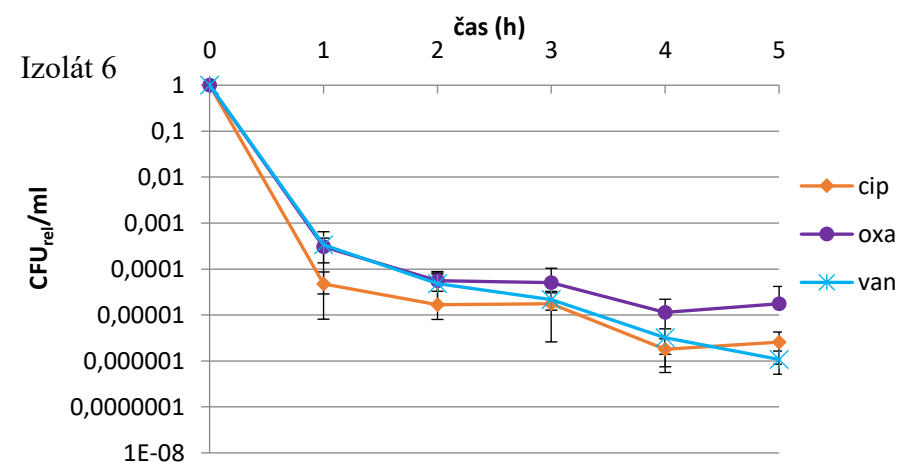
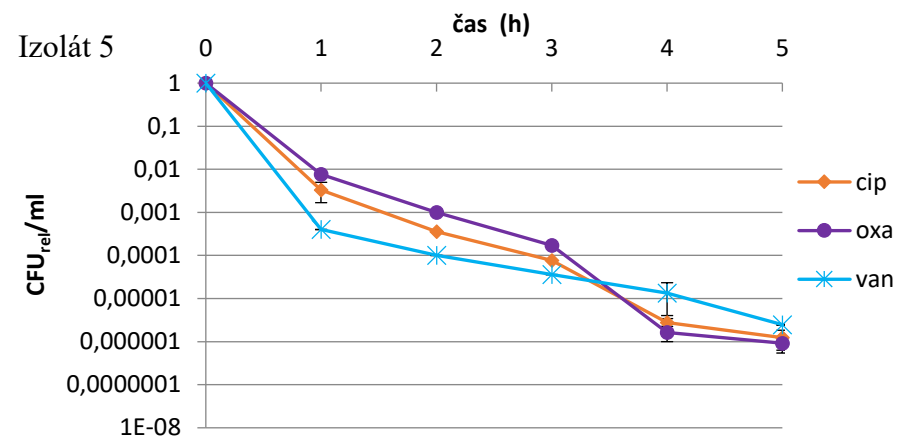
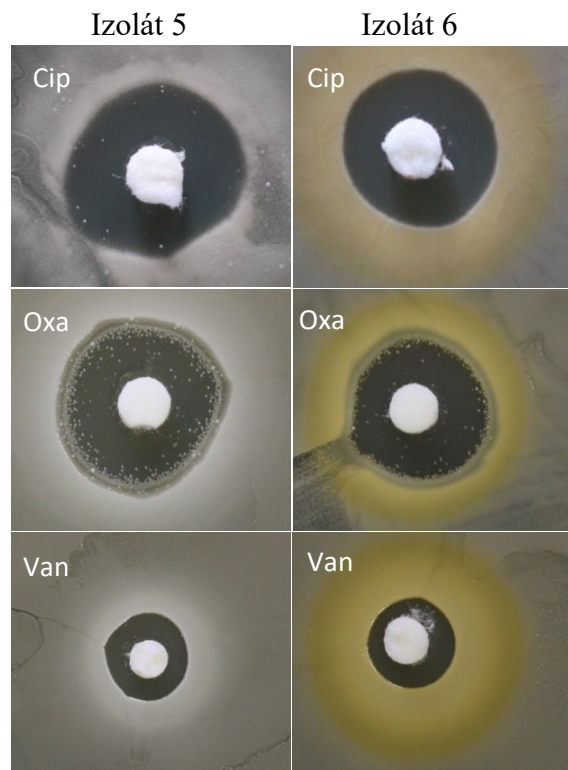
U izolátu 2 došlo v porovnání s jeho klonálním předkem 1 podle TD testů ke zvýšení perzistence k oxacilinu, avšak ke snížení perzistence k ciprofloxacinu (viz obrázek č. 16). Oba izoláty vykazovaly podobné průběhy křivek hynutí, s rozdílem u gentamicinu 10x MIC. Podle výsledků se zdá, že perzistence ke gentamicinu u izolátu 1 není oproti 2 závislá na koncentraci tohoto antibiotika, protože jsou křivky téměř identické. Průběh křivky po působení ciprofloxacinu u izolátu 1 se blížil lineárnímu vynesení, což by nasvědčovalo spíše toleranci.

U izolátu 6 oproti izolátu 5 došlo podle TD testů ke snížení perzistence k ciprofloxacinu i k oxacilinu (viz obrázek č. 17). To se projevilo i na průběhu křivek hynutí, kdy křivky hynutí po působení všech tří antibiotik u izolátu 5 vykazovaly mírnější úbytek v prvních časech odběru než u izolátu 6. Průběh křivek hynutí pro ciprofloxacin a oxacilin u izolátu 5 se opět blížil k průběhu charakteristickému pro toleranci.

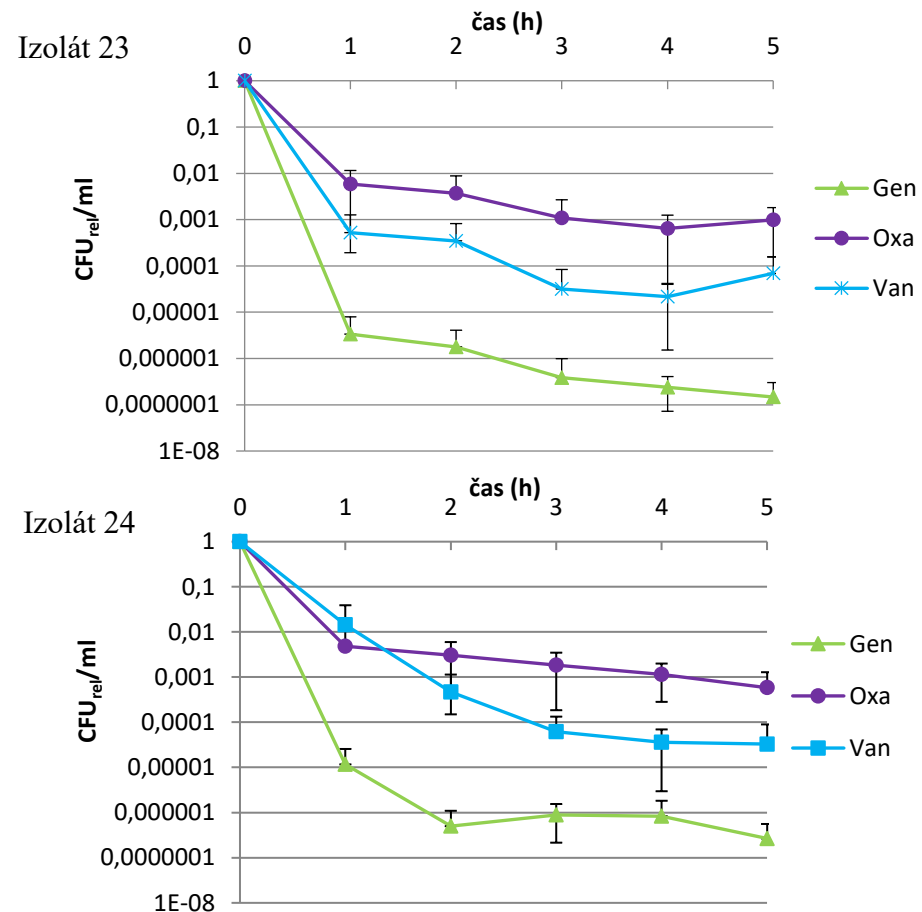
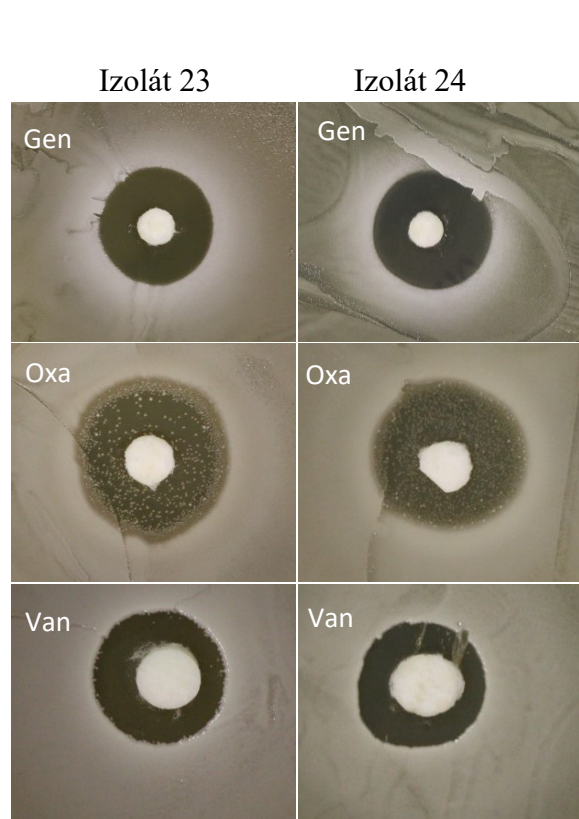
Podle TD testů došlo u izolátu 24 oproti izolátu 23 ke zvýšení perzistence k oxacilinu (viz obrázek č. 18). U této dvojice nebyl testován ciprofloxacin, protože izolát 23 byl k němu rezistentní (viz tab. 3 na straně 57). Po provedení TD testu na ostatní antibiotika jsem žádné perzistery nepozorovala. Průběhy křivek hynutí byly u obou klonálních izolátů 23 a 24 podobné, s výjimkou toho, že se u izolátu 24 pro vankomycin objevil mírnější úbytek bakterií v čase T_1 , v dalších časech už ale byl průběh srovnatelný s izolátem 23.



Obrázek č. 16: Porovnání výsledků TD testů pro ciprofloxacin (10 μ g), gentamicin (10 μ g), oxacilin (1 μ g) a vankomycin (5 μ g) s výsledky křivek hynutí po působení 100x MIC ciprofloxacinu (cip), 10x i 100x MIC gentamicinu (gen10, gen 100), 100x MIC oxacilinu (oxa) a 100x MIC vankomycinu (van) u izolátů **1 a 2**. Chybové úsečky označují standardní odchylky ze tří biologických replikátů. TD testy byly vyhodnoceny 48 hodin od odstranění antibiotického disku.



Obrázek č. 17: Porovnání výsledků TD testů pro ciprofloxacin (10 μ g), oxacilin (1 μ g) a vankomycin (5 μ g) s výsledky křivek hynutí po působení 100x MIC ciprofloxacinu (cip), 100x MIC oxacilinu (oxa) a 100x MIC vankomycinu (van) u izolátů **5 a 6**. Chybové úsečky označují standardní odchylky ze tří biologických replikátů. TD testy byly vyhodnoceny 48 hodin od odstranění antibiotického disku.

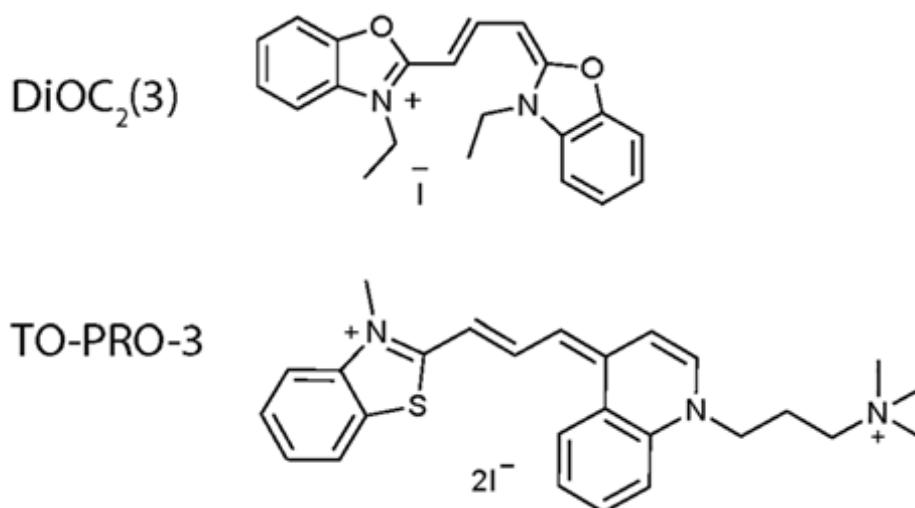


Obrázek č. 18: Porovnání výsledků TD testů pro gentamicin (10 μg), oxacilin (1 μg) a vankomycin (5 μg) s výsledky křivek hynutí po působení 100x MIC gentamicinu (gen), 100x MIC oxacilinu (oxa) a 100x MIC vankomycinu (van) u izolátů **23** a **24**. Chybové úsečky označují standardní odchylky ze tří biologických replikátů. TD testy byly vyhodnoceny 48 hodin od odstranění antibiotického disku.

4.5 Vliv antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu na membránový potenciál v průběhu křivek hnutí u izolátů 1, 2 a 5, 6

Cíl: Posoudit, zda v průběhu křivky hnutí vzniká subpopulace bakterií s nižším membránovým potenciálem a pozorovat, jak se u jednotlivých izolátů projeví působení antibiotik na formování subpopulací.

K pozorování membránového potenciálu jsem použila barvení fluorescenční značkou DioC₂(3) (3,3'-diethyloxakarbokyanin jodid) v kombinaci s DNA-vazebnou molekulou To-Pro-3. Na úrovni struktury molekul obsahuje To-pro-3 oproti DioC₂(3) hydrofilnější kvartérní amin, proto nedokáže proniknout skrz membránu, a současně dva pozitivní náboje, které mu umožňují vázat se na DNA (viz obrázek č. 19). Naproti tomu DioC₂(3) je dostatečně lipofilní na to, aby prošel membránou, a obsahuje jeden kladný náboj, který umožňuje jeho akumulaci v buňce (Shapiro & Nebe von Caron, 2004). DioC₂(3) vykazuje zelenou fluorescenci u buněk s nižším membránovým potenciálem, ale s rostoucím membránovým potenciálem dochází k asociaci molekul DioC₂(3) a tím se jeho fluorescence posouvá k červenému spektru, Z poměru zelené/červené fluorescence potom můžeme určit změny membránového potenciálu u měřených buněk oproti kontrolním vzorkům. To-Pro-3 proniká pouze do buněk s porušenou membránou, kde se následně váže na DNA. Kombinace To-Pro-3 s DioC₂(3) mi tak zároveň umožnila odlišit buňky bez membránového potenciálu s neporušenou membránou a buňky bez potenciálu s permeabilizovanou membránou.



Obrázek č. 19: Chemická struktura molekul DioC₂(3) a To-Pro-3, které jsem použila při měření na průtokovém cytometru (převzato z McAuley et al. 2018).

V tomto experimentu jsem analyzovala klinické izoláty *S. aureus* 1, 2 a 5, 6. V jednotlivých časech křivky hynutí – 1, 2, 3 a 4 hodiny od přidání antibiotika ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu jsem buňky odebrala, centrifugovala a resuspendovala v PBS. Potom jsem je dle návodu obarvila a změřila (postup a podmínky měření viz kap. 3.2.8). Všechna měření jsem provedla v biologickém triplikátu.

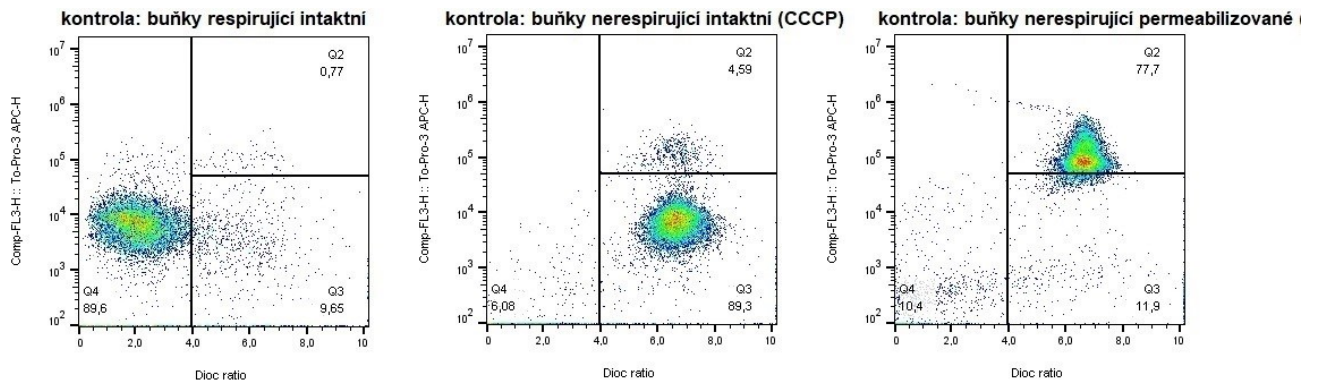
Pro určení kontrolních stavů jsem si připravila buňky s permeabilizovanou membránou (zahřátí buněk na 90 °C po dobu 10 min), buňky nerespirující ale neporušené (přidáním 500μM CCCP k buňkám v čase T₀) a buňky v čase T₀ bez antibiotika pro kontrolní respirující a intaktní populaci.

Výsledky jsem nejprve vyhodnocovala v programu Cytexpert, pro podrobnější rozbor jsem použila program FloJo. V programu FloJo jsem ve vynesení FSC vůči SSC vhodně odlišila subpopulaci buněk od zbytků membrán a proteinů, abych testovala v následujících vyneseních opravdu pouze buňky. Buňky jsem následně analyzovala ve vynesení Dioc ratio vůči To-pro-3 (Novo et al. 2000). Poměr Dioc ratio jsem stanovila následující způsobem:

$$Dioc\ ratio = \frac{zelená\ fluorescence\ DioC_2(3)}{červená\ fluorescence\ DioC_2(3)}$$

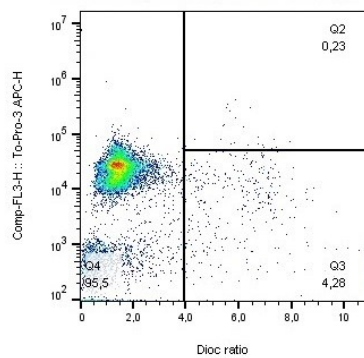
Z uvedeného vztahu vychází, že buňky více respirující, které mají spektrum fluorescence posunuté do červené oblasti spektra, budou mít menší hodnotu Dioc ratio než buňky méně respirující, u nichž bude tato hodnota větší.

Podle kontrol jsem odlišila tři subpopulace buněk – buňky s membránovým potenciálem a intaktní, buňky bez membránového potenciálu a intaktní a buňky bez membránového potenciálu a permeabilizované. Čtvrtou subpopulaci, která by měla představovat buňky s membránovým potenciálem, avšak permeabilizované, jsem neuvažovala, protože z hlediska fyziologie není takový stav možný. Následně jsem ve výše uvedeném vynesení (Dioc ratio vůči To-pro-3) aplikovala rozdělení do tří subpopulací pro časy T₁–T₄ po přidání antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu (viz obrázek č. 20).

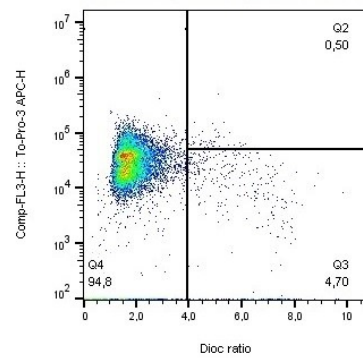


PO PŮSOBNÍ:

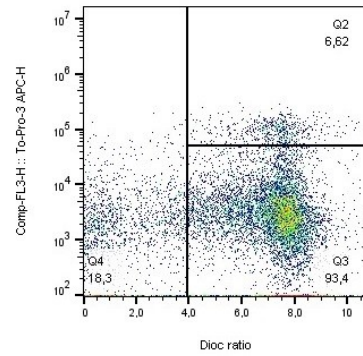
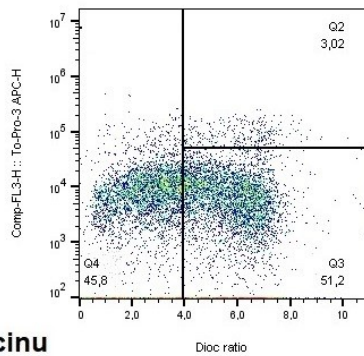
a) ciprofloxacinu čas T1 (1 h od přidání ATB)



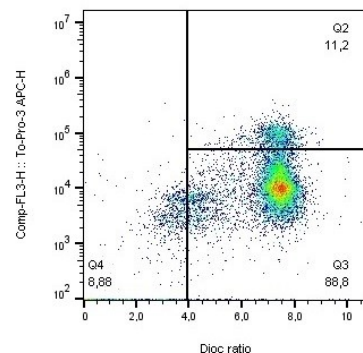
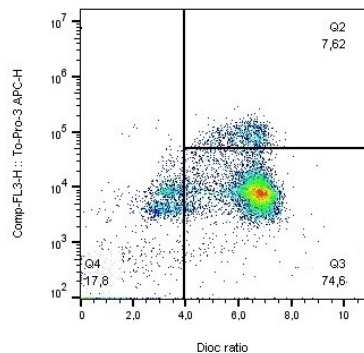
čas T4 (4 h od přidání ATB)



b) oxacilinu



c) vankomycinu

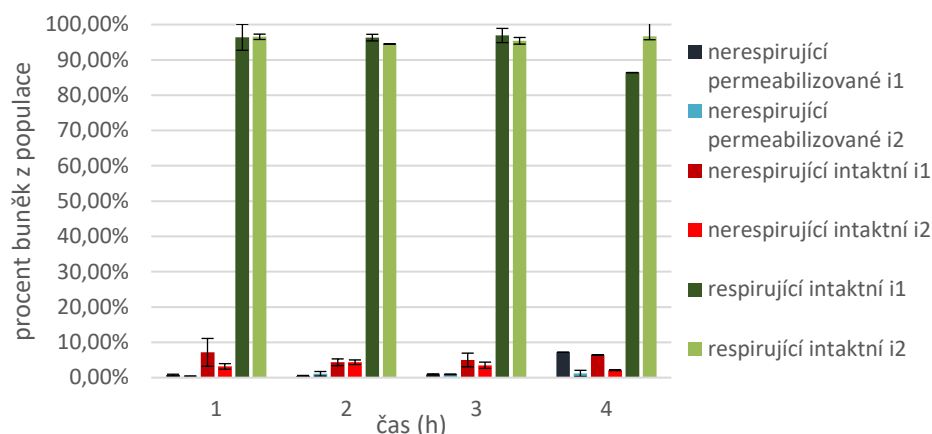


Obrázek č. 20: Ukázka vyhodnocení výsledků z průtokové cytometrie (izolát 2) po působení **a) ciprofloxacinu, b) oxacilinu, c) vankomycinu** ve dvou časech – po 1 hodině (levý sloupec) a po 4 hodinách (pravý sloupec) v porovnání s kontrolami (nahore). Kontrola respirujících intaktních buněk představuje čas T₀ bez působení antibiotika, kontrola nerespirujících permeabilizovaných představuje zahřívání buněk po dobu 10 min na 90 °C. Kontrola nerespirujících intaktních buněk byla provedena přidáním CCCP k buňkám bez antibiotika. Na ose x je vyneseno poměří Dioc ratio, na ose y fluorescence To-pro-3.

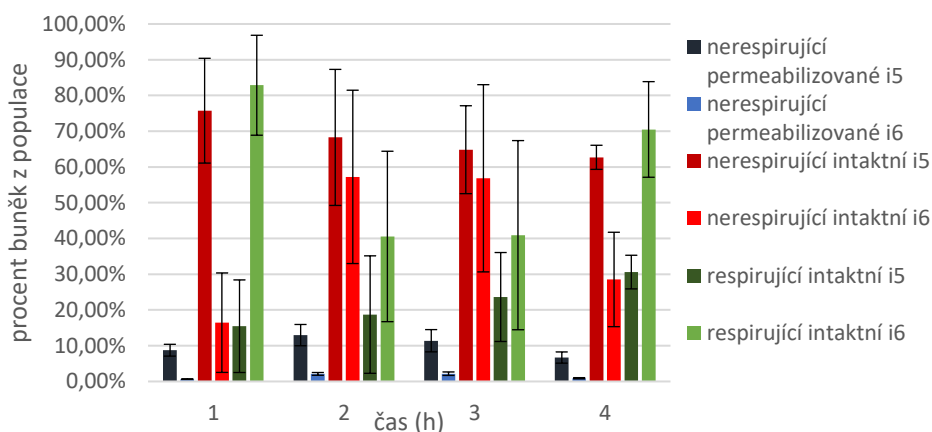
Po působení ciprofloxacinu se v populaci v měřeném časovém intervalu vyskytuje naprostá většina buněk respirujících intaktních (obrázek č. 20a)). Po působení oxacilinu a vankomycinu, což jsou antibiotika působící na buněčnou stěnu (BS), došlo v průběhu působení antibiotik ke snížení membránového potenciálu, což se projevilo posunem do vyšších hodnot Dioc ratio. Po působení oxacilinu docházelo u populace buněk k postupné ztrátě potenciálu a rozvrstvení buněk do všech tří subpopulací s majoritní subpopulací intaktních buněk bez potenciálu (obrázek č. 20 b)). Vankomycin již po jedné hodině působení snížil membránový potenciál ve většině buněk a generoval dvě většinové subpopulace ve vyšších hodnotách Dioc ratio, jednu v oblasti buněk permeabilizovaných, druhou v oblasti intaktních (viz obrázek č. 20 c)).

Abych mohla sledovat, jak se měnilo zastoupení subpopulací v čase a jak velké rozdíly v zastoupení subpopulací jsou mezi klonálními izoláty, vynesla jsem výsledky do grafů. (viz grafy č. 7–12). Po působení ciprofloxacinu u všech čtyřech izolátů (1, 2, 5, 6) zcela převládají respirující intaktní buňky a změny v rámci klonální dvojice i dvojice navzájem jsou téměř zanedbatelné (viz graf č. 7 a 10). Zastoupení subpopulací po působení oxacilinu se v rámci klonální dvojice 1, 2 příliš nelišilo, u klonální dvojice 5, 6 však byly změny zásadnější. U izolátu 5 po 1 hodině působení oxacilinu převládaly buňky nerespirující intaktní, naproti tomu u izolátu 6 respirující intaktní. Zároveň, vzhledem k postupné ztrátě potenciálu po působení oxacilinu, jsem pozorovala významný rozptyl hodnot směrodatných odchylek (viz graf č. 8 a 11). Po působení vankomycinu u všech čtyřech izolátů převládalo zastoupení buněk nerespirujících intaktních, zastoupení ostatních subpopulací se poté u jednotlivých izolátů lišilo. U izolátů 1, 2 a 5 po působení vankomycinu byly druhou nejzastoupenější subpopulací buňky nerespirující permeabilizované, u izolátu 6 spíše respirující intaktní (viz graf č. 9 a 12).

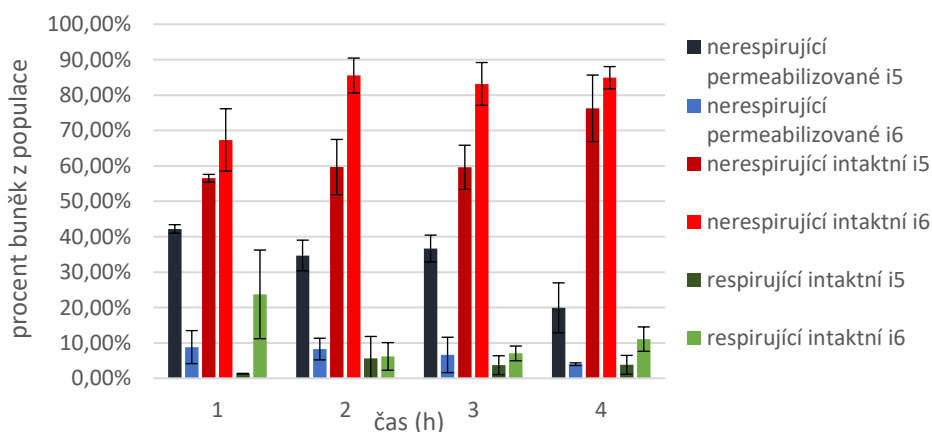
Z vynesných grafů lze vyvodit, že na fyziologický stav buněk má větší vliv použité antibiotikum spíše než genetická podstata izolátu samotného. Různé mechanismy účinku použitých antibiotik mohou vést k heterogenitě fenotypů perzisterů. V rámci klonální dvojice 1, 2 se zastoupení subpopulací příliš nelišilo, u dvojice 5, 6 po působení oxacilinu a vankomycinu jsem však jisté změny pozorovala. Některé adaptační mutace izolátů by mohly přispívat ke změně ve zastoupení subpopulací. K přesnějšímu závěru by bylo potřeba srovnat v tomto experimentu více klonálních dvojic.



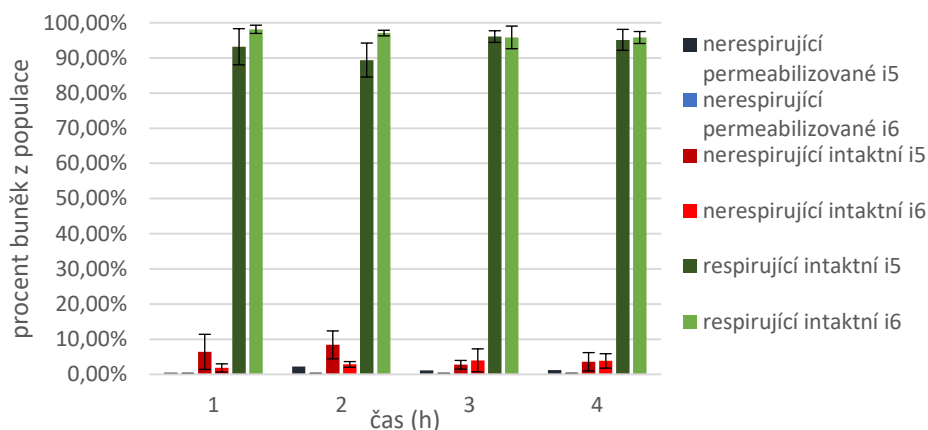
Graf č. 7: Zastoupení buněk v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC ciprofloxacinu u izolátů 1** (tmavší odstín barvy, i1) a **2** (světlejší odstín barvy, i2). Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



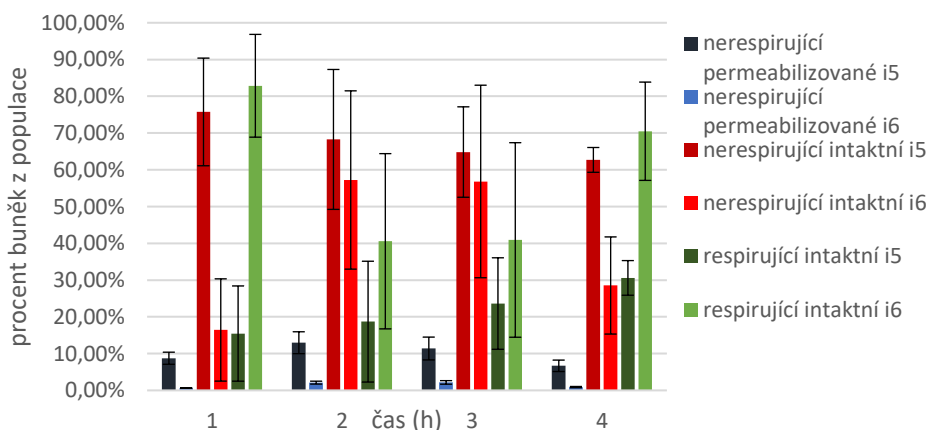
Graf č. 8: Zastoupení buněk v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC oxacilinu u izolátů 1** (tmavší odstín barvy, i1) a **2** (světlejší odstín barvy, i2). Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



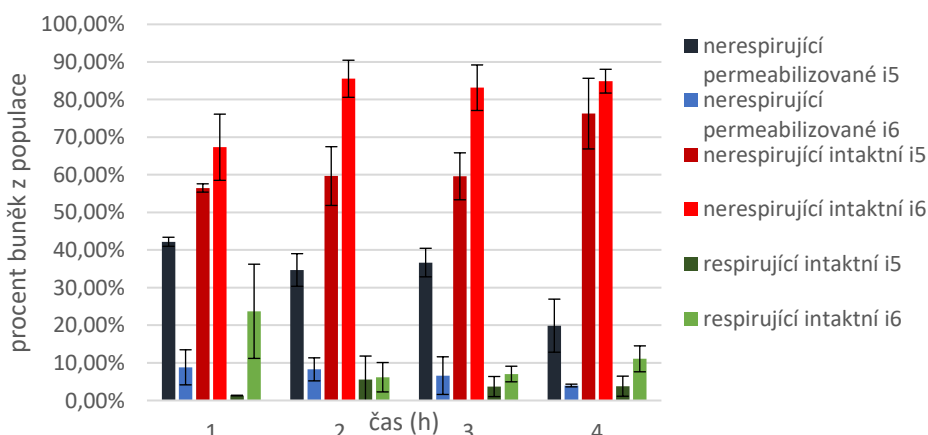
Graf č. 9: Zastoupení buněk v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC vankomycinu u izolátů 1** (tmavší odstín barvy, i1) a **2** (světlejší odstín barvy, i2). Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 10: Zastoupení buněk v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC ciprofloxacinu u izolátů 5** (tmavší odstín barvy, i5) a **6** (světlejší odstín barvy, i6). Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.

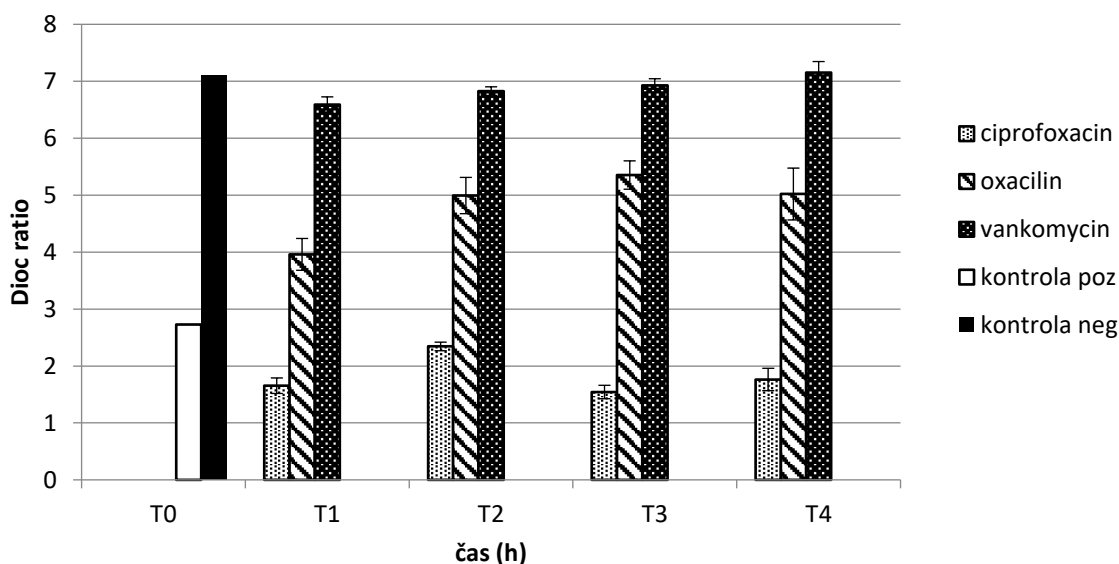


Graf č. 11: Zastoupení buněk v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC oxacilinu u izolátů 5** (tmavší odstín barvy, i5) a **6** (světlejší odstín barvy, i6). Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 12: Zastoupení buněk v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC vancomycinu u izolátů 5** (tmavší odstín barvy, i5) a **6** (světlejší odstín barvy, i6). Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.

Z průměrných hodnot poměru Dioc ratio pro jednotlivé časy bych chtěla také ukázat, jak se změnila hodnota membránového potenciálu oproti kontrolám (viz graf č. 13). Z grafu vyplývá, že po působení vankomycinu mají buňky hodnotu membránového potenciálu podobnou jako buňky po působení CCCP, který zkratuje protonový gradient (negativní kontrola). Po působení oxacilinu dochází též ke snížení membránového potenciálu, avšak ne v takové míře jako u vankomycinu. Po působení ciprofloxacinu mají buňky podobnou, ve většině případů i vyšší, hodnotu membránového potenciálu, než je hodnota membránového potenciálu u buněk kultivovaných bez antibiotika (pozitivní kontrola). Graf ukazuje reprezentativní trend pro izolát 2, avšak v rámci všech čtyř testovaných izolátů jsem nepozorovala významné rozdíly v trendu od tohoto grafu.



Graf č. 13: Hodnota Dioc ratio v závislosti na čase (T₁, T₂, T₃, T₄) po působení ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu v porovnání s kontrolami (T₀): pozitivní (buňky bez ATB), negativní (buňky s CCCP) u izolátu 2. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.

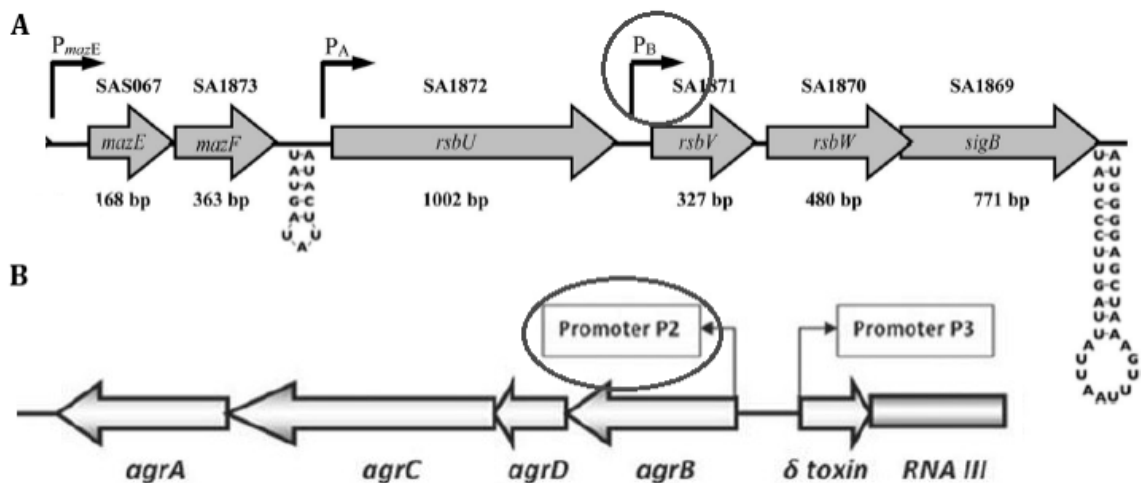
4.6 Příprava konstruktů pro stanovení exprese *sigB* a *agr* operonů v jednotlivých časech křivky hynutí u klinických izolátů

Cíl: Připravit konstrukt, který by se dal využít ke sledování exprese sigB, příp. agr operonu pomocí FC v průběhu křivky hynutí u klinických izolátů.

Abych mohla sledovat, jak se v průběhu jednotlivých časů křivky hynutí mění exprese vybraných genů, pokusila jsem se metodami genového inženýrství připravit plazmid s promotorem příslušných genů fúzovaných s GFP a vnést ho do vybraných klinických izolátů.

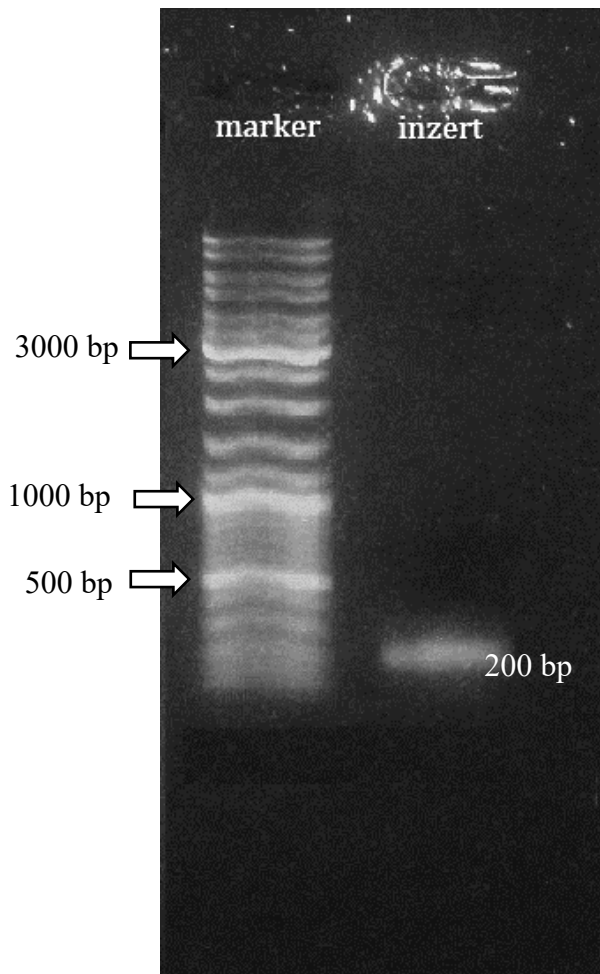
K přípravě konstruktů jsem použila plazmid pCN56 navržený Charpetier a jeho kolegy (Charpetier et al. 2004). Tento plazmid má před genem pro GFP multikopiové místo, do kterého lze libovolně vložit požadovaný gen nebo jeho část. Obsahuje rovněž kazetu erytromycinové rezistence, kterou jsem ale v průběhu pokusu musela vyměnit za kazetu tetracyklinové rezistence pocházející z plazmidu pCN36 (viz obrázek č. 23A, viz dále).

Pro sledování exprese studovaných genů jsem zvolila vložení promotorové sekvence *sigB* a *agr* operonu (sekvence pocházejí z oblastí promotorů uvedených na obrázku č. 21) do multikopiového místa v plazmidu pCN56. Pro promotorové oblasti jsem navrhla specifické primery (viz kap. 3.1.8).

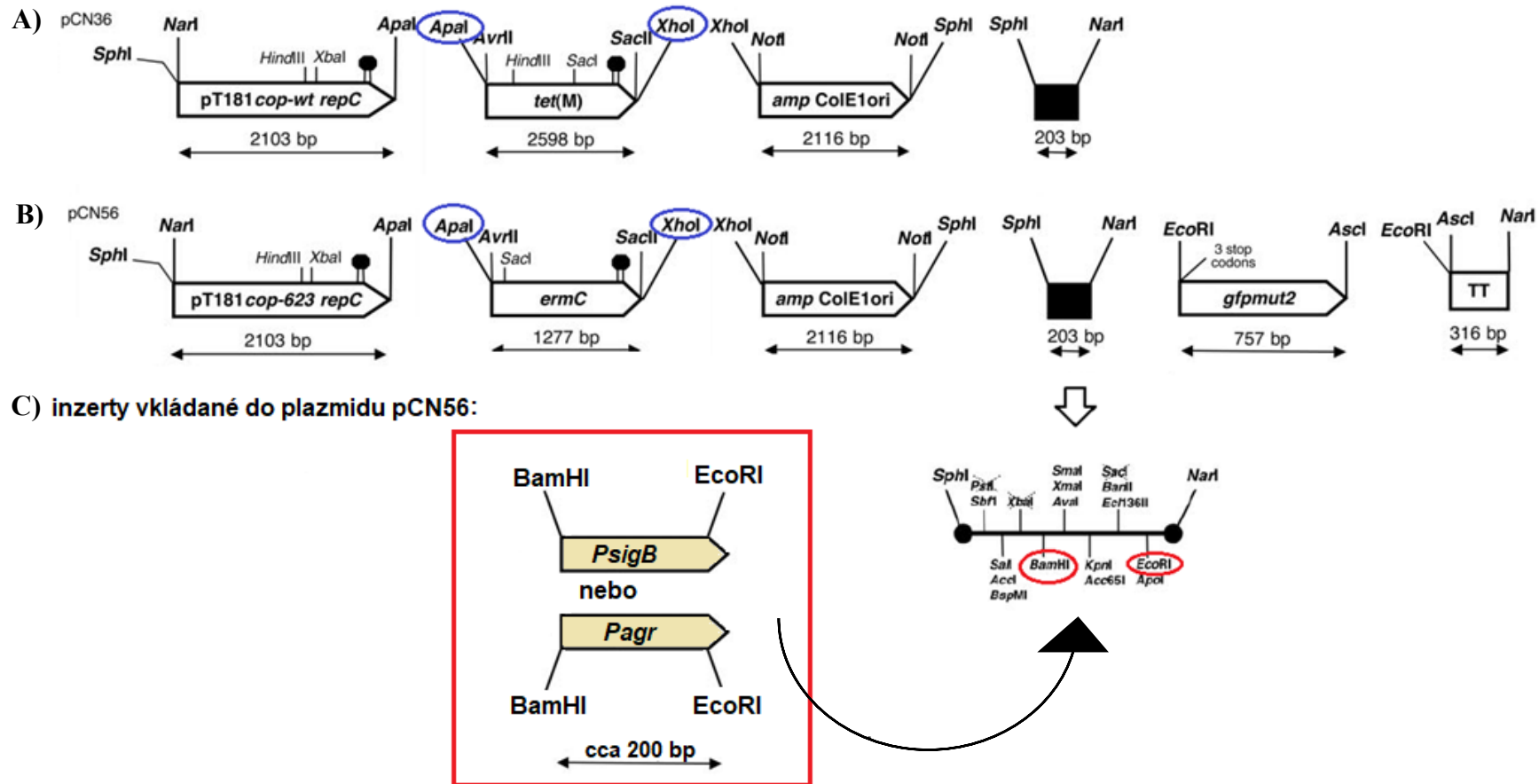


Obrázek č. 21: Operon *sigB* (A) a *agr* (B) s označenými promotory, které jsem klonovala do plazmidu pCN56 (převzato a upraveno podle Donegan & Cheung, 2009 (*sigB* operon) a Halebeedu et al. 2014 (*agr* operon)).

V prvním kroku jsem naamplifkovala inzert (*PsigB*, *Pagr*) určený primery (viz kap. 3.1.8) metodou PCR (viz kap. 3.2.9.4). Jako templát pro amplifikaci jsem použila chromozomální DNA z izolátu 2. Výsledný produkt jsem ověřila na agarózové elektroforéze (viz obrázek č. 22) a přečistila jsem ho použitím kitu pro přečištění PCR produktů (HighPrep PCR, viz kap. 3.2.9.5). Pak jsem inzert i plazmid pCN56 naštěpila restrikčními enzymy *EcoRI*, *BamHI* (viz kap. 3.2.9.3) (viz obrázek č. 23 B) a C))



Obrázek č. 22: Agarózová elektroforéza ukazující naamplifikovaný inzert promotoru *sigB* okolo 200 bp.

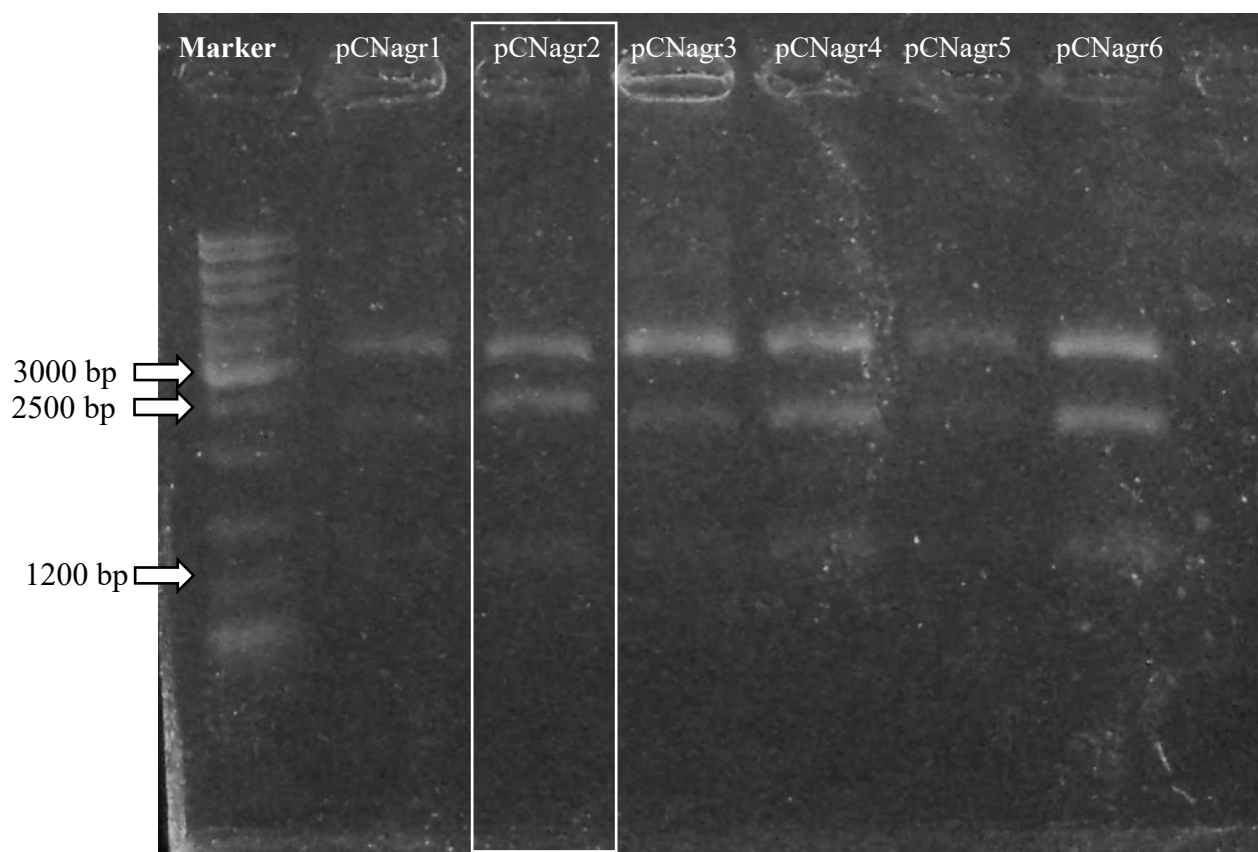


Obrázek č. 23: Mapa plazmidu (A) pCN36 a (B) pCN56, (C) vkládané inzerty *PsigB* a *Pagr* s označenými místy štěpení RE BamHI a EcoRI

pT181 cop-wt repC, *pT181 cop-623 repC* jsou replikační počátky *S. aureus*, *ermC* kazeta pro erytromycinovou rezistenci, *tet(M)* kazeta pro tetracyklinovou rezistenci, *ampColE1ori* replikační počátek *Escherichia coli* spojený s kazetou ampicilinové rezistence, ■ je multikopiové místo (MCS) – místo vložení inzerty, *gfpmut2* je gen kódující GFP a TT je transkripční terminátor

MCS je podrobně ukázán s místy štěpení RE na obrázku pod šipkou, místa štěpení **EcoRI** a **BamHI** v multikopiovém místě jsou označeny červeným kroužkem, místa štěpení RE **ApaI** a **XhoI** (použité pro vyštěpení kazety erytromycinové rezistence a vložení kazety pro tetracyklinovou rezistenci) jsou označeny modrým kroužkem.

Po naštěpení jsem plazmid pCN56 a daný inzert spojila ligací (viz kap. 3.2.9.6). Ligační směs jsem následně natransformovala do *E. coli* DH5 α (viz kap. 3.2.9.1.10) a vysela na pevné LB médium s ampicilinem (100 μ g/ml). Pro kontrolu plazmidů, zda obsahují inzert, jsem vybrala 6 narostlých kolonií od každého konstruktu (A1–A6, B1–B6), které jsem kultivovala v tekutém médiu přes noc a poté z nich vyizolovala plazmidy (pCNsigB1–6 a pCNagr1–6) (viz kap. 3.2.9.1). Následně jsem plazmidy naštěpila RE ApaI, XhoI a EcoRI a po elektroforetickém rozdělení naštěpených plazmidů (viz kap. 3.2.9.7) jsem vybrala kandidátní plazmidy, které inzert obsahovaly (viz obrázek č. 24). Jestli skutečně kandidátní plazmid inzert obsahuje, jsem zkontrolovala sekvenováním daného úseku (použitím primeru z plazmidu pCN56; viz kap. 3.2.9.9) na servisním pracovišti PřF UK. Tím jsem získala plazmid pCNsigB vhodný pro sledování exprese z promotoru P_B *sigB* operonu a pCNagr vhodný pro sledování exprese z promotoru P2 *agr* operonu.



Obrázek č. 24: Výběr kandidátních plazmidů agarózovou elektroforézou. Plazmidy (pCNagr1-6) izolované z vybraných transformantů A1–6 byly naštěpeny ApaI, XhoI a EcoRI a potom analyzovány agarózovou elektroforézou. Plazmid pCNagr2 byl vybrán jako kandidátní, protože úsek XhoI-EcoRI se zdá větší – obsahuje inzert (v tomto případě klonovaný P2 *agr* promotor). Velikost předpokládaných úseků po naštěpení XhoI, ApaI, EcoRI: Apa-XhoI: 1277 bp, XhoI-EcoRI: 2319 bp (s inzertem o 200 bp větší), EcoRI-ApaI: 3176 bp

Plazmidy pCNsigB a pCNagr však stále nebyly vhodné pro vnesení do všech mých klinických izolátů, protože obsahují kazetu erytromycinové rezistence (viz kap. 3.1.2). Některé klinické izoláty použité v této diplomové práci jsou totiž na erytromycin rezistentní (viz kap. 3.1.1), což by mi po přenosu do klinických izolátů znemožnilo selektovat transformanty.

Plazmidy pCNsigB a pCNagr jsem proto naštěpila restričními enzymy ApaI, XhoI (viz obrázek č. 23, strana 77) (viz kap. 3.2.9.3), čímž jsem vyštěpila kazetu erytromycinové rezistence, a oba plazmidy bez erytromycinové kazety jsem izolovala z gelu použitím kitu pro extrakci DNA z gelu (GeneJET Gel Extraction Kit; viz kap. 3.2.9.8). Kazetu tetracyklinové rezistence jsem z plazmidu pCN36 vyštěpila opět restričními enzymy ApaI, XhoI a izolovala z gelu stejným způsobem jako u plazmidů (viz kap. 3.2.9.8). Spojením fragmentů plazmidů pCNsigB a pCNagr (části bez erytromycinové kazety) s tetracyklinovou kazetou ligací jsem získala plazmidy, které jsem nazvala pCNsigBtet a pCNagrtet a přítomnost tetracyklinové kazety jsem ověřila restriční analýzou.

Plazmidy pCNsigBtet a pCNagrtet vyizolované z *E. coli* DH5 α bylo potřeba dále přenést do kmene *E. coli* IM08B, který umožňuje metylaci specifickou pro stafylokoky. Plazmidy jsem natransformovala do IM08B kompetentních buněk (viz kap. 3.1.8.12) a buňky vysela na LB médium s ampicilinem (100 μ g/ml). Z narostlých kolonií jsem některé vybrala a opět z nich vyizolovala plazmidy pCNsigBtet2 a pCNagrtet2 (viz kap. 3.2.9.1).

Plazmidy pCNsigBtet2 a pCNagrtet2 jsem následně elektroporací (viz kap. 3.2.9.13) přenesla do kompetentních buněk, které jsem připravila z vybraných klinických izolátů *S. aureus* a referenčního kmene ATCC 25923 (viz kap. 3.2.9.11). Transformanty jsem vysela na pevné TSB médium s tetracyklinem (10 μ g/ml). Tento krok se už od začátku jevil jako nejobtížnější, nejprve jsem musela oproti instrukcím, ze kterých jsem vycházela, změnit koncentraci tetracyklinu v médiu z 10 μ g/ml na 5 μ g/ml. Po této úpravě se mi podařilo získat transformanty pouze u referenčního kmene ATCC 25923 a izolátu 7, který však nebyl součástí mé studie. U izolátů 1, 2, 5 ani 6 se mi transformanty získat nepodařilo, pravděpodobně kvůli odlišnému restričně-modifikačnímu (RM) systému. Restriční systém klinických izolátů pravděpodobně plazmidovou DNA rozštěpil, izolát 7 může obsahovat mutaci v tomto systému nebo jiný typ RM.

Další používanou metodou je transformovat plazmid do kmene *S. aureus* RN4220, který je defektní v restričním systému a z něj vyizolovaný plazmid vnést do klinických

izolátů (Sadykov, 2014). Pokud jsem plazmidy natransformovala do *S. aureus* RN4220 podařilo se mi získat transformanty, ale nepodařilo se mi izolovaný plazmid (viz kap. 3.2.9.2) přenést do klinických izolátů. Nicméně tímto pokusem jsem prokázala, že příčinou neúspěšného přenosu plazmidu je opravdu RM systém klinických izolátů. V budoucnu bude vyzkoušeno přenesení plazmidu do jiné, vhodněji methylojící *E. coli* (namísto IM08B), a potom se znovu vyzkouší přenesení plazmidového konstruktů do klinických izolátů *S. aureus*.

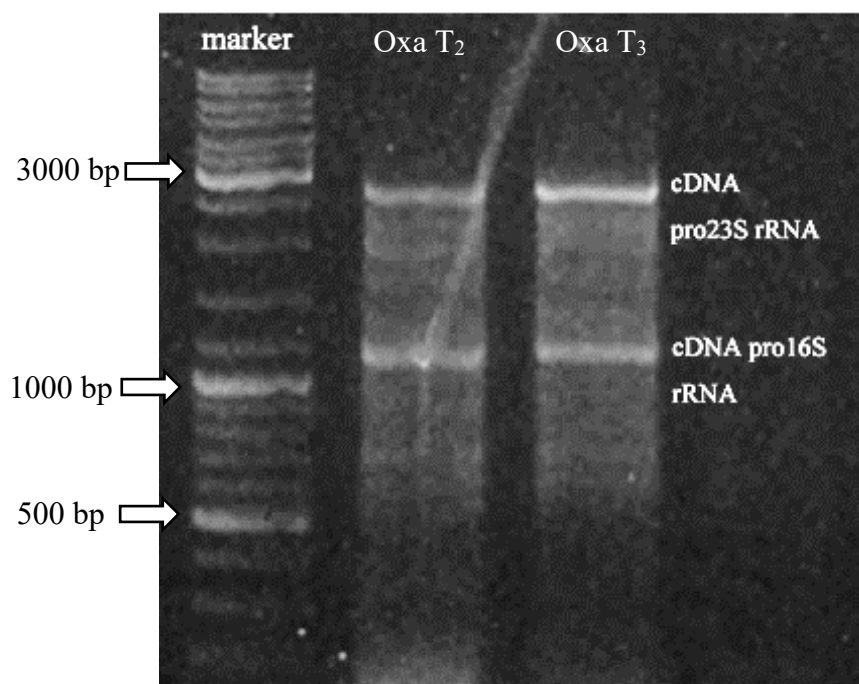
4.7 Sledování exprese *sigB* metodou kvantitativní RT PCR

*Cíl: Z důvodu neúspěšného pokusu 4.6 stanovit, zda a v jaké míře se v jednotlivých časech křivky hynutí T_1 – T_5 u izolátu 2 vytváří mRNA *sigB* po působení ciprofloxacinu a oxacilinu.*

Pro kvantitativní PCR jsem izolovala RNA z jednotlivých časů T_1 – T_5 po působení antibiotik s různým účinkem (ciprofloxacinu a oxacilinu) a převedla ji na cDNA (viz kap. 3.2.10). Koncentraci cDNA jsem změřila na přístroji Nanodrop (Thermo Scientific) a zaznamenala do tabulky (tabulka č. 5). Kvalitu převedené cDNA jsem také ověřila pomocí horizontální agarózové elektroforézy (viz obrázek č. 25). Tento pokus je pouze testovací a vychází jen z jednoho biologického replikátu u izolátu 2.

označení času	čas	Ciprofloxacin	Oxacilin
		koncentrace cDNA	koncentrace cDNA
T_0	0 minut	499,4 ng/ μ l	499,4 ng/ μ l
T_1	10 minut	430,1 ng/ μ l	405,4 ng/ μ l
T_2	30 minut	1149,4 ng/ μ l	921,4 ng/ μ l
T_3	1,5 h	519,2 ng/ μ l	679,9 ng/ μ l
T_4	2 h	532,3 ng/ μ l	840,7 ng/ μ l
T_5	2,5 h	347,6 ng/ μ l	232,1 ng/ μ l

Tabulka č. 5: Koncentrace převedené cDNA v jednotlivých časech odběru



Obrázek č. 25: Ukázka ověření cDNA agarózovou elektroforézou. Vzorok OxaT₂ a OxaT₃ představují cDNA, která byla vytvořena z izolované RNA z buněk po 2 a 3 hodinách působení oxacilinu.

Pro provedení kvantitativní RT PCR jsem použila Luna Universal qPCR Master Mix. Tento mix obsahuje Hot start Taq DNA polymerázu, modré barvivo pro kontrolu přidání mixu, ale hlavně fluorofor vázající se do malého žlábků dsDNA, který je patentově chráněný a odvozený od SYBR® green I. Po vazbě fluoroforu do malého žlábků dsDNA fluorescence výrazně vzroste. Cyklus, ve kterém fluorescence vzroste nad práh pozadí, se nazývá cyklus prahu (cycle of threshold, Ct) a lze podle něj určit množství transkriptu ve vzorku.

Pro kvantifikaci exprese jsem použila matematický model vycházející z publikace z roku 2001 (Pfaffl, 2001). Nejdříve jsem z hodnot Ct pro standardní křivku v závislosti na přirozeném logaritmu z množství cDNA v ředící řadě ($\ln(\text{cDNA})$) sestavila přímkou, z jejíž směrnice jsem vypočítala účinnost reakce (efektivitu, E_f):

$$E_f = 10^{-1/\text{směrnice}}$$

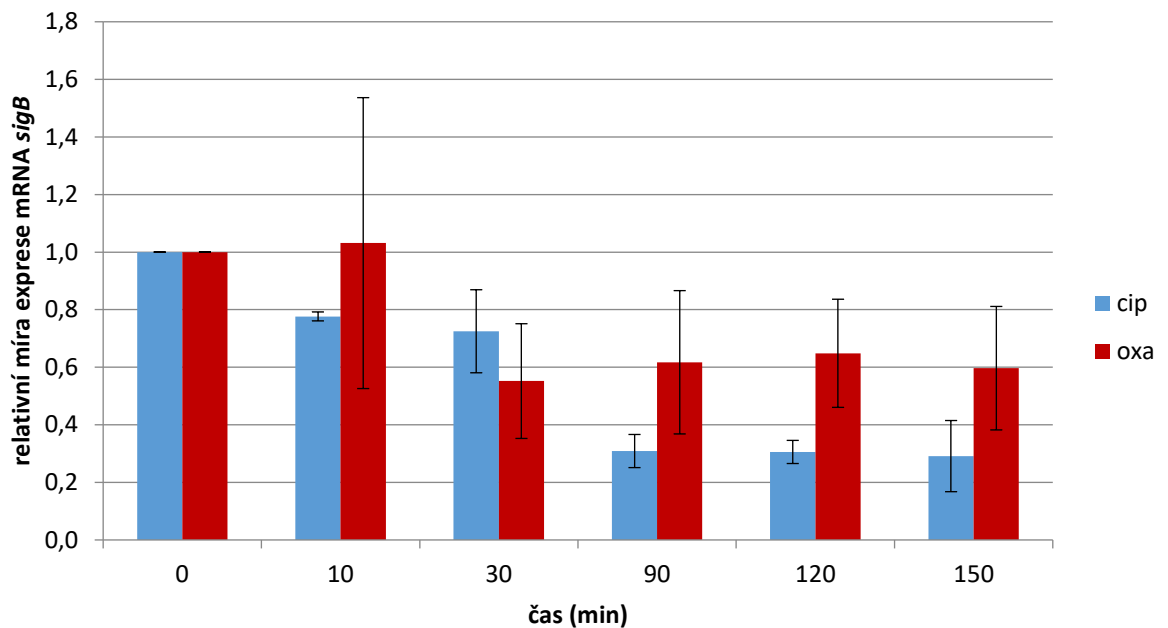
kde E_f je účinnost, která by měla nabývat hodnot do 2 (při 100 % účinnosti), v mém případě ve všech pokusech byla v rozmezí 1,90 – 2. Účinnost reakce se dá velmi ovlivnit výběrem kitu. Účinnost jsem následně využila při výpočtu míry exprese sledovaného genu (*sigB*), která byla porovnávána s mírou exprese referenčního genu pro gyrázu (*gyrB*). Hladiny mRNA vzorků (v čase T_1 , T_2 , T_3 , T_4 a T_5 po působení ciprofloxacinu a oxacilinu) byly normalizovány vůči kontrole, tzn. času T_0 , ve kterém nebyla přidána žádná antibiotika. Výpočet relativní míry exprese cílového genu (R) po přidání antibiotik ke kultuře (vzorek) jsem provedla podle rovnice (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{E_f(\text{cílový gen})^{\Delta Ct_{\text{cílový gen}}(\text{kontrola-vzorek})}}{E_f(\text{referenční gen})^{\Delta Ct_{\text{referenční gen}}(\text{kontrola-vzorek})}}$$

Protože hodnoty koncentrace cDNA se v jednotlivých vzorcích lišily (viz tabulka č. 5), musela jsem přistoupit k vhodnému naředění cDNA na stejnou hodnotu koncentrace. U nejmenší koncentrace cDNA (čas T_5 pro oxacilin) jsem přidávala 5 μl , jak je uvedeno v protokolu (viz kap. 3.2.11), další vzorky jsem vhodně naředila.

Pro odhalení chyby v pipetování jsem na destičku vynesla vždy dva technické replikáty, pokud se tyto dvě hodnoty od sebe lišily o více než 0,5 hodnoty Ct, nezapočítala jsem je do celkového průměru. Celkový průměr je průměr hodnot R ze tří technických replikátů. Tyto výsledky jsem vynesla do grafu (viz graf č. 14).

Expresa *sigB* mRNA v průběhu křivky hynutí



Graf č. 14: Relativní míra exprese *sigB* mRNA u izolátu 2 v časech 10 min, 30 min, 1,5 h, 2 h a 2,5 hodiny po působení ciprofloxacinu (cip, modře) a oxacilinu (oxa, červeně). Hladina *sigB* mRNA je normalizována vzhledem ke kontrolnímu vzorku v čase T_0 (kultura bez antibiotika). Chybové úsečky označují standardní odchylky ze tří technických replikátů.

Jak ukazuje graf č. 14 relativní hladina exprese *sigB* mRNA v porovnání s časem T_0 byla ve všech ostatních časech menší, kromě času T_1 po působení oxacilinu. U tohoto vzorku je ale velké rozpětí standardní odchylky v rámci triplikátu, takže nelze jednoznačně říct, zda je exprese nižší či vyšší.

5 DISKUZE

Staphylococcus aureus je grampozitivní podmíněně patogenní bakterie, která může být původcem velmi vážných onemocnění vedoucí i ke smrti (endokarditida, osteomyelitida). U většiny zdravé populace však nepůsobí žádné problémy a je komenzálem kůže a dýchacího traktu. Patogenicita je způsobena produkcí mnoha virulencních faktorů, často řízených Agr systémem, která může vést k indukci akutní infekce. Kromě toho však *Staphylococcus aureus* může v průběhu léčby přežívat skrytě v hostitelském prostředí a po vysazení antibiotik způsobovat opakovaný návrat infekcí. Pochopení životních strategií tohoto běžného patogena je důležité pro zdokonalení léčby pacientů chronických onemocnění a také k zabránění šíření rezistence vůči tomuto patogenu, protože se ukazuje, že právě perzistentní subpopulace je zdrojem rezistentních buněk (Cohen et al. 2013).

Schopnost mikroorganismů perzistovat v průběhu antibiotické léčby je v současné době poměrně hojně studovaným fenoménem. I přesto je ale naše poznání velmi nedostačující a čím více se perzisteři studují, tím více nových a nejasných otázek vzniká. Mezi nejvýznamnější otázky v současnosti patří, zda perzisteři vznikají stochasticky nebo na základě vnějšího či vnitřního faktoru, zda jsou perzisteři dormantní buňky nebo je perzistence stav, který musí být aktivně udržován, a zda existují geny související s perzistencí. Velkou výzvou budoucnosti je i zavedení testování na detekci perzisterů v klinické praxi, které se dodnes neprovádí, a které by pomohlo zefektivnit léčbu u pacientů, kteří trpí chronickými infekcemi.

Cílem první části mé diplomové práce bylo použít vypracovanou metodu stanovení křivek hynutí (vycházející z předchozích prací v naší laboratoři) na klinických izolátech a tím zjistit, jaká je míra schopnosti perzistovat na vybraná antibiotika. Tyto klinické izoláty pocházely od pacientů s cystickou fibrózou. Od každého pacienta jsem získala vždy dva chronologické izoláty stejného *spa* typu, jedna dvojice byla s odvozeným *spa* typem (5, 6), který však lze stále považovat za klonální (Tkadlec et al. 2015). První z dvojice byl odebrán ihned po antibiotické léčbě, druhý v průměru 2 roky po ní. Záměrem bylo porovnat, jak se v rámci souboru izolátů a klonálních dvojic chronologických izolátů mění schopnost perzistovat. Všechny dodané klinické izoláty byly osekvenovány na spolupracujícím pracovišti MBÚ AV ČR s.r.o. a dalším mým záměrem bylo odhalit adaptační změny po působení léčby v rámci klonální dvojice a nalézt, zda existuje souvislost mezi mutacemi a pozorovaným fenotypem kolonií.

Součástí mé diplomové práce bylo dále vyzkoušet TD test nedávno vyvinutý skupinou Gefen a Balaban (Gefen et al. 2017) na klinických izolátech *S. aureus* a jeho výsledky porovnat s výsledky z křivek hynutí. Právě toto porovnání by mohlo být důležité pro jeho zavedení do klinické praxe.

V druhé části diplomové práce jsem se chtěla věnovat současným otázkám ohledně indukce a fyziologického stavu perzistence. Chtěla jsem dokázat, jak vybraná antibiotika na populační úrovni působí na membránový potenciál buněk a pokusila jsem se po působení antibiotik rozlišit buňky respirující intaktní, nerespirující intaktní a nerespirující, permeabilizované. Dále jsem se věnovala tomu, zda je obecná stresová odpověď *S. aureus* indukována při perzistenci. Vytvořila jsem plazmidy s fúzovaným promotorem genů pro obecnou stresovou odpověď a promotorem regulátoru virulenních genů (*PsigB*-GFP, *Pagr*-GFP), avšak konstrukty se mi nepodařilo vnést do klinických izolátů. Proto jsem alespoň metodou kvantitativní RT PCR stanovila množství *sigB* transkriptu u klinického izolátu 2 (mutantního v *agrB*) v průběhu křivky hynutí po působení ciprofloxacinu a oxacilinu.

Moje práce začala tím, že jsem se v získaných datech ze sekvenční analýzy MBÚ AV ČR s.r.o., kde byly nalezeny všechny mutace v porovnání s nejbližším klonálním předkem, zaměřila na mutace, které se u izolátů *S. aureus* často vyskytovaly a mohly by souviset s perzistencí. Z 24 izolátů se v šesti případech (u izolátů 1, 2, 3, 7, 9, 10) objevila mutace v jednom z genů *agr* operonu (nejčastěji v *agrC*). V literatuře u klinických izolátů *S. aureus* jsou mutace v *agr* operonu poměrně častým jevem (McNamara & Iandolo 1998; Somerville et al. 2002) a byly nalezeny i u klinických izolátů pocházejících z dýchacího traktu pacientů s CF (Goerke et al. 2000; Goerke et al. 2003; Tan et al. 2019). Mutace, které mění funkčnost Agr systému, mohou vést ke snížené virulenci u těchto izolátů a snadnějšímu přizpůsobení se hostitelským podmínkám (Suligoy et al. 2018). Izoláty 5, 7, 10 a 18 obsahují mutaci v operonu *sigB* (tzn. buď přímo v genu *sigB* nebo v genech, které regulují aktivitu SigB, viz obrázek č. 7). Tyto mutace měly vliv i na fenotyp kolonií, které jsem pozorovala.

Je známo, že SigB faktor přímým nebo nepřímým způsobem ovlivňuje syntézu stafylokokového pigmentu stafyloxantinu (Giachino et al. 2001), což se u mých mutantů v operonu *sigB* projevilo nepigmentovaným (bílým) zbarvením mycelia. Bílé zbarvení jsem však pozorovala i u izolátů, které neobsahovaly mutaci v *sigB*, ale také převážně u mutantů v *agr* operonu, což může být důsledkem vzájemného propojení těchto regulačních drah (Bischoff et al. 2001). Izolát 11, který oproti izolátu 12 vykazoval agregaci v tekutém médiu i na agaru, obsahoval jen velmi málo mutací, podobně jako izolát 20, který také agregoval.

Podobné agregáty vytvářel i referenční kmen ATCC 25923 (Kubištová, 2015). Většina izolátů, které agregaci na pevném či v tekutém médiu nevykazovaly, obsahovala mutaci v genu kódující velký Ehb protein, jehož funkce je v přichycení k proteinům mezibuněčné hmoty (Kuroda et al. 2008). Mutanty v *ebh*, případně v dalších genech důležitých pro adhezi, potom agregáty většinou netvořily a lépe se s nimi manipulovalo při resuspendování v médiu a roztírání na kultivační agary.

Pro další pokusy jsem zjistila MIC každého izolátu pro ciprofloxacin, gentamicin, oxacilin a vankomycin. Hodnoty MIC pro klonální dvojici izolátů byly většinou velmi podobné, v některých případech však došlo k posunutí MIC u později odebraného izolátu k vyšším hodnotám (např. u dvojice izolátů 5 a 6), tzn. zvýšení přežívání na vybraná antibiotika. To může souviset s tím, že perzisteři mohou být v hostiteli rezervoárem různých evolučních forem, ze kterých se může vyvinout rezistentní populace (Cohen et al. 2013, Levin-Reisman et al. 2017), jak bylo již naznačeno v úvodu této diskuze.

Pro zběžné otestování izolátů na schopnost perzistovat jsem použila nově vyvíjený TD test, který je z hlediska časové a finanční náročnosti dosud nejjednodušším způsobem otestování míry perzistence. Poprvé jsem tento test použila u *S. aureus* a na antibiotika různého účinku gentamicin, ciprofloxacin, oxacilin, vankomycin a tetracyklin, která se používají v léčbě proti stafylokokovým onemocněním. Původně byl tento test použit u klinických izolátů *E. coli* a *Enterobacter cloacae* pro β -laktamová antibiotika ampicilin, imipenen, ertapenem, cefazolin a kanamycin a také pro fluorochinolonové antibiotikum ciprofloxacin (Gefen et al. 2017). Společně s námi se testování na stejných izolátech a stejných antibiotikách provádělo také v laboratořích 2. lékařské fakulty UK v Motole. U všech 22 izolátů jsem nejvíce pozorovala perzistery pro β -laktamové antibiotikum oxacilin (1 μ g), méně pak pro fluorochinolonové antibiotikum ciprofloxacin (10 μ g). Pro aminoglykosid gentamicin (10 μ g) a glykopepidové antibiotikum vankomycin (5 μ g) jsem také pozorovala narostlé kolonie v inhibiční zóně, v některých případech se však jednalo spíše o rezistenty. Rezistentní kolonie se u TD testu objevují v inhibiční zóně ihned v prvním kroku provedení TD testu, tzn. ještě před odebráním ATB disku (Gefen et al. 2017). Pro tetracyklin (7,5 μ g) jsem žádné kolonie v inhibiční zóně nepozorovala.

Zvláštním jevem, který mě zaujal, bylo zbarvení okolí inhibiční zóny, které se objevovalo po 48 hodinách kultivace s glukózovým diskem. Může se jednat o indukci obecné stresové odpovědi v reakci na antibiotikum, protože SigB je regulátorem biosyntézy staphyloxantinu (Giachino et al. 2001). U mutantů v *sigB* nebo v jeho regulátorech bylo okolí

inhibiční zóny nepigmentované. Dále mě zaujalo, že některé izoláty vytvářely perzistery pouze v určitých částech inhibiční zóny, především v okolí glukózového disku anebo na hranici inhibiční zóny (viz obrázek č. 16, izolát 2 pro oxacilin). Je možné, že právě to odlišuje perzistentní a tolerantní bakterie, kdy tolerantní by mohly růst na okraji inhibiční zóny a perzistentní náhodně v celé ploše inhibiční zóny (což v mých pokusech korelovalo s průběhem křivek hynutí (viz obr. 16)). Podle Gefen a jejích kolegů (2017) však tento test nedokáže rozlišit mezi perzistery a tolerantními bakteriemi (Gefen et al. 2017).

Následně jsem v biologickém triplikátu stanovila křivky hynutí pro tři dvojice izolátů (1, 2, 5, 6 a 23, 24). Křivky hynutí jsem stanovovala 1–5 hodin po působení různých antibiotik. Pro stanovení křivek hynutí jsem použila 100x MIC koncentrace antibiotik (kromě izolátu 1 a 2, kde jsem použila navíc i 10x MIC gentamicin). Pro stanovení jsem nejprve využila metodu kapkového výsevu (Kubištová, 2015), avšak tato metoda se ukázala u mých klinických izolátů jako nevhodná, protože v kapkových výsevech především v prvních časech po vystavení antibiotiku bakterie nerostly. Vhodnější metodou bylo klasické stanovení CFU, což může souviset s tím, že na resuscitaci perzisterů se mohou podílet faktory quorum sensing či faktory podporující resuscitaci (Pascoe et al. 2014). Nedávno bylo dokázáno, že faktory PSM, jejichž exprese je pod přímým vlivem Agr systému, mohou pravděpodobně indukovat resuscitaci perzisterů (Bojer et al. 2018). V pokusech jsem však pracovala s chronickými izoláty, které vzhledem k mutacím v *agr* pravděpodobně neprodukuje PSM, a tím by se též dala vysvětlit jejich snížená schopnost resuscitace.

Křivky hynutí pro daná antibiotika vykazovaly většinou bifázický průběh, který charakterizuje perzistery, avšak především u ciprofloxacinu se průběh křivek podobal spíše přímce charakteristické pro toleranci (viz graf č. 4 na straně 62). V čase T_4 a T_5 u izolátu 2 po působení gentamicinu došlo k opětovnému nárůstu populace, i když prvotní pokles úhynu populace byl v porovnání s ostatními antibiotiky vysoký. Předpokládám, že zvýšení množství přeživších bakterií v pozdějších časech křivky hynutí by mohlo být důsledkem nárůstu rezistentů, které jsem pozorovala v některých případech i u TD testů na gentamicin. U testovaných izolátů při stanovení křivek hynutí po působení vankomycinu vyrostlo poměrně hodně perzisterů, tento počet byl téměř srovnatelný s počtem perzisterů v průběhu křivek hynutí po působení oxacilinu. To je v rozporu s mými výsledky TD testů, kde byl výskyt perzisterů po působení vankomycinu velmi vzácný. Může to být tím, že molekula vankomycinu je poměrně velká (Reynolds, 1989), proto obtížněji difunduje pevným médiem použitým při TD testu. Právě pokles koncentrace antibiotika pod MIC je důležitý pro

resuscitaci perzisterů v inhibiční zóně (Gefen et al. 2017). Z toho vyplývá, že výsledek TD testů pro některá antibiotika nemusí být dostatečně vypovídající. Lze také spekulovat o tom, že velký vliv na výsledný růst perzisterů měla koncentrace použitého antibiotika. Perzisteři podle své definice dovedou přežít i mnohonásobné minimální inhibiční koncentrace antibiotika (Brauner et al. 2016), a proto jsem takové koncentrace použila při stanovení křivek hynutí. Avšak u TD testů takové koncentrace použity nebyly a je tedy otázkou, zda je vůbec možné výsledky z těchto dvou testování porovnávat. Podle L. Kubištové je pro vznik perzisterů koncentrace použitého antibiotika důležitá pouze u některých druhů antibiotik. Například po působení ciprofloxacinu byl průběh křivky hynutí 10x MIC a 100x MIC srovnatelný, v případě gentamicinu na koncentraci použitého antibiotika záleželo (Kubištová, 2015). Tento fenomén byl popsán i v publikaci Lechner a jiných vědců (2012), kde po působení 10x MIC a 100x MIC tobramycinu byly průběhy křivek hynutí odlišné, což by potvrdilo závislost množství perzisterů na koncentraci použitého antibiotika (Lechner et al. 2012). Z mých výsledků křivek hynutí vyplývá, že množství perzisterů na koncentraci gentamicinu záleželo pouze u izolátu 1, což by naznačovalo, že může záležet též na genotypu izolátu.

Z výsledků první části mé diplomové práce vyplývá, že změny v míře perzistence u klonální dvojice nejsou příliš velké. Průběhy křivek hynutí jsou v rámci klonální dvojice podobné, avšak v rámci jiných dvojic klinických izolátů odlišné. Během dvouletého přežívání klonálního *spa* typu *S. aureus* v dýchacím traktu pacienta s CF tak pravděpodobně nedochází ke změně v míře perzistence. Největší schopnost perzistovat oproti ostatním testovaným dvojicím vykazovala dvojice izolátů 1, 2, u kterých se vyskytovala mutace v *agr* genech. Tento rozdíl byl zásadní obzvláště po působení vankomycinu a ciprofloxacinu (viz graf č. 4 a 6 na straně 62 a 63). Mutace v *agr* podle našich výsledků napomáhají schopnosti perzistovat, což je v souladu s literaturou (Goerke et al. 2003, Suligoy et al. 2018, Tan et al. 2019).

V druhé části mé diplomové práce jsem se zabývala dvěma otázkami současného zkoumání perzistence. První otázkou bylo, zda po působení antibiotik dochází u přeživších perzisterů ke snížení membránového potenciálu. U bakterie *E. coli* byl mechanismus snížení membránového potenciálu popsán na základě indukce pórtvorného toxinu HokB (viz strana 16), který je součástí TA systému *hokB/sokB* (Gerdes et al. 1997). U *S. aureus* však TA systémy pravděpodobně nemají vliv na navození perzistence (Conlon et al. 2016).

V průběhu křivky hynutí po 1, 2, 3 a 4 hodinách od přidání příslušného antibiotika (ciprofloxacin, oxacilin, vankomycin) jsem prováděla jednotlivé odběry buněk a tyto buňky

jsem poté obarvila fluorescenční sondou DioC₂(3), která detekuje míru membránového potenciálu. U buněk s nízkým membránovým potenciálem vykazuje zelenou fluorescenci, u buněk s vysokým potenciálem červenou fluorescenci. Pomocí příslušných kontrolních vzorků jsem na základě toho dokázala v průtokovém cytometru odlišit buňky s větším či menším membránovým potenciálem. Dále bylo vhodné odlišit buňky, které mají permeabilizovanou membránu, což jsem provedla obarvením DNA buněk interkalačním barvivem To-pro-3.

Po působení ciprofloxacinu buňky vykazovaly stav blízký pozitivní kontrole (buňkám respirujícím a intaktním). Membránový potenciál se po působení ciprofloxacinu nesnižoval v celé době sledování, tj. 4 hodiny po aplikaci ciprofloxacinu. Ciprofloxacin působí na úrovni inhibice DNA gyrázy (GyrB) a způsobuje aktivaci SOS odpovědi. Dříve bylo popsáno, že působení ciprofloxacinu se může projevit filamentací a zvětšením objemu buněk (Elliot et al. 1987). Tento jev by mohl vysvětlovat pozorovaný posun k větším intenzitám fluorescence v průběhu působení ciprofloxacinu. Zvýšení fluorescence sondy To-pro-3 může být vysvětlena též tvorbou buněčných agregátů, u nichž se kumuluje DNA odumřelých buněk, která se touto sondou barví (McAuley et al. 2018). V literatuře byl zkoumán vliv ciprofloxacinu na lidské T-lymfocyty (Jurkat buňky), neboť ciprofloxacin působí také na úrovni inhibice savčí topoizomerázy 2, hlavně její mitochondriální izoformy. Po působení ciprofloxacinu na tyto buňky došlo ke snížení membránového potenciálu mitochondrií (Kozieł et al. 2006), což je v rozporu s naším pozorováním. Nutno však poznamenat, že mechanismus účinku ciprofloxacinu i metody zkoumání membránového potenciálu jsou u lidských buněk značně odlišné.

Po působení oxacilinu docházelo u buněk k postupné ztrátě membránového potenciálu, což se projevilo nerovnoměrnou distribucí subpopulací mezi buňkami respirujícími a nerespirujícími. Po čtyřech hodinách působení oxacilinu byla většina buněk již bez potenciálu. Oxacilin je β -laktamové antibiotikum, které u rostoucích buněk inhibuje transpeptidaci a karboxypeptidaci při syntéze peptidoglykanu vazbou na proteiny vázající penicilin (PBP). Tím se zastavuje růst buněk a postupně dochází i k narušení membrány a buněčné lýzi. Podle Podlesek a jeho spolupracovníků jsou přeživší životaschopné bakterie v prvních hodinách po působení β -laktamového antibiotika obaleny zbytky lyzovaných buněk. Tyto tzv. „flokuly“ se postupně shlukují a tvoří biofilm (Podlesek et al. 2016). Právě tento fakt mohl přispět k nerovnoměrné distribuci subpopulací buněk po působení oxacilinu, které jsem v FC pozorovala.

Po působení vankomycinu došlo oproti oxacilinu již po jedné hodině působení antibiotika k rychlému poklesu membránového potenciálu u většiny buněk. V průběhu času se snižovalo zastoupení buněk s permeabilizovanou membránou, což mohlo být důsledkem lýze buněk a neschopnosti FC lyzované buňky detekovat. Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum, které inhibuje syntézu BS vazbou na peptidovou komponentu peptidoglykanu, která pak nemůže být rozpoznána transglykozyázou. Primárně vankomycin nenarušuje buněčnou membránu (McAuley et al. 2018), avšak sekundárně může zastavení syntézy BS u vankomycinu i oxacilinu vést k lýzi buněk (Hancock & Fitz-James, 1964; Kohanski et al. 2010). Buňky nerespirující intaktní, které se v tomto pokusu po působení vankomycinu a oxacilinu objevovaly (u vankomycinu navíc ve všech sledovaných případech převažovaly), mohly představovat perzistery, buňky se zastaveným růstem, na které antibiotika působící na BS nemohla účinkovat.

Z výše uvedených odstavců vyplývá, že každé antibiotikum působí na fyziologický stav přeživších bakterií různým způsobem, což by mohlo indukovat různé mechanismy pro vznik perzistence na dané antibiotikum. Podle těchto poznatků se zdá, že vankomycin razantněji indukuje snížení membránového potenciálu, snížení však lze pozorovat i u oxacilinu. Po působení ciprofloxacinu nedošlo u buněk ke snížení membránového potenciálu. Snížení membránového potenciálu u *S. aureus* tak pravděpodobně není univerzálním mechanismem, který indukuje vznik perzistence. V rámci klonální dvojice 1 a 2 nedocházelo ke změnám v zastoupení subpopulací rozdělených na základě membránového potenciálu a permeability membrány, v rámci dvojice 5, 6 po působení oxacilinu a vankomycinu jsem určité změny pozorovala. Genetické změny izolátu by tak mohly k navození daného fyziologického stavu po působení antibiotik přispívat, i když se zdá, že větší vliv má působení antibiotika samotného.

Druhou otázkou, kterou jsem řešila, bylo, zda se po působení antibiotik indukuje obecná stresová odpověď a jakým způsobem s perzistencí souvisí Agr systém. Abych mohla expresi *sigB*, příp. *agr* operonů u klinických izolátů sledovat, sestavila jsem plazmidy s vneseným *sigB* a *agr* promotorem před genem pro GFP protein. Expresi *sigB*, příp. *agr* operonu bych potom mohla detekovat prostřednictvím fluorescence GFP na průtokovém cytometru, případně tuto expresi i kvantifikovat a porovnávat navzájem mezi izoláty.

Použila jsem podvojný vektor pCN56 obsahující multikopiové místo, do kterého lze vnést libovolný gen nebo jeho část. Za multikopiovým místem se nachází gen pro GFP, díky čemuž lze expresi požadovaného genu sledovat (Charpentier et al. 2004). Naklonovala jsem

sigB nebo *agr* promotor do multikopiového místa plazmidu pCN56 použitím *E. coli* DH5 α a po ověření, že k naklonování došlo, jsem ještě u získaných plazmidů změnila typ selekce vyštěpením erytromycinové a vložením tetracyklinové rezistenční kazety. Takto upravené plazmidy pCN56sigBtet a pCN56agrtet jsem transformací přenesla do *E. coli* IM08B umožňující specifickou stafylokokovou modifikaci DNA. Po izolaci plazmidu z *E. coli* IM08B jsem se plazmidy pokusila přenést do několika klinických izolátů *S. aureus*. Bohužel se mi po elektroporaci plazmidu do požadovaných klinických izolátů nepodařilo získat transformanty, což může souviset s odlišným restrikcčně-modifikačním (RM) systémem u studovaných izolátů *S. aureus*. Po elektroporaci plazmidu do mutanta bez restrikcčního systému (*S. aureus* RN4220) jsem získala příslušné transformanty. Ani po izolaci plazmidu z tohoto mutanta a jeho vnesení do klinických izolátů jsem nezískala příslušné transformanty. Izoláty *S. aureus* obsahují mnoho různých typů RM systémů, což je velkým problémem při genetických manipulacích *S. aureus*. Kmen *S. aureus* RN4220 lze použít jako prostředníka pro klonování do jiných kmenů *S. aureus*, hlavně však blízké příbuzných, u nepříbuzných je účinnost vnesení DNA velmi nízká (Monk & Forster, 2012; Sadykov, 2014). Řešením by bylo použít jiný kmen *E. coli*, který by modifikoval DNA jiným, odpovídajícím způsobem než *E. coli* IM08B, ani tak by výsledek nebyl zaručený. Další možností by bylo pokusit se konstrukty vnést jiným způsobem přenosu DNA (např. transdukcí). Přenos DNA generalizovanou transdukcí je hlavní metodou přenosu DNA u *S. aureus* (Lindsay, 2014) a mohl by být účinnější než přenos DNA navozenou transformací. Další pokusy s cílem získat transformanty budou provedeny v budoucnu mými kolegy.

Protože vnést plazmid pro sledování exprese *sigB* ani *agr* operonů do klinických izolátů se mi nepodařilo, přistoupila jsem alespoň ke stanovení relativní hladiny mRNA *sigB* po působení ciprofloxacinu a oxacilinu u izolátu 2. Podobný experiment, avšak s referenčním kmenem ATCC 25923, byl již proveden Lucií Kubištovou, avšak dospěl k jinému závěru. V mém případě jsem sledovala expresi *sigB* po působení antibiotik ciprofloxacinu a oxacilinu z dlouhodobějšího hlediska v pěti časech (po 10, 30, 90, 120 a 150 minutách). Pro pokus jsem použila izolát 2, který obsahuje nonsense mutaci v *agrB* (viz kap. 4.1). U tohoto mutanta v průběhu působení antibiotik ciprofloxacinu a oxacilinu došlo spíše ke snížení exprese *sigB* oproti kultuře bez antibiotika (T_0). V jednom jediném případě – po 10 minutách kultivace s oxacilinem – mohlo dojít ke zvýšení, i když rozptyl hodnot v rámci triplikátu byl velký a nelze proto jednoznačně určit, zda došlo ke zvýšení či snížení. Ve všech ostatních časech po obou antibiotikách se ale relativní míra exprese genu *sigB* snížila.

V současnosti se naopak uvažuje, že obecná stresová odpověď přispívá k navození perzistence (viz přehled literatury 2.3.2). U Lucie Kubištové u referenčního kmene ATCC 25923 došlo po působení ciprofloxacinu po 10 minutách k trojnásobnému nárůstu exprese *sigB* oproti kontrole bez antibiotika (T_0), nárůst, i když menší, byl pozorován i po 30 min kultivace s ciprofloxacinem (Kubištová, 2015). Lucie Kubištová však pro své pokusy nepoužila antibiotikum oxacilin, průběh po působení oxacilinu tedy nemám s čím porovnat.

Prvním vysvětlením snížené exprese *sigB* po působení antibiotik může být, že obecná stresová odpověď není nutná pro vznik perzisterů, i když může k tvorbě perzisterů nepřímým způsobem přispívat. Nedávno bylo zjištěno, že klindamycinem indukovaná obecná stresová odpověď *S. aureus* není nezbytná pro tvorbu biofilmu, i když k jeho tvorbě může přispívat (Schilcher et al. 2016). Biofilm přitom tvoří důležitou ochrannou niku pro perzistery (Tuchscherer et al. 2010).

Dalším vysvětlením může být, že u klinického izolátu 2 mohla mutace v *agrB* mít vliv na expresi *sigB* mRNA, což by vysvětlovalo nízkou expresi *sigB* mRNA po působení ciprofloxacinu oproti kontrole. Je známo, že SigB ovlivňuje Agr systém prostřednictvím regulátoru SarA, který je přímo v regulonu SigB, a který pravděpodobně stimuluje P2 i P3 promotor *agr* operonu a aktivuje tím transkripci RNAII a RNAIII (Chien & Cheung, 1998; Bischoff et al. 2001). Exprese *agr* a *sar* operonů je tedy ovlivněna SigB, avšak zda tato regulace funguje i obráceně a zda existuje zpětnovazebná smyčka regulace *agr* a *sigB* dosud nebylo objeveno. Pro objevení takové regulace by bylo potřeba rozsáhlejší studium než jen stanovení metodou kvantitativní RT PCR z jednoho testovacího pokusu jako v mém případě. Další pokusy budou potřeba pro ověření exprese *sigB* mRNA u mutanta v genech *agr* operonu, což by přispělo k poznání vzájemného propojení těchto drah.

Oba pokusy v této diplomové práci (sledování působení antibiotik na membránový potenciál buněk, stanovení exprese *sigB* mRNA) nasvědčují, že perzistence je pravděpodobně děj, jehož vznik ani průběh není pro bakterii *S. aureus* univerzální. Nejen, že mechanismus, jakým je perzistence navozena, a jak bude probíhat, závisí na konkrétním druhu bakterie, ale také na výskytu adaptačních mutací u konkrétního izolátu, jeho fyziologickém stavu a také na indukujícím signálu (typu a koncentraci použitého antibiotika). Všechny tyto aspekty potvrzují současnou hypotézu o velké heterogenitě mechanismů pro vznik perzisterů.

6 SOUHRN

Cílem mé práce bylo rozšířit znalosti o metodách zkoumání perzistence u *S. aureus* a jejich použití u klinických izolátů pocházejících z dýchacího traktu pacientů s CF. Zároveň jsem se pokusila sledovat, k jakým změnám na různých úrovních dochází v rámci dvou klonálních izolátů. Dále jsem sledovala, jak se působení antibiotik projeví na změně v membránovém potenciálu buněk a propustnosti membrány. Nakonec mě zajímalo, jak se v krátkodobém časovém horizontu mění exprese *sigB* mRNA u jednoho z klinických izolátů po vystavení kultury dvěma různými antibiotiky. V rámci mé diplomové práce bylo dosaženo těchto cílů:

1. Použila jsem TD test na orientační otestování míry perzistence u klinických izolátů *S. aureus*.

2. Stanovila jsem u třech dvojic klinických izolátů křivky hynutí, které jsem vzájemně porovnávala. Zjistila jsem, že v rámci klonální dvojice izolátů nedochází ke změně v míře perzistence. U izolátů, které byly mutantní v *agr* genech, jsem pozorovala vyšší schopnost perzistovat.

3. Porovnávala jsem výsledky a použitelnost dvou výše uvedených metod pro stanovení míry perzistence a došla jsem k závěru, že TD test lze použít ke stanovení míry perzistence také u *S. aureus*, neboť výsledky obou metod korelovaly.

4. Otestovala jsem, jakým způsobem působí různé typy antibiotik na membránový potenciál a integritu membrány, a určila, jaké je zastoupení subpopulací buněk u různých izolátů dle těchto parametrů v časech křivky hynutí s antibiotiky. Každé antibiotikum mělo odlišný vliv na membránový potenciál přeživší subpopulace buněk.

5. Vytvořila jsem plazmidy pCNsigBtet2 a pCNagrtet2 vhodné pro sledování exprese *sigB* a *agr* operonů. Expresi jsem však nebyla schopna sledovat, protože se mi tento konstrukt nepovedlo vnést do požadovaných klinických izolátů. Poukázala jsem na obtížnost metod pro vnášení DNA do klinických izolátů *S. aureus* a navrhla jiné metody vnesení konstruktů.

6. Metodou kvantitativní RT PCR jsem určila relativní míru exprese *sigB* mRNA u klinického izolátu 2, mutantního v *agrB*, a výsledky porovnávala s již dříve stanovenou mírou exprese *sigB* mRNA u referenčního kmene ATCC 25923. U sledovaného izolátu ke zvýšení exprese *sigB* nedošlo.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. **Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C., & Tarkowski, A., (1993)** The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infection and Immunity*, **61**, 3879–85
2. **Ackermann, M., Stecher, B., Freed, N. E., Songhet, P., Hardt, W. D., & Doebeli, M., (2008)** Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature*, **454**, 987–990
3. **Allison, K. R., Brynildsen, M. P. & Collins, J. J., (2011)** Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, **473**, 216–220
4. **Amato, S., Orman, M., & Brynildsen, M., (2013)** Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*, *Molecular Cell*, **50**, 475–487
5. **Amato, S. M., & Brynildsen, M. P., (2015)** Persister heterogeneity arising from a single metabolic stress. *Current Biology*, **25**, 2090–2098
6. **Andrey, D. O., Jousselin, A., Villanueva, M., Renzoni, A., Monod, A., Barras, C., Rodriguez, N., & Kelley, W. L., (2015)** Impact of the regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the toxic shock Tst promoter and TSST-1 expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, **10**, 1–24
7. **Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S., (2004)** Bacterial persistence as a phenotypic switch; Supplemental Materials. *Science*, **305**, 1622–1625
8. **Balaban, N. Q., (2011)** Persistence: Mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Current Opinion in Genetics & Development*, **21**, 768–775
9. **Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S., (2011)** The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, **65**, 189–213
10. **Bigger, J., (1944)** Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, **244**, 497–500
11. **Bischoff, M., Entenza, J. M. & Giachino, P., (2001)** Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 5171–5179
12. **Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., & Romby, P., (2007)** *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes & Development*, **21**, 1353–1366
13. **Bojer, M. S., Lindemose, S., Vestergaard, M., & Ingmer, H., (2018)** Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1–12
14. **Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q., (2016)** Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, **14**, 320–330
15. **Cohen, N. R., Lobritz, M. A., & Collins, J. J., (2013)** Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host & Microbe*, **13**, 632–642
16. **Conlon, B. P., Nakayasu, E. S., Fleck, L. E., LaFleur, M. D., Isabella, V. M., Coleman, K., S. N. Leonard, R. D. Smith, J. N. Adkins & Lewis, K., (2013)** Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*, **503**, 365–370
17. **Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung, A. L., Lewis, K. et al., (2016)** Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology*, **1**, 1–7
18. **Corrigan, R. M., Bellows, L. E., Wood, A., & Gründling, A., (2016)** ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, e1710-9

19. **De Jong, I. G., Haccou, P. & Kuipers, O. P., (2011)** Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *BioEssays*, **33**, 215–223
20. **Diard, M., Garcia, V., Maier, L., Remus-Emsermann, M.N., Regoes, R.R., Ackermann, M., & Hardt, W. D., (2013)** Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature*, **494**, 353–356
21. **Donegan, N. P. & Cheung, A. L., (2009)** Regulation of the *mazEF* toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on sigB expression, *Journal of Bacteriology*, **191**, 2795–2805
22. **Elliott, T. S. J., Shelton, A. & Greenwood, D., (1987)** The response of *Escherichia coli* to ciprofloxacin and norfloxacin. *Journal of Medical Microbiology*, **23**, 83–88
23. **Falla, T. J., & Chopra, I., (1998)** Joint tolerance to beta-lactam and fluoroquinolone antibiotics in *Escherichia coli* results from overexpression of *hipA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 3282–3284
24. **Fisher, R. A., Gollan, B. & Helaine, S., (2017)** Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 453–464
25. **Gardner, A., West, S. A. & Griffin, A. S., (2007)** Is bacterial persistence a social trait? *PLoS One*, **2**, 1–7
26. **Gefen, O., & Balaban, N. Q., (2009)** The importance of being persistent: Heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**, 704–717
27. **Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., & Balaban, N. Q., (2017)** TDtest: Easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay, *Scientific Reports*. **7**, 1–9
28. **Gerdes K., Gulyaev A. P., Franch T., Pedersen K., & Mikkelsen N. D., (1997)** Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annual Review of Genetics*, **31**, 1–31
29. **Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N. & Gerdes, K., (2013)** Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Molecular Cell*, **52**, 248–254
30. **Giachino, P., Engelmann, S. & Bischoff, M., (2001)** σ^B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 1843–1852
31. **Goerke, C., Campana, S., Bayer, M. G., Döring, G., Botzenhart, K., & Wolz, C., (2000)** Direct quantitative transcript analysis of the *agr* regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro. *Infection and Immunity*, **68**, 1304–1311
32. **Goerke, C., Kümmel, M., Dietz, K., & Wolz, C., (2003)** Evaluation of intraspecies interference due to *agr* polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. *The Journal of Infectious Diseases*, **188**, 250–6
33. **Gurnev, P. A., Ortenberg, R., Dörr, T., Lewis, K. & Bezrukov, S. M., (2012)** Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Letters*, **586**, 2529–2534
34. **Halebeedu, P. P., Kumar, G. S., & Gopal, S., (2014)** Revamping the role of biofilm regulating operons in device-associated Staphylococci and *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **32**, 112–123
35. **Hancock, R., & Fitz-James, P. C., (1964)** Some differences in the action of penicillin, bacitracin, and vancomycin on *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, **87**, 1044–1050
36. **Hansen, S., Lewis, K. & Vulić, M., (2008)** Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**, 2718–2726
37. **Harms, A., Maisonneuve, E. & Gerdes, K., (2016)** Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, **354**, 1390–1401
38. **Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M. & McColley, S. A., (2011)** Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **24**, 29–70

39. **Healey, D., Axelrod, K., & Gore, J., (2016)** Negative frequency-dependent interactions can underlie phenotypic heterogeneity in a clonal microbial population. *Molecular Systems Biology*, **12**, 1–11
40. **Hecker, M., Pané-Farré, J. & Völker, U., (2007)** SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **61**, 215–36
41. **Horsburgh, M. J., Aish, J. L., White, I. J., Shaw, L., Lithgow, J. K., & Foster, S. J., (2002)** SigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Journal of Bacteriology*, **184**, 5457–5467
42. **Charpentier, E., Anton, A. I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., & Novick, R. P., (2004)** Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 6076–6085
43. **Cheng, H. Y. Schantz, A. B., Song, S., Kumar, M., & Wood, T. K., (2014)** Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environmental Microbiology*, **16**, 1741–1754
44. **Cheverton, A. M., Gollan, B., Przydacz, M., Wong, C. T., Mylona, A., Hare, S. A., & Helaine, S., (2016)** A Salmonella toxin promotes persister formation through acetylation of tRNA. *Molecular Cell*, **63**, 86–96
45. **Chien, Y., & Cheung, A. L., (1998)** Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 2645–2652
46. **Chu, M., Zhou, M., Jiang, C., Chen, X., Guo, L., Zhang, M., Chu, Z., & Wang, Y., (2018)** *Staphylococcus aureus* Phenol-soluble modulins $\alpha 1$ - $\alpha 3$ act as novel toll-like receptor (TLR) 4 antagonists to inhibit HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Frontiers in Immunology*, **9**, 1–13
47. **Jōers, A., Kaldalu, N. & Tenson, T., (2010)** The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *Journal of Bacteriology*, **192**, 3379–3384
48. **Kahl, B. C., Becker, K., & Löffler, B., (2016)** Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **29**, 401–427
49. **Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., & Lewis, K., (2004)** Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **186**, 8172–8180
50. **Kim, J. S. & Wood, T. K., (2016)** Persistent persister misperceptions. *Frontiers of Microbiology*, **7**, 1–7
51. **Kim J. S. & Wood T. K., (2017)** Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. *MBio*, **8**, e00354-17
52. **Kim, W., Hendricks, G. L., Tori, K., Fuchs, B. B. & Mylonakis, E., (2018)** Strategies against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persisters. *Future Medicinal Chemistry*, **10**, 779–794
53. **Kint, C. I., Verstraeten, N., Fauvart, M. & Michiels, J., (2012)** New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends in Microbiology*, **20**, 577–585
54. **Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J., (2010)** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 423–435
55. **Koziel, R., Zablocki, K., & Duszyński, J., (2006)** Calcium signals are affected by ciprofloxacin as a consequence of reduction of mitochondrial DNA content in Jurkat cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**, 1664–1671
56. **Kubišťová, L., (2015)** Studium fenoménu perzistence u *Staphylococcus aureus*, diplomová práce, Univezita Karlova v Praze, Praha

57. **Kubistova, L., Dvoracek, L., Tkadlec, J., Melter, O. & Licha, I., (2017)** Environmental Stress Affects the Formation of *Staphylococcus aureus* Persisters Tolerant to Antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, **24**, 547–555
58. **Kullik, I., Giachino, P. & Fuchs, T., (1998)** Deletion of the alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *Journal of Bacteriology*, **180**, 4814–4820
59. **Kuroda, M. Tanaka Y, Aoki R, Shu D, Tsumoto K, & Ohta T., (2008)** *Staphylococcus aureus* giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **374**, 237–241
60. **Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J. & Wood, T. K., (2013)** Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 1468–1473
61. **Langhanki, L., Berger, P., Treffon, J., Catania, F., Kahl, B. C., & Mellmann, A., (2018)** In vivo competition and horizontal gene transfer among distinct *Staphylococcus aureus* lineages as major drivers for adaptational changes during long-term persistence in humans. *BMC microbiology*, **18**, 1–12
62. **Lechner, S., Lewis, K., & Bertram, R., (2012)** *Staphylococcus aureus* persisters tolerant to bactericidal antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **22**, 235–244
63. **Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N., & Balaban, N. Q., (2017)** Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, **355**, 826–830
64. **Lewis, K., (2007)** Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 48–56
65. **Lewis, K., (2010)** Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, **64**, 357–372
66. **Lewis, K. & Shan, Y., (2016)** Persister awakening. *Molecular Cell*, **63**, 3–4
67. **Lindsay, J. A., (2014)** *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *International Journal of Medical Microbiology*, **304**, 103–109
68. **Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. & Gerdes, K., (2013)** (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*, **154**, 1140–1150
69. **McAuley, S., Huynh, A., Czarny, T. L., Brown, E. D., & Nodwell, J. R., (2018)** Membrane activity profiling of small molecule *B. subtilis* growth inhibitors utilizing novel dual-dye fluorescence assay. *Medchemcomm*, **9**, 554–561
70. **McNamara, P. J. & Iandolo, J. J., (1998)** Genetic instability of the global regulator *agr* explains the phenotype of the *xpr* mutation in *Staphylococcus aureus* KSI9051. *Journal of Bacteriology*, **180**, 2609–2615
71. **Michiels, J. E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N. & Michiels, J., (2016)** Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resistance Updates*, **29**, 76–89
72. **Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, C. L., Langlois-Bégin, P., Michaud, S., & Malouin, F., (2006)** Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *Journal of Bacteriology*, **188**, 64–76
73. **Monk, I. R., & Foster, T. J., (2012)** Genetic manipulation of Staphylococci-breaking through the barrier. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2**, 1–9
74. **Moyed, H. S., & Bertrand, K. P., (1983).** *HipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology*, **155**, 768–775
75. **Murakami, K., Ono, T., Viducic, D., Kayama, S., Mori, M., Hirota, K., Nemoto, K., & Miyake, Y., (2005)** Role for *rpoS* gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, **242**, 161–167

76. **Nair, D., Memmi, G., Hernandez, D., Bard, J., Beaume, M., Gill, S., Francois, P., & Cheung, A. L., (2011)** Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *Journal of Bacteriology*, **193**, 2332–2335
77. **Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H. & Shapiro, H. M., (2000)** Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 827–834
78. **Orman, M. A. & Brynildsen, M. P., (2013)** Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 3230–3239
79. **Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M. G. & Gerdes, K., (2008)** Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Molecular Microbiology*, **69**, 841–857
80. **Pascoe, B., Dams, L., Wilkinson, T. S., Harris, L. G., Bodger, O., Mack, D., & Davies, A. P., (2014)** Dormant cells of *Staphylococcus aureus* are resuscitated by spent culture supernatant. *PLoS one*, **9**, 1–10
81. **Paul, J. B., Berkmen, M., Ross, W., Schneider, D., Webb, C., Foster, J., & Gourse, R., (2004)** DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, **118**, 311–322
82. **Paulander, W., Varming, A. N., Bojer, M. S., Friberg, C., Bæk, K., & Ingmer, H., (2018)** The *agr* quorum sensing system in *Staphylococcus aureus* cells mediates death of sub-population. *BMC research notes*, **11**, 1–5
83. **Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. & Schlievert, P., (1988)** Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **170**, 4365–4372
84. **Peschel, A. & Otto, M., (2013)** Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 667–673
85. **Pfaffl M. W., (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, 2003–2007
86. **Pinto, D., São-José, C., Santos, M. A. & Chambel, L., (2013)** Characterization of two resuscitation promoting factors of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology (United Kingdom)*, **159**, 1390–1401
87. **Podlesek, Z., Butala, M., Šakanović, A. & Žgur-Bertok, D., (2016)** Antibiotic induced bacterial lysis provides a reservoir of persisters. *Antonie van Leeuwenhoek*, **109**, 523–528
88. **Prax, M., Mechler, L., Weidenmaier, C. & Bertram, R., (2016)** Glucose augments killing efficiency of daptomycin challenged *Staphylococcus aureus* persisters. *PLoS One*, **11**, 1–15
89. **Proctor, R. A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J. N., & Arbeit, R. D., (1995)** Persistent and relapsing infection associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious diseases*, **20**, 95–102
90. **Proctor, R. A. Proctor, R. A., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., & Peters, G., (2014)** *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 1–8
91. **Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Chen, H., Baker, M. A. B., Ge, H., Bai, F. et al. (2016)** Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Molecular cell*, **62**, 284–294
92. **Pu, Y., Ke, Y. & Bai, F., (2017)** Active efflux in dormant bacterial cells – New insights into antibiotic persistence. *Drug Resistance Updates*, **30**, 7–14
93. **Queck, S. Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A. E., Bach, T. H., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., Ricklefs, S. M., Li, M. & Otto, M., (2008)** RNAlII-independent target gene control by the *agr*

- quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Cell*, **32**, 150–158
94. **Radzikowski, J. L., Vedelaar, S., Siegel, D., Ortega, Á. D., Schmidt, A., & Heinemann, M., (2016)** Bacterial persistence is an active σ^S stress response to metabolic flux limitation. *Molecular Systems Biology*, **12**, 1–18
 95. **Reynolds, P. E., (1989)** Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **8**, 943–50
 96. **Ridder-Schaphorn, S., Ratjen, F., Dubbers, A., Haberle, J., Falk, S., Kuster, P., Schuster, A., Mellies, U., Lowe, B., Reintjes, R., Peters, G., & Kahl, B. C., (2007)** Nasal *Staphylococcus aureus* carriage is not a risk factor for lower-airway infection in young cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, 2979–2984
 97. **Rosser, A., Stover, C., Pareek, M., & Mukamolova, G. V., (2017)** Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Critical Reviews in Microbiology*, **43**, 621–630.
 98. **Sadykov M. R., (2014)** Restriction–modification systems as a barrier for genetic manipulation of *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology*, **1373**, 9–23
 99. **Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., & Lewis, K., (2006)** Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC microbiology*, **6**, 1–9
 100. **Shapiro H.M., & Nebe-von-Caron G., (2004)** Multiparameter flow cytometry of bacteria. *Methods in Molecular Biology*, **263**, 33–44
 101. **Schilcher, K., Andreoni, F., Dengler Haunreiter, V., Seidl, K., Hasse, B., & Zinkernagel, A. S., (2016)** Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**, 5957–5967
 102. **Schmidt, N. W., Deshayes, S., Hawker, S., Blacker, A., Kasko, A. M., & Wong, G. C., (2014)** Engineering persister-specific antibiotics with synergistic antimicrobial functions. *ACS Nano*, **8**, 8786–8793
 103. **Schneewind, O., & Missiakas, D., (2014)** Genetic manipulation of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, **32**, UNIT 9C.3
 104. **Somerville, G. A., Beres, S. B., Fitzgerald, J. R., DeLeo, F. R., Cole, R. L., Hoff, J. S., & Musser, J. M., (2002)** In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. *Journal of Bacteriology*, **184**, 1430–1437
 105. **Somerville, G. A. & Proctor, R. A., (2009)** At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **73**, 233–248
 106. **Stewart, P. S., Franklin, M. J., Williamson, K. S., Folsom, J. P., Boegli, L., & James, G. A., (2015)** Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**, 3838–3847
 107. **Suligoy, C. M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., González, C. D., Alvarez, L. P., Robinson, D. A., Gómez, M. I., Buzzola, F. R. & Sordelli, D. O., (2018)** Mutation of Agr is associated with the adaptation of *Staphylococcus aureus* to the host during chronic osteomyelitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**, 1–9
 108. **Schwartz, K., Sekedat, M. D., Syed, A. K., O'Hara, B., Payne, D. E., Lamb, A., & Boles, B. R., (2014)** The AgrD N-terminal leader peptide of *Staphylococcus aureus* has cytolytic and amyloidogenic properties. *Infection and Immunity*, **82**, 3837–3844
 109. **Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., & Li, S., (2018)** Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. *Frontiers of Microbiology*, **9**, 1–11
 110. **Tan, X., Coureuil, M., Ramond, E., Euphrasie, D., Dupuis, M., Tros, F., Meyer, J., Nemazanyy, I., Chhuon, C., Guerrera, I. C., Ferroni, A., Sermet-Gaudelus, I., Nassif, X., Charbit, A., & Jamet, A., (2019)** Chronic *Staphylococcus aureus* lung infection correlates with proteogenomic and

metabolic adaptations leading to an increased intracellular persistence. *Clinical Infectious Diseases*, DOI: 10.1093/cid/ciz106 (zdroj zadán do tisku - ahead of print)

111. Tkadlec, J., Vařeková, E., Pantůček, R., Doškař, J., Růžičková, V., Botka, T., Fila, L., Melter, O., (2015) Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Czech cystic fibrosis patients: high rate of ribosomal mutation conferring resistance to MLS(B) antibiotics as a result of long-term and low-dose azithromycin treatment. *Microbial Drug Resistance*, **21**, 416–426
112. Trastoy R. Manso T., Fernández-García L., Blasco L., Ambroa A., Pérez Del Molino M. L., Bou G., García-Contreras R., Wood T. K., & Tomás M., (2018) Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clinical Microbiology Reviews*, **31**, e0023–18
113. Thoendel, M., & Horswill, A. R., (2009) Identification of *Staphylococcus aureus* AgrD residues required for autoinducing peptide biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 21828–21838
114. Tuchscher, L. Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, & Löffler B., (2010) *Staphylococcus aureus* small colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *The Journal of Infectious Diseases*, **202**, 1031–1040
115. Tuchscher, L., Geraci, J. & Löffler, B. (2017) *Staphylococcus aureus* regulator sigma b is important to develop chronic infections in hematogenous murine osteomyelitis model. *Pathogens*, **6**, 1–6
116. Verstraeten, N., Knapen, W. J., Kint, C. I., Liebens, V., Van den Bergh B., Dewachter, L., Michiels, J.E., Fu, Q., David, C. C., Fierro, A. C. et al. (2015) O₂ and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Molecular Cell*, **59**, 9–21
117. Vuong, C., Saenz, H. L., Götz, F. & Otto, M., (2000) Impact of the *agr* Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*, **182**, 1688–1693
118. Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., Ma, Q., Brown, B. L., Pu, M., Taron A., M., Benedik M., J.,Peti J., & Wood, T. K., (2011) Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nature Chemical Biology*, **7**, 359–366
119. Wang, W., Chen, J., Chen, G., Du, X., Cui, P., Wu, J., Zhao, J., Wu, N., Zhang, W., Li, M., et al. (2015) Transposon mutagenesis identifies novel genes associated with *Staphylococcus aureus* persister formation. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1–9
120. Wang, Y., Bojer, M., George, S., Wang, Z., Jensen, P., Wolz, Ch. & Ingmer, H., (2018) Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Scientific Reports*, **8**, 1–13
121. Wilmaerts, D., Bayoumi, M., Dewachter, L., Knapen, W., Mika, J. T., Hofkens, J., Dedecker, P., Maglia, G., Verstraeten, N., & Michiels, J., (2018) The persistence-inducing toxin HokB forms dynamic pores that cause ATP leakage. *MBio*, **9**, e00744-18
122. Wood, T. K., (2017) Strategies for combating persister cell and biofilm infections. *Microbial Biotechnology*, **10**, 1054–1056
123. Wu, S., De Lencastre, H. & Tomasz, A., (1996) Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: Molecular cloning and DNA sequencing. *Journal of Bacteriology*, **178**, 6036–6042
124. Wu, Y., Vulić, M., Keren, I., & Lewis, K., (2012) Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**, 4922–4926
125. Xu, T., Wang, X. Y., Cui, P., Zhang, Y. M., Zhang, W. H., & Zhang, Y., (2017) The Agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1–13