

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. Aneta Valtová

Metody charakterizace perzistentního stavu po působení vybraných
antibiotik u *Staphylococcus aureus*
Methods for characterization of persistent state after exposure to selected
antibiotics in *Staphylococcus aureus*

Diplomová práce

Školitel:

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 10.8.2020

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, paní RNDr. Ireně Liché, CSc., za vedení této diplomové práce. Velmi si vážím jejího vstřícného přístupu a ochotu kdykoli pomoci.

Dále děkuji naší paní laborantce, Lucii Jánské, za včasnou přípravu všeho potřebného.

A především děkuji své rodině a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2018-2020 a byla vypracována za finanční podpory grantu Ministerstva zdravotnictví AZV 17-30460A/2017.

Abstrakt

Staphylococcus aureus je oportunní patogen, který může způsobit těžké a chronické infekce. Důvodem recidivy bakteriálních infekcí je často tzv. perzistence. Jde o přizpůsobení se stresovým podmínkám navozením dormantního stavu, který bakteriím umožní přežít vystavení antibiotikům a po jejich eliminaci opět vyrůst. Bakterie, které v pacientovi perzistují, získávají různé adaptační mutace, které si předávají a vznikají tu tak subpopulace, které mají lepší schopnost perzistovat.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat jednotlivé metody studia perzistorů, které by se mohly v budoucnu používat v klinické praxi, a zároveň se pokusit o bližší molekulární charakterizaci perzistentního stavu pomocí metod stanovení genové exprese. K dispozici mi byly chronologické izoláty *Staphylococcus aureus*, kdy počáteční byl tzv. primoizolát, izolát odebraný při odhalení cystické fibrózy ještě před zahájením antibiotické léčby. Další pak odebraný s odstupem tříčtvrtě roku a poslední s půlročním odstupem od předchozího. Po následné celogenomové sekvenaci byly zjištěny geny, ve kterých vznikly adaptační mutace.

První metoda určuje míru schopnosti perzistovat podle stanovení CFU (Colony Forming Units) po působení antibiotika. Zjistila jsem, že tato schopnost závisí převážně na adaptaci izolátu a získaných adaptačních mutacích. Potvrdila jsem, že zásadní mutace, které vedou ke zvýšené perzistenci jsou mutace v *agr* genech. Dále jsem odhalila i další mutace vedoucí ke zvýšené perzistenci, zejména u genu *hyp*, kódujícího neznámý protein, který nebyl dosud dáván do souvislosti s perzistencí. Metodou průtokové cytometrie za použití fluorescenčních značek DiOC2(3) a TO-PRO-3 jsem určila zastoupení buněk s membránovým potenciálem, zastoupení buněk bez potenciálu a mrtvé buňky. Rozdělení do subpopulací bylo rozdílné pro použítá antibiotika. Po ciprofloxacinu ke ztrátě membránového potenciálu nedocházelo tak výrazně jako po působení oxacilinu a vankomycinu. Kontinuální kultivací v mikrotitrační destičce s pravidelným měřením optické denzity jsem sledovala vyrůstání z perzistentního stavu. Toto vyrůstání bylo pomalejší oproti normálnímu růstu bez antibiotika, a docházelo zde k prodloužení lag fáze, zejména pak po vankomycinu. Výsledky též ukázaly, že na vyrůstání z perzistence měla zásadní vliv hustota bakteriální suspenze.

Stanovila jsem expresi genů, ve kterých měly adaptované izoláty získanou mutaci (*hyp*, *agrA*, *glmU*, *rnaIII*). Z výsledků je patrné, že geny *hyp* a *glmU* vykazují vyšší expresi v nejdéle odebraném izolátu pro všechna antibiotika. Dále jsem detekovala nízkou expresi genů *agrA* a *rnaIII*, u kterých bylo již dříve prokázáno, že v chronických infekcích vykazují nižší aktivitu.

Klíčová slova: perzistence, působení antibiotik, *agr* operon, adaptační mutace, *Staphylococcus aureus*

Abstract

Staphylococcus aureus is a opportunistic pathogen that can cause severe and chronic infections. The reason of the infections relapse is often the persistence. It is about adapting to stressful conditions by inducing a dormant state, which would allow bacteria to survive exposure to antibiotics and grow again after their elimination. Bacteria that persist in the patient acquire various adaptive mutations, which are transmitted creating subpopulations that have a better ability to persist.

The aim of this diploma thesis was to compare individual methods of persistent study that could be used in clinical practice in the future, and at the same time to try a closer molecular characterization of the persistent state with using methods for calculating gene expression. I had chronological isolates of *Staphylococcus aureus* at my disposal, the initial one being the primoisolate, an isolate taken at the diagnostics of cystic fibrosis before the start of antibiotic treatment. Another was taken at a distance of three-quarters of a year and the last with a half-year interval from the previous one. Following whole genome sequencing, genes in which adaptive mutations occurred were identified.

The first method determines the degree of persistence by calculating CFU (Colony Forming Units) after antibiotic treatment. I found that this ability depends mainly on the adaptation of the isolate and the adaptation mutations obtained. I confirmed that the major mutations that lead to increased persistence are mutations in *agr* genes. I also found other mutations leading to increased persistence, especially in the *hyp* gene, which encodes an unknown protein that has not been linked to persistence yet. By flow cytometry using fluorescent labels DiOC2 (3) and TO-PRO-3, I determined the proportion of cells with membrane potential, the proportion of cells without potential and dead cells. The division into subpopulations was different for the selected antibiotics. The loss of membrane potential after ciprofloxacin was not as severe as after oxacillin and vancomycin treatment. By continuous cultivation in a microtiter plate with regular measurement of optical density, I observed the growth from a persistent state. This growth was slower than normal growth without the antibiotic and there was a prolongation of the lag phase, especially after vancomycin. The results also showed that the density of the bacterial suspension had a significant effect on the growth from persistence.

I determined the expression of genes in which the adapted isolates have the acquired mutation (*hyp*, *agrA*, *glmU*, *rnaIII*). The results show that the *hyp* and *glmU* genes evince higher expression in the longest harvested isolate after all antibiotics. Furthermore, I detected low expression of *agrA* and *rnaIII* genes, which have previously been shown to have lower activity in chronic infections.

Keywords: persistence, antibiotic treatment, *agr* operon, adaptive mutations, *Staphylococcus aureus*

Obsah

1. Úvod	8
2. Přehled literatury	11
2.1. Vymezení definice perzistence	11
2.2. Genetické změny perzistorů a vznik rezistence	12
2.3. Souhrn mechanismů vedoucích ke vzniku perzistence	15
2.4. Perzistence u <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.4.1. Adaptační změny <i>Staphylococcus aureus</i> v plicní tkáni vedoucí k chronicitě	21
2.4.2. Hlavní regulátor perzistence u <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.5. Studium perzistence – omezení a jejich řešení, výzvy a slibné metody	28
3. Materiál	33
3.1. Klinické izoláty	33
3.2. Kultivační média	33
3.3. Antibiotika	34
3.4. Enzymy	34
3.5. Chemikálie	34
3.6. Roztoky	35
3.7. Primery	35
3.8. Komerční soupravy	35
3.9. Přístroje a laboratorní vybavení	36
3.10. Programy a internetové odkazy databází	36
4. Metody	37
4.1. Kultivace bakteriální kultury v tekutém médiu	37
4.2. Kultivace bakteriální kultury na pevném médiu	37
4.3. Příprava konzerv pro uchovávání kmenů	37
4.4. Určení minimální inhibiční koncentrace klinických izolátů	37
4.5. Křivka hynutí s antibiotiky	37
4.6. Průtoková cytometrie	38
4.7. Sběr buněk pro qPCR	39
4.8. Izolace RNA	40
4.9. Převod RNA na cDNA	40
4.10. Ověření funkčnosti primerů metodou PCR	41
4.11. Horizontální gelová elektroforéza	41
4.12. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	42
4.13. Měření optické denzity	42
4.14. Mnohonásobné měření optické denzity v mikrotitrační destičce	43
5. Výsledky	44

5.1.	Charakteristika kmenů – adaptační mutace	44
5.2.	Určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) klinických izolátů	45
5.3.	Stanovení křivek hynutí pro klinické izoláty	45
5.4.	Vliv antibiotik na membránový potenciál u jednotlivých izolátů	51
5.5.	Stanovení exprese genů <i>hyp</i> , <i>glmU</i> , <i>agrA</i> , <i>rnalIII</i> metodou kvantitativní qPCR u první trojice chronologických izolátů	56
5.6.	Stanovení růstové křivky před a po působení antibiotik v mikrotitrační destičce	62
5.6.1.	Stanovení doby zdvojení u klinických izolátů	65
6.	Diskuze.....	69
7.	Souhrn.....	76
8.	Seznam použité literatury.....	77

Seznam zkratek

CF	cystická fibróza
CFU	jednotky tvořící kolonie (Colony Forming Units)
Cip	ciprofloxacin
DiOC(2)3	3,3'-dietyloxakarbocyaniniodid
FACS	fluorescent-activated cell sorting
FC	průtoková cytometrie
FSC	forward scatter, rozptyl vedený podél paprsku laseru
GWAS	genomové asociační studie
HGT	horizontální genový transfer
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MP	membránový potenciál
NETs	neutrofilní extracelulární past
OD	optická denzita
ON	noční kultura
Oxa	oxacilin
PSM	virulenční faktory <i>S. aureus</i> (phenol soluble modulins),
QS	quorum sensing
SCV	trpasličí kolonie <i>S. aureus</i> (small colony variants)
SD	směrodatná odchylka
SSC	side scatter, rozptyl vedený v úhlu 90 ° vůči paprsku laseru
TA	toxin-antitoxin
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin
TO-PRO-3	TO-PRO-3 iodid
Van	vankomycin
VBNC	životaschopné, ale nekultivovatelné buňky (viable but nonculturable cells)

1. Úvod

Před více než sedmdesáti lety pánové Hobby a Bigger pozorovali, že antibiotika nedokáží zabít celou bakteriální populaci, na kterou antibiotiky působili. Tuto subpopulaci, která dokázala intenzivní vystavení antibiotikům přežít, nazvali „perzistoři“ (Bigger, 1944). V následujících letech se díky rozmachu antibiotické léčby objevovaly mnohé případy bakteriální rezistence, která se díky své snazší uchopitelnosti, dostala do popředí vědeckého zájmu a perzistenci nebyla věnována pozornost. Posledních patnáct let se však kvůli častému selhávání v léčbě chronických infekcí dostala do popředí zájmů vědců v různých částech světa, kteří přinesli mnoho zajímavých poznatků o tomto velmi komplexním jevu.

Perzistentní buňky jsou malá frakce buněk v populaci schopná přežít letální dávky antibiotik a po jejich odstranění opět vyrůst a dále se množit. Tato schopnost není geneticky podmíněná a po opětovném vystavení antibiotikům se perzistentními buňkami mohou stát jiné buňky (Balaban et al. 2004). Fenomén perzistence se objevuje napříč bakteriálními druhy, a i když jde o jev velmi rozmanitý, dají se zde nacházet i podobnosti.

Tato práce je zaměřena na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*, pro kterou jsou rekurentní infekce primárním problémem (Lowy, 1998). *S. aureus* nás běžně osidluje, a jen při oslabení imunity, se pro nás může stát patogenní.

Bakterie *S. aureus* je v průběhu chronických infekcí nacházená často jako fenotyp nazvaný SCV (small colony variants). Tyto kolonie jsou díky své malé velikosti a odlišnému zbarvení na plotnách jednoduše rozpoznávány. Protože jde o varianty způsobující intracelulární infekce, vznikla hypotéza, že jsou tyto buňky základem pro rozvoj perzistentní infekce (Balwit et al. 1994). Jejich studium přináší lepší pochopení fenoménu perzistence, protože mají společné metabolické změny vedoucí k pomalému růstu, nižší expresi virulenčních faktorů a vyhýbaní se imunitním systémem. Ukázalo se, že existuje mnoho cest, kterými zlatý stafylokok dokáže tento fenotyp vytvářet (Proctor, 2019).

Co se týče metabolické aktivity perzistorů, je téměř jisté, že za vyhnutí se baktericidnímu účinku antibiotik je zodpovědná hlavně dormance, tedy celkové utlumení metabolické aktivity a genové exprese (Kwan et al. 2013).

I když nejde o dědičný fenotyp, ukazuje se, že různé genetické mutace schopnost perzistovat buď významně zvyšují, nebo snižují. Například zvýšená exprese genu *hipA* u *E. coli* zvýšila frakci perzistorů až tisíckrát (Korch & Hill, 2006). U bakterie *Staphylococcus aureus* se jako klíčový gen při tvorbě perzistorů ukázal být *sigB*, jehož produkt indukuje obecnou stresovou odpověď a tvorbu virulenčních faktorů (Tuchscher et al. 2015). Další prováděné sekvenční analýzy klinických izolátů prokázaly, že ke genetickým změnám dochází u pacientů soustavně, a to nejen hromaděním mutací pod selekčním tlakem, ale i aktivně horizontální výměnou genetického materiálu (Langhanki et al. 2018).

Léčbu též komplikuje existence biofilmu, který bakteriím pomáhá vyhýbat se antibiotikům i imunitnímu systému hostitele. Plíce cystických fibriotiků podléhají epiteliálním změnám, které vytvářejí ideální podmínky pro vznik takového biofilmu. V biofilmu mají bakteriální buňky též usnadněnou komunikaci pomocí signálních molekul, tzv. quorum sensing (QA). Molekuly zapojeny v tomto modulu se již několikrát ukázaly jako induktory perzistentního stavu u různých bakteriálních druhů, například u *Pseudomonas aureginosa* (Möker, Dean & Tao, 2010). U *S. aureus* zase naopak některé QS molekuly nejspíše podporují výstup z perzistentního stavu (viz kapitola 2.3.).

Protože je pro nás perzistence významná převážně z klinického hlediska, je důležité definovat metody, které přítomnost perzistorů odhalí a stanovit pravidla pro léčbu infekcí u jednotlivých pacientů. V laboratořích jsou používány kvantifikační testy, ale do klinické praxe je snaha zavést metody, které by nebyly závislé na dlouhé kultivaci a velkém množství materiálu, a také byly průkaznější. Nejúčinnější by mohlo být zautomatizování vyšetření na základě znalosti genotypu, které se i přes komplexnost fenoménu, díky častému sekvenování izolátů, stává reálným (Van den Bergh et al. 2016). Nejprve je však třeba důkladně popsat jaké adaptační změny s perzistencí bezprostředně souvisí.

V této práci byl prováděn výzkum s chronologickými izoláty *Staphylococcus aureus*, které byly odebrány pacientům trpících cystickou fibrózou. Celkem jsem zpracovala 7 chronologických izolátů od dvou různých pacientů, kdy první byl tzv. primoizolát – izolát odebraný v momentě diagnózy cystické fibrózy. Další dva byly izoláty od stejného pacienta odebrány s odstupem přibližně třičtvrtě roku a poslední izolát po dalším půl roce, tedy jeden a čtvrt roku od prvního (viz kapitola 3.1.). Příbuznost byla stanovená na základě MLST genotypizace. Díky znalosti genotypu a otestování schopnosti perzistovat rozličnými metodami posoudím, jak se schopnost perzistovat v čase změnila a dále porovnáím vhodnost jednotlivých metod. 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 zavedenou metodou stanovení CFU a zjistit, zda dochází ke změně v rámci chronologických izolátů v čase a porovnat tuto schopnost u izolátů se vznikajícími adaptačními mutacemi.
2. Pomocí průtokové cytometrie sledovat změny vitality buněk na základě změn membránového potenciálu u klinických izolátů *S. aureus* od pacientů s CF po působení různých antibiotik.

3. Sledovat změny genové exprese u genů, v kterých byly u chronologických izolátů nalezeny adaptační mutace, které korelovaly se změnou schopnosti perzistovat. Těmito geny byly: *hyp* (gen pro protein s hypotetickou funkcí), *glmU*, *agrA*, *rnaIII*.
4. Otestovat dosud nezavedenou metodu pro sledování vyrůstání z perzistentního stavu na základě kontinuálního měření OD.

2. Přehled literatury

2.1. Vymezení definice perzistence

Když hovoříme o perzistenci, hovoříme o komplexním stavu, do kterého se mohou bakteriální buňky dostat více způsoby a pod různými tlaky. Bakteriální buňky jsou po svůj život vystaveny rozličným stresům, nejčastěji limitaci zdrojů živin, oxidačnímu stresu nebo imunitní odpovědi hostitele. Buňky mohou pro přežití přejít do perzistentního stavu a taková perzistence je někdy nazývána perzistencí „navozenou“, nebo také perzistencí typu I. Nicméně i při vyváženém růstu nebývá bakteriální populace heterogenní a buňky mohou přecházet do perzistence samovolně, tento typ perzistence je nazýván „spontánní“ neboli perzistencí typu II. Tímto způsobem však vznikají perzistori v populaci s menší frekvencí (Amato et al. 2013).

Protože je perzistence podobná dalším procesům, které umožňují bakterii přežívat v hostiteli stává se z perzistorů těžko odlišitelná subpopulace, pro níž je nezbytné stanovit parametry, podle kterých se bude tato subpopulace odlišovat a analyzovat jako samostatný celek.

Za prvé je třeba rozlišovat termíny perzistence a perzistentní infekce. Pokud hovoříme o infekci, hovoříme o přetrvávajícím stavu, kdy se nedaří zcela odstranit infekční agens z těla pacienta a dochází k neustálým návratům infekce. Jde o rozmanité obtíže, kdy různé bakteriální druhy využívají různé mechanismy pro vyhnutí se imunitnímu systému. Například se zde často uplatňuje tvorba biofilmu (viz kapitola 2.3.). Za další samostatný typ perzistence lze ještě označit intracelulární přežívání v hostiteli, kdy bakteriální buňka perzistuje uvnitř makrofágů, tento typ perzistence však není předmětem této diplomové práce.

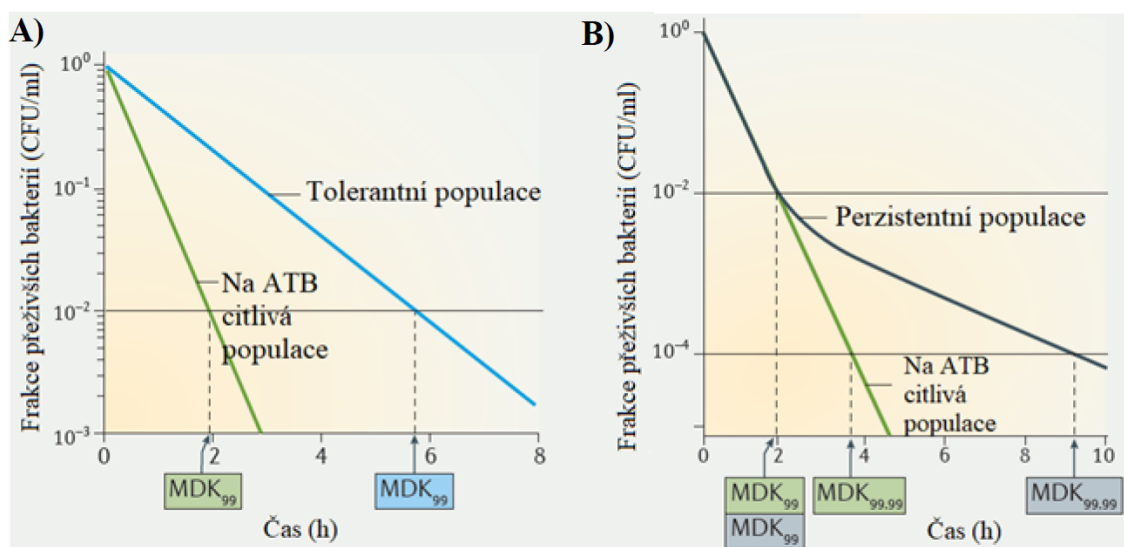
Jelikož v laboratorních podmínkách se dá perzistence zkoumat pouze jako navozená vnějším podnětem, jsou následující rozlišení stanovená právě pro tento typ. K vymezení nejlépe slouží křivka ukazující hynutí bakterií v čase po vystavení letální koncentraci antibiotik (time-kill assay) (viz obrázek č. 1). Perzistentní populace je charakteristická tím, že její křivka hynutí po aplikaci antibiotik vykazuje bifázický průběh, to znamená rychlý úbytek velké části populace v počátcích antibiotikového působení, a poté pomalé ubývání přeživší – perzistentní subpopulace.

Hranice mezi bakteriální rezistencí a perzistencí je nejostřejší. Rezistentní buňky jsou totiž schopné růst a množit se i za přítomnosti letálních dávek antibiotik. Navíc jsou geny podmiňující rezistenci přenášeny mezi druhy, a to jak vertikálně, tak horizontálně.

Naopak nejméně ostrá hranice je mezi perzistentními a tolerantními buňkami pro jejichž odlišení se musí zjistit kinetika hynutí. Perzistentní buňky jsou také označovány jako přechodně tolerantní fenotypové varianty a díky různé fyziologii přežívají pod různými antibiotiky s různou koncentrací, což představuje velkou terapeutickou výzvu (Levin & Rozen, 2006). Oproti toleranci se perzistence nevyznačuje zvyšováním MIC. Na křivce popisující bakteriální toleranci je vidět dlouhodobé a pozvolné umírání pod antibiotiky, ale beze změn v jejich MIC. Na perzistentní buňky je možno pohlížet jako na „heterotolerantní“ frakci, která dokáže přežívat pod antibiotiky

lépe než buňky označované jako tolerantní, což se odráží v jejich bifázické křivce hynutí (shrnuto v review Brauner et al. 2016, viz obrázek č. 1).

Je důležité zmínit, že literatura často mluví o tzv. VBNC (viable but nonculturable cells) buňkách, které se většinou vyskytují společně s perzisteními buňkami a jsou stejně jako ony dormantní. Přesto jde v zásadě o jiný typ buněk. VBNC jsou též jako perzistori častou součástí chronických infekcí, protože dokáží přežít antibiotickou léčbu, a tak společně vytváří majoritní problém recidivy infekcí, což bylo popsáno také u *S. aureus* (Pasquaroli et al, 2013). Jejich hlavní rozdíl spočívá v „hloubce“ dormance. Zatímco perzistori se po odstranění stresu vrátí do metabolicky aktivního stavu poměrně rychle, VBNC k tomu vyžadují daleko více času nebo speciální chemický či environmentální signál (Ayrapetyan, 2015). Protože tyto dvě subpopulace koexistují společně, vytváří se kritický pohled na metody, které perzistory kvantifikují na základě kultivace, zde jsou totiž VBNC přehlíženy (Ayrapetyan, 2018).



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 perzistorů. 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.

2.2. Genetické změny perzistorů a vznik rezistence

O perzistentních buňkách nemluvíme jen v souvislosti s bakteriemi. Tento termín je používán i v souvislosti s dalšími buněčnými typy, včetně eukaryotních. U kvasinek je perzistencí nazývána tolerance na antifungální látky (LaFleur 2006), u nádorových buněk zase schopnost přežít chemoterapeutickou léčbu (Sharma 2010). Dá se tedy říct, že jde o jakýsi evoluční způsob přežití.

U bakterií byla perzistence popsána napříč druhy se zástupci u grampozitivních i gramnegativních bakterií. Kromě toho, že perzistori vznikají díky zásahu zvenčí, preexistují v rámci populace i v normálních podmínkách. Hovoříme o tzv. „bet-hedging“ strategii, kdy rozdílné frakce buněk přepínají do rozličných fenotypů, které by populaci umožnily přežít v náhodných enviromentálních změnách (Philippi & Seger, 1989). Tyto náhodně vznikající fenotypy sice stojí populaci energii, ale zvyšují její šance na přežití v měnících se podmínkách. Ukázalo, že stupeň heterogenity populace je úměrný dynamice změn prostředí (Carja et al. 2014). Podle tohoto pravidla je i nárůst subpopulace perzistorů o to větší, čím větším dávkám antibiotik je populace vystavena nebo čím déle jim je vystavena. Uvedenou teorii potvrzují i klinické studie, o kterých se zmiňují dále. Tyto studie srovnaly hladinu perzistorů při chronické infekci, kde léčba byla dlouhodobá, a při prvně propuknuté nebo akutní infekci. Výsledky ukazují jasně vyšší hladinu perzistentní populace u chronických infekcích.

V současné době je také zkoumán vztah mezi perzistencí a rezistencí v naději, že by získané poznatky mohly zlepšit léčbu přetrvávajících infekcí a zároveň pomoci předcházet vzniku rezistentních kmenů. Je již jisté, že perzistence hraje významnou roli v evoluci rezistence. Tato teorie se objevila již před více než 30ti lety na základě častého současného výskytu tolerance na penicilin a mnohačetné rezistence v klinických izolátech *Streptococcus pneumoniae* (Liu & Tomasz, 1985). Vysvětlení této spojitosti je vícero. Jednoduše se dá říci, že perzistentní buňky tvoří jakýsi rezervoár životaschopných buněk, ve kterých může časem dojít k chromozomálním mutacím nebo horizontálnímu genovému přenosu genů vedoucímu k rezistenci (Levin 2006). Při bližším pohledu, stresované buňky neustále kumulují genetické mutace způsobené hlavně poškozením DNA (Yaakov, 2017). Poškození DNA spouští stresovou odpověď (SOS response), která se již dříve ukázala jako faktor zvyšující množství perzistorů v populaci (Bernier et al. 2013), a také množství SCV, o kterých pojednávám níže (Vestergaard, Paulander, Ingmer, 2015). Kromě toho je SOS odpověď spojena se zvýšeným horizontálním přenosem rezistentních genů, který hraje zásadní roli v šíření a následném nárůstu rezistencí (Baharoglu, Garriss & Mazel, (2013).

První teoretický model s použitím matematických výpočtů ukázal nárůst rezistentních buněk společně s perzistentními (Levin & Rozen 2006). Též provedením několika praktických experimentů se prokázalo, že společně s perzistencí roste i míra rezistentních kmenů.

První z nich, byl experiment, který ukázal, že po vystavení antibiotickému stresu prvotně vznikaly takové mutace vedoucí k prodloužení fáze „zpoždění“ neboli lag fáze. Geny byly souhrně nazvány *tbl* (tolerance by lag) a jsou asociované s některými drahami, které se ukázaly být zodpovědné za zvýšenou perzistenci. Pozorovali, že lag fáze před opětovným růstem, kdy byla antibiotika odstraněna, byla optimalizovaná intervalům mezi expozicemi ampicilinu. Vývoj lag fáze je pozoruhodnou demonstrací přizpůsobení se trvání stresu, nikoli specifickému stresovému signálu. Lag je běžně považován za nevyhnutelné zpoždění pro přizpůsobení se

novým podmínkám prostředí. Tato studie ukazuje lag fázi v jiném světle, a to jako výhodnou vlastnost pro zamezení růstu v nepříznivých podmínkách, kterou bakterie schopná perzistovat vyvíjí pod selekčními tlaky (Fridman et al. 2014).

Hodně citovaný je i další experiment, který pracoval s několika rozdílnými kmeny *Escherichia coli*. Ty byly denně vystavovány terapeutickým dávkám ampicilinu a jejich tolerance k němu postupně narůstala. Levin-Reisman a její skupina sledovala též prodloužení lag fáze, a také výrazné zvyšování MIC u všech kmenů. Po osekvenování kmenů zjistili, že dochází k různým mutacím zodpovědným za rapidní nárůst tolerance, a že je tento nárůst přímo úměrný expozici ampicilinu. Na tomto genetickém pozadí se po několika cyklech objevily mutace v promotoru genu *ampC*, který uděluje buňkám rezistenci k ampicilinu. Dále dokázali, že tyto rezistentní mutace se na pozadí tolerantního (perzistentního) fenotypu snadněji fixují a hůře mizí při dalším vystavení ampicilinu (Levin-Reisman et al. 2017).

Další recentní experiment s kmeny *Escherichia coli*, s použitím jiného antibiotika došel k podobným závěrům. Ukázal nárůst rezistence k ciprofloxacinu společně s tolerancí u náhodně vybraných přírodních izolátů *E. coli*, a navíc dokázal i jasnou pozitivní korelaci mezi perzistencí a rychlostí mutagenese (Windels et al. 2019).

Podobné korelace byly nacházeny i u dalších kmenů, jmenovitě kmeny *Pseudomonas* u antibiotik ciprofloxacinu a rifampicinu (Vogwill, 2016) nebo u druhu *Mycobacterium tuberculosis* u antituberkulotik rifampicinu a moxifloxacinu (Sebastian, 2016). Protože jsou vztahy mezi perzistencí a rezistencí nacházeny mezi odlišnými kmeny a zároveň i u antibiotik s rozdílným působením, dá se říci, že jde o obecný fenomén.

Je ještě zajímavé zmínit jednu dřívější studii, která poskytla širší pohled na problematiku a ukázala, že záleží na tom, jestli je vystavení stresu stálé, pak vzniká rezistence nebo přerušované, což vede k toleranci či perzistenci (Kusell et al. 2005). Samotná existence stresu je tedy to, co tyto dva fenomény spojuje a individuální vlastnosti stresu pak to, co je determinuje.

I když perzistence není geneticky podmíněná a není předávána vertikálně, ukázalo se, že v ní hraje roli horizontální genový transfer (HGT). Z recentní studie Langhanki a spolupracovníků z roku 2018 vyplynulo, že mezi stafylokoky v hostiteli probíhá HGT, která vytváří dominantní linii schopnou v hostiteli perzistovat déle ve srovnání s ostatními liniemi. Jako důkaz jim posloužil fakt, že tyto dominantní linie měly identickou sadu mobilních genetických prvků (Langhanki et al. 2018). Již dříve bylo publikováno, že HGT a vznik mutací je poháněn mezibakteriální konkurencí (Denamur & Matic, 2006). Tato studie tuto hypotézu podpořila.

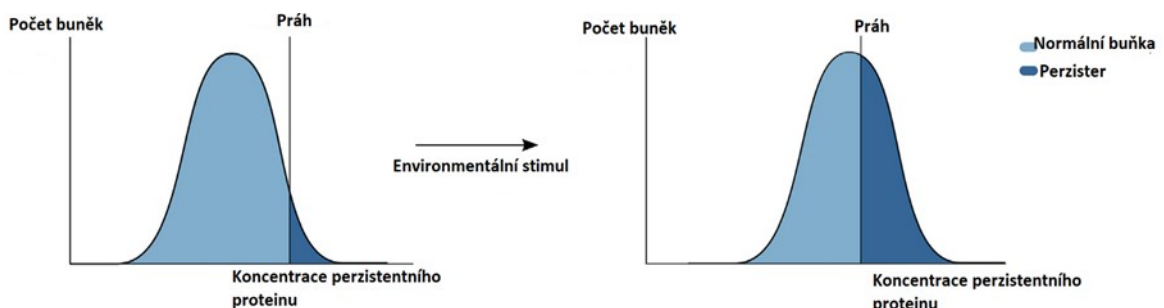
Díky vzrůstajícímu počtu sekvenčních dat se objevují snahy predikce perzistentních fenotypů na základě těchto dat tzv. GWAS (genom-wide association studies). Protože měl tento přístup úspěch již dříve u předpovídání bakteriální virulence u izolátů MRSA (metilicilin rezistentní *S. aureus*) (Laabei et al. 2014), vzniká snaha rozšířit tuto metodu i na predikci perzistorů. Dříve se to zdálo nemožné, protože perzistence se jevila jako něco velmi

heterogenního, ale dnes je daleko lépe chápána i její univerzálnost a do budoucna by GWAS mohl být užitečným nástrojem nejen v odhalování, ale i v eliminaci vzniku perzistentních buněk.

2.3. Souhrn mechanismů vedoucích ke vzniku perzistence

Způsob, jakým perzistentní buňka vzniká, se dá vymeziť do dvou hlavních kategorií. První je spontánní (stochastický) způsob, a druhý deterministický. Vzhledem k již několikrát zmíněné heterogenitě perzistentní populace se na jejím vzniku, s největší pravděpodobností, podílí stochastické a deterministické způsoby zároveň, a jejich působení je synergické (shrnutí v review Lewis, 2010). Stejně tak působí synergicky vystavení více stresům zároveň. Například, pokud byly bakterie vystaveny tepelnému, oxidativnímu nebo osmotickému stresu, vedlo to po následném vystavení antibiotik ke zvýšené schopnosti perzistovat (Murakami et al. 2005; Pandey, Sahukhal & Elasri, 2019; Kubistova et al. 2017). Skupina Natalie Balaban dále dokázala, že spontánní vznik perzistorů je daleko vzácnější než determinovaný (Balaban et al. 2004). Zároveň bylo později ukázáno, že vnějším podnětem lze navodit perzistenci téměř u celé populace (Kwan et al. 2013).

Spontánní vznik operuje s tím, že v bakteriální populaci existuje vysoká variabilita v genové expresi mezi jednotlivými buňkami, a u některých z nich tak dochází k nahodilému přepnutí do perzistentního stavu. U bakterie *E. coli* byl tento nahodilý vznik pozorován bez působení jakéhokoli stresu (Balaban et al. 2004). Tato teorie zároveň počítá s existencí perzistentních proteinů, které v současnosti nejsou popsány, a které po dosažení určité koncentrace (prahu) přepnou buňku do perzistentního stavu (viz obrázek č. 2). Variabilita v genové expresi a následná fluktuace perzistentních proteinů je zároveň ovlivňována environmentálními stimuly, které mohou zvyšovat počet buněk, kterým se podaří překročit práh a stát se perzistentními (Verstraeten et al. 2016; viz obrázek č. 2). Tyto poznatky blíže vysvětlují i „bet-hedging“ strategii zmíněnou výše.



Obrázek č. 2: Grafické znázornění spontánního vzniku perzistorů v populaci na levé straně a stejné situace podpořené environmentálními stimuly na straně pravé. K přepnutí do perzistentního stavu dochází, když jakési perzistentní proteiny dosáhnou prahové koncentrace. Převzato a upraveno z Verstraeten et al. 2016

Deterministický vznik je naproti tomu závislý na vnějším stimulu. Stimulů vedoucích k perzistenci je zaznamenáno mnoho a v podstatě jde vždy o stresový faktor. Souhrn těch nejvýznamnějších zaznamenaných „spouštěčů“, tak jak je lze nacházet v literatuře, uvádím níže:

Antibiotika: Prvně se zmíním o klinicky nejvýznamnějším, a to o vzniku působením antibiotik. Bylo publikováno, že antibiotika „plodí“ perzistory vždy, ale jejich množství je závislé na tom, o které antibiotikum se jedná (Hofsteenge, van Nimwegen, Silander, 2013). Je nutné říct, že antibiotika perzistentní buňky úplně nevytváří, ale spíše je selektují od zbytku populace. Protože jen buňky schopné odolat baktericidnímu stresu můžeme posléze charakterizovat jako perzistentní a zkoumat jejich fyziologii. Většina výzkumníků se spoléhá na takovéto oddělení perzistorů pomocí antibiotik. Problém je ale v tom, že samotná antibiotika mohou ovlivnit fyziologii bakterií a tím můžeme získávat nepravdivé informace o tom, jaký stav je pro perzistory vlastně typický (Lewis, 2010).

Co se tohoto týče, tak po zaměření se na metabolickou aktivitu perzistentních buněk se ukázalo několik důvěryhodných argumentů potvrzující dormantní stav. Dá se vyjít ze skutečnosti, že stresové reakce u bakterií jsou vždy doprovázeny výrazně sníženou růstovou rychlostí (Hengge-Aronis, 2002) a dále byly provedeny i detailnější studie. Když se sledovala rychlost růstu těchto buněk zjistilo se, že perzistentní buňky jsou nerostoucí nebo alespoň pomalu rostoucí buňky (Balaban, 2004; Maisonneuve, 2013). Dále byly předloženy přesvědčivé důkazy o inhibici transkripce a translace, protože v takovém případě se počet perzistorů zvýšil až o pět řádů (Kwan et al. 2013). Perzistory lze tedy s určitými výhradami opravdu označovat za dormantní. A dormanci lze vysvětlit i přežívání perzistentní populace pod antibiotiky, jelikož antibiotika cílí na aktivně rostoucí buňky a dormanci se pro ně snižuje počet cílových míst.

Pro úplnost je ale nutné zmínit, že pouhou dormanci se heterogenita ve fyziologii perzistorů vysvětlit nedá. Důvodem je skutečnost, že i když je výsledkem dormantní stav, buňky do něj vstupují různými aktivními mechanismy na základě svého genetického programu, a proto se často objevují argumenty proti dormanci. Příkladem může být studie s *E. coli*, kde byla ukázána aktivní obrana proti antibiotiku, a to jeho aktivním efluxem ven z buňky (Pu et al. 2016). Nebo také studie, které argumentují tím, že snížení cílových míst pro antibiotika nevysvětluje poškození DNA u perzistorů vystavených fluorochinolonům (Volzing & Brynildsen, 2015; Mok & Brynildsen, 2016). O dalších takových případech pojednávám v kapitole o adaptačních změnách *S. aureus* (viz kapitola 2.4.1.).

Otázka, zda jsou perzistoři aktivní nebo pasivní, je ve skutečnosti otázkou, zda analyzujeme buňky v reakci na stres nebo buňky, které již dosáhly perzistentního stavu. I když většina buněk aktivně reaguje na stres, jsou to pouze přeživší buňky, které můžeme později označovat jako perzistentní.

Stringentní odpověď: S dormancí souvisí další mechanismus, a to odpověď mikroorganismu na hladovění. Stringentní odpověď je obecně odpověď na nepřítomnost aminokyselin, kdy vlivem hromadění nenabitých tRNA na ribozomu dochází k inhibici translace (Goldman & Jakubowski, 1990). Při jejím spuštění se produkují alarmony souhrně pojmenované jako (p)ppGpp (Potrykus & Cashel, 2008). Tato molekula byla spojena s perzistencí již mnohokrát. Důvodem je její pleiotropní efekt. Molekula (p)ppGpp inhibuje kromě translace a transkripce i replikaci a též zapříčiňuje snížení metabolismu nepřímou i přímou cestou. Poznatků o tom, jak toho dosahuje, je nesčetně a výsledkem je vždy dormantní stav charakteristický pro perzistenci.

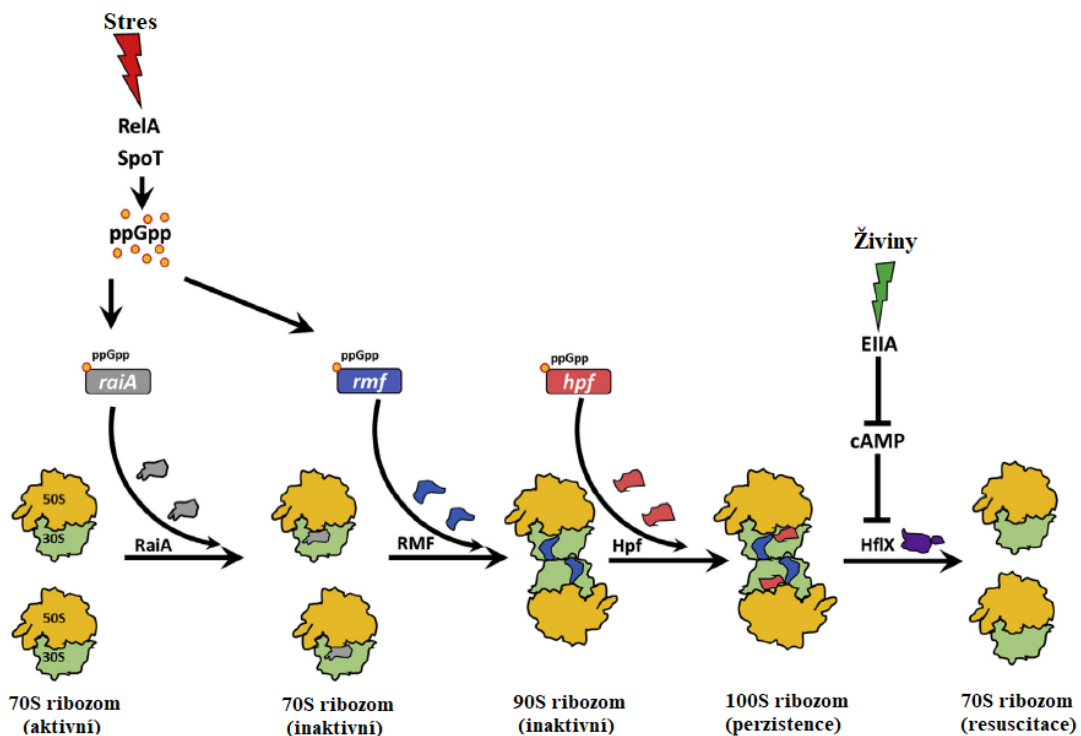
Jak přesně pomáhá (p)ppGpp bakteriím vyhnout se toxicitě antibiotik, mohu uvést alespoň na dvou případech. Za prvé zvýšená hladina (p)ppGpp inhibuje DNA-vazebné proteiny spolupracující s DNA gyrázou, která je zodpovědná za negativní superspiralizaci DNA. Tímto způsobem se mohou buňky vyhnout účinku fluorochinolonů, které DNA gyrázu inhibují (Amato et al. 2013). Druhý experiment, ukázal, že zvýšení hladiny alarmonu (p)ppGpp vedlo k inhibici biosyntézy buněčné stěny (BS), čímž se výrazně zabránilo účinku beta-laktamových antibiotik (Amato & Brynildsen 2015).

Protože jsou všechny popsány mechanismy, jakými (p)ppGpp přispívá k tvorbě perzistorů nepřímé, ráda bych ještě uvedla nedávnou studii, která hovoří i o přímém vlivu. Výzkumná skupina z Pensylvánské univerzity totiž představila velice zajímavý model, kdy jsou perzistori vytvářeni přímo působením alarmonu (p)ppGpp, který umožní dimerizaci ribozomu, což vede ke snížení translace, tedy k nižší proteosyntéze a navození dormance (Song, 2020).

Studie navázala na nedávné zjištění, že resuscitace perzistorů zpět do aktivního stavu je také zapříčiněna hladinou aktivních ribozomů, kdy po dosažení jejich určitého počtu, buňky přepnul do metabolicky aktivního stavu a začaly se rychleji zvětšovat a dělit (Kim et al. 2018).

K takové dimerizaci, jsou zapotřebí faktory modulující ribozom (RaiA, RMF, Hpf), a na ně nukleotid (p)ppGpp cílí. Za prvé, indukuje expresi genu pro RaiA (ribozom asociovaný inhibitor), který inaktivuje 70S ribozomy. Jeho přítomnost též snižuje expresi RMF (ribozom modulační faktor), který z dvou neaktivních 70S ribozomů utváří jeden 90S dimer (Ueta et al. 2005). O této dimerizaci se též nedávno zjistilo, že je zásadní pro přežití bakterií ve stacionární fázi (Yoshida, 2018). Nukleotid (p)ppGpp také indukuje expresi genu pro kofaktor Hpf, který 90S převádí na nefunkční 100S ribozom. (viz obrázek č. 3). Právě těchto forem ribozomu bylo v perzistorech naměřeno vysoké množství. Dále se studie opírá o důkazy, kdy delecí RMF, Hpf a RaiA (Δrmf , Δhpf , $\Delta raiA$) se počet perzistorů, oproti wild-typu, významným způsobem snížil. Stejně mutanty též prokázaly vyšší schopnost resuscitace z perzistentního stavu do aktivního (Song, 2020).

Tato studie je významná také proto, že GTPáza HpF je konzervována napříč bakteriálními druhy (Prossliner et al. 2018). Takže se dá proto předpokládat, že tento způsob vzniku perzistorů nebude nijak ojedinělým.



Obrázek č. 3: Grafické znázornění dimerizace ribozomů vedoucích ke vzniku perzistentního stavu. Po vystavení buňky hladovění, vzniká molekula ppGpp, ta indukuje inaktivaci ribozomu 70S prostřednictvím inhibitoru RaiA. Dále indukuje faktory RMF a Hpf, které se aktivně podílejí na dimerizaci ribozomu do konečně nefunkční podoby 100S, která je charakteristické pro perzistory. Po přidání glukózy, dochází k resuscitaci perzistorů skrze rozdělení dimeru dva aktivní 70S ribozomy. Jako senzor změny nutričního stavu zde slouží molekula cAMP, jejíž snížená koncentrace vede k produkci HflX který disociuje 100S a tím přepne buňky zpět do aktivního stavu. Převzato a upraveno z Wilmaerts et al. 2019.

Závěrem bych ještě zmínila, jak mohou poznatky o zapojení (p)ppGpp v perzistenci pomoci v praxi. Molekulu (p)ppGpp syntetizují enzymy RelA/SpoT a ty se zdají být slibnými kandidáty pro cíl léčiv. Vědci totiž dokázali, že po deleci enzymu RelA byl kmen *Mycobacterium tuberculosis* neschopný přepnout do perzistentního stavu (Kushwaha, 2019). Také delece genů pro tyto enzymy ($\Delta relA$ a $\Delta spoT$) vedla u *E. coli* ke snížení perzistence (Amato et al. 2013).

TA: Centrem zájmu ve výzkumu perzistence byly od začátku také toxin-antitoxin systémy (dále jen TA). Již první gen daný do souvislosti s perzistencí je součástí TA II systému. Gen byl nazvaný *hipA* (high-persistence gene), protože kmen *Escherichia coli* mutovaný v tomto genu poskytoval vysoké množství perzistorů (Moyed & Bertrand, 1983). HipA je toxin a jeho příslušný antitoxin byl nazván HipB, dohromady tak tvoří TA nazvaný HipBA. Jako ve všech typech TA II modulu, antitoxin HipB neutralizuje toxin HipA pevnou vazbou (Black, Irwin &

Moyed, 1994). Volný toxin HipA přepíná buňky do perzistentního stavu inhibicí translace, tak, že deaktivuje tRNA fosforylační glutamyl-tRNA syntetázu. Takto inhibovaná translace též spouští stringentní odpověď, o které je pojednáno výše.

V posledních letech bylo nalezeno mnoho dalších TA systémů ovlivňujících perzistenci rozdílnými způsoby, z nichž některé TA systémy působí v synergii. Navíc se dá předpokládat, že díky různým cílům TA systémů budou mít mutace v různých TA systémech na míru perzistence rozdílný vliv (Kim, 2016). Role TA je studována převážně na *E. coli*, která patří mezi G- bakterie. Evidence o zapojení TA u G+ bakterií je téměř neznámá. U *S. aureus*, který byl předmětem studia v této diplomové práci se dokonce prokázalo, že delece predikovaných TA systémů (*mazEF*, *relBE* homology: *axel(2)/txel(2)*), nijak nezměnily množství vytvořených perzistorů (Rowe et al. 2016).

Snížení energie v buňce: Persistence byla také asociovaná s redukcí množství ATP v buňce vznikajícího pomocí protonmotivní síly na cytoplazmatické membráně. Důkazy poskytl experiment, kdy byly buňky *E. coli* preinkubovány s protonoforem CCCP, který zkratoval membránový potenciál. Po následném přidání antibiotik a kvantifikaci vzniklých perzistorů, bylo zaznamenáno jejich významné zvýšení oproti případu, kdy protonofor přidán nebyl (Kwan et al. 2013).

Vysvětlením může být skutečnost, že nízká hladina ATP redukuje proteosyntézu, DNA replikaci či syntézu peptidoglykanu, čím vzniká zvýšená tolerance buněk k aminoglykosidovým, beta-laktamovým či fluorochinolonovým antibiotikům, které na tyto buněčné aktivity cílí (Shan et al. 2017). Dále se ještě nízká koncentrace ATP ukázala být zodpovědná za tvorbu proteinových agregátů, které následně vedly k buněčné dormanci (Pu et al. 2018).

Možností léčit perzistentní infekce pomocí jejich přepnutí zpět do aktivního stavu zvýšením membránového potenciálu se aktivně zabývá též klinický výzkum.

Stáří inokula: Při srovnání množství perzistorů v rostoucích fázích se ukázalo, že zde existuje významná korelace mezi stářím inokula a frekvencí perzistentních buněk (Luidalepp et al. 2011). Stacionární fáze vykazuje daleko větší podíl perzistorů než fáze exponenciální (Lechner et al. 2012). Vysvětlení lze hledat ve fyziologických změnách buněk stacionární fáze. Typický znak stárnoucí buňky je stále vyšší tvorba proteinových agregátů, což potvrdil experiment s *E. coli*, kde se opravdu ukázala pozitivní korelace s těmito agregáty a množstvím perzistorů (Leszczynska et al. 2013). Dále lze hledat vysvětlení ve skutečnosti, že déle žijící buňky mají z principu více poškozené komponenty, jako oxidované proteiny nebo poškozenou DNA. Tohle vše ve výsledku zpomaluje růst, následkem čehož vznikají různé fenotypové varianty (Nyström, 2007). Dalším faktem je, že starší buňky vykazují nižší metabolickou aktivitu, a tím se z podstaty

snižuje množství cílů pro antibiotika. Například beta-laktamová antibiotika nemohou cílit na buňky, které aktivně nesyntetizují buněčnou stěnu.

Biofilm: Povrchově aktivní komunita bakterií, zvaná biofilm, znesnadňuje eradikaci a je příčinou mnoha chronických infekcí. Nebylo proto velkým překvapením, že je spojena i s výskytem perzistorů. Již před patnácti lety byla v biofilmu zjištěna vysoká koncentrace perzistorů (Lewis, 2005) a dnes se výzkum posunul zase o něco dále.

Biofilm definují extracelulární polymery vylučované buňkami, které žijí uvnitř biofilmu (Hall-Stoodley et al. 2004). Tato extracelulární složka chrání populaci před fyzikálními a mechanickými vlivy okolí, včetně buněk imunitního systému. Do biofilmu také hůře pronikají antibiotika, ale to samo o sobě nevysvětluje vyšší odolnost vůči antibiotikům. Toto bylo například prokázáno v experimentu, kdy byly buňky *Staphylococcus aureus* uvolněny z biofilmu, a přesto vykazovaly vyšší odolnost k antibiotikům než ve své planktonické formě (Boles & Horswill, 2011).

Hlavním důvodem, proč je v biofilmu perzistorů více nejspíš souvisí s fyziologickými změnami buněk biofilmu. Díky nižšímu množství kyslíku a živin, které spotřebovávají periferní buňky, mohou být buňky hlouběji v biofilmu ve stacionární fázi (Walters et al. 2003). O stacionární fázi je známo, že obohacuje perzistentní fenotyp (viz výše). Skutečně bylo dokázáno, že fyziologie buněk biofilmu a planktonických buněk ve stacionární fázi, je podobná. Uvést lze starší studii s *Pseudomonas aureginosa*, kde srovnávali toleranci buněk stacionární fáze a buněk biofilmu ke čtyřem různým antibiotikům. Skupina došla k závěru, že je ve všech případech zvýšena a srovnatelná, a také navrhli, že je za to zodpovědná přítomnost perzistorů v obou případech (Spoering a Lewis, 2001). Novější experiment se *S. aureus*, který porovnával perzistentní buňky, planktonické buňky stacionární fáze a buňky biofilmu ukázal, že jsou si nápadně podobné (Waters et al. 2016).

Na rozrušení biofilmu intenzivně cílí i klinický výzkum, protože dormantní stav perzistorů společně s ochranou, kterou jim poskytuje biofilm, tvoří velký problém při léčbě bakteriálních infekcí.

2.4. Perzistence u *Staphylococcus aureus*

V této práci jsem pracovala s kmeny *Staphylococcus aureus*, které byly odebrány pacientům trpícími cystickou fibrózou. Protože je *S. aureus* téměř vždy odebírán pacientům, kteří trpí nějakým plicním onemocněním, stává se z něj vhodný model pro mapování adaptačních a fyziologických změn vedoucích ke chronicitě (perzistentní infekci). Zde uvádím výsledky nejrozsáhlejších studií, které změny mezi časnými a pozdními izoláty sledovaly, a zároveň blíže popisují modul Agr, který je označován jako hlavní regulátor perzistence u *Staphylococcus aureus*, a který je často indikátorem takovýchto změn.

2.4.1. Adaptační změny *Staphylococcus aureus* v plicní tkáni vedoucí k chronicitě

Staphylococcus aureus je vysoce všestranný a adaptabilní grampozitivní patogen. Většinou obývá kůži a sliznice jako neškodný komenzál. Nicméně, *S. aureus* může také proliferovat do krevního řečiště a do různých tkání, což posléze způsobuje vážné onemocnění (osteomyelitida, endokarditida). *S. aureus* je považován za jednu z hlavních příčin nemocničních a komunitních infekcí po celém světě. Významným aspektem onemocnění způsobených *S. aureus* je recidiva, která se projevuje u 8–33 % infekcí kůže, měkkých tkání a krevního řečiště, což má za následek závažná lidská onemocnění a následnou smrtelnost (Thammavongsa et al. 2015).

Pro studium perzistence je velmi užitečné zmapovat mutace v klinických izolátech odebraných pacientům, kteří trpí chronickou infekcí. Sekvenční analýza klonálních izolátů z chronických infekcí se hodí pro sledování adaptačních změn a pro určení jakési hierarchie důležitosti systémů zapojených v perzistenci. Obecně lze sledovat, že roste schopnost perzistovat v průběhu chronické infekce.

V rozsáhlé studii z roku 2013 byly porovnávány klinické izoláty *S. aureus*, které byly rozděleny do klonálních dvojic podle příbuznosti. Pracovali s časnými a pozdními izoláty, mezi kterými byl průměrný časový rozdíl 8 let. Studie dokázala, že adaptivní změny pozitivně korelovaly s délkou perzistence *S. aureus* a objevovaly se postupně během období perzistence. Pro každého pacienta platilo, že se adaptivní změny akumulovaly s délkou perzistence, avšak lišily se mezi jednotlivými pacienty, i když byly infikovány stejným klonem. Studie tehdy přišla s neočekávanými výsledky, například se zvýšenou tvorbou hemolýzy nebo sníženou schopností tvořit biofilm u některých izolátů, což je v rozporu s jinými studiemi (Hirschhausen, 2013). Například v pozdější studii byla zjištěna narůstající schopnost tvořit biofilm jako společný znak (Tan et al. 2019). Díky výše uvedeným skutečnostem se proces adaptace jeví jako velmi složitý, protože je formován i individuálními vlastnostmi hostitele. Nicméně pokud se na problematiku podíváme v širších souvislostech, jako to udělala výzkumná skupina pana Riquelme a kolegů, zdá se tento fenomén jasnější. Skupina popsala, jak v *in vivo* podmínkách dochází ke vzniku různých subpopulací, které nejsou zcela totožné, ale všechny vedou ke vzniku perzistentní infekce (Riquelme et al. 2020; viz obrázek č. 4).

Pokud dojde ke kolonizaci plic stafylokokem, existuje v zásadě několik možností, které mohou nastat. Významné situace, které se týkají vzniku perzistentních subpopulací jsou shrnuty na obrázku 4. Jsou na něm zaznamenány i zásadní metabolické nebo fyziologické změny, které pro jednotlivé subpopulace popisují detailněji níže.

První typ subpopulace začne zvyšovat expresi genů potřebných pro glykolýzu. Bronchiální buňky v reakci na internalizaci stafylokoka započnou zvyšovat absorpci glukózy a využití aminokyselin, což vede ke kompetici o živiny (Medina, 2019). Odpovědí bakterie je metabolická remodelace, a to je jedna z nejdůležitějších strategií, které používá *S. aureus* k přizpůsobení se intracelulárnímu prostředí hostitele. Již dříve bylo zjištěno, že SCV, popsány

níže, měli zvýšenou glykolýzu a snížený TCA cyklus (Kriegeskorte et al. 2014). Důvodem zvýšené glykolýzy je právě kompetice o živiny (viz obrázek č. 4).

Další fenotypová varianta již vykazuje dormanci. Tato forma stafylokokům umožňuje setrvání a vyhnutí se léčbě v intracelulární podobě, kde nemusí čelit imunitnímu systému a dalším výkyvům prostředí (Tuchscherr et al. 2010). Tomu odpovídá fenotyp, který je v souvislosti s perzistencí *S. aureus* často zmiňován. Jedná se o fenotyp tzv. SCV (small colony variants), který je již delší dobu spojován s rekurentními infekcemi (Proctor et al. 1995). SCV jsou popsány jako pomalu rostoucí buňky se sníženou virulencí, schopné rychle revertovat zpět do mateřského kmene. Velmi často se pak nachází u pacientů s respiračními onemocněními. V jedné studii byly posuzovány vzorky téměř od 3000 pacientů trpících chronickými infekcemi plic způsobené tímto patogenem a tyto varianty byly nalezeny u 42 % z nich (Schwerdt, Mathias et al. 2018).

Důkaz o tom, že čím je izolát adaptovanější, tak má zároveň vyšší schopnost přejít v intracelulární formu, byl poskytnut nedávno. Pokus byl proveden na tkáňových kulturách, které byly infikovány pozdními i časnými izoláty a dále mutantem v biosyntetické dráze hemu (Δhem), který představoval intracelulární formu (SCV). Podle předpokladu byly pozdní izoláty mnohem schopnější přetrvávat v epiteliálních buňkách než časná izoláty. Zároveň mutant Δhem byl schopen přežít ve všech částech pokusu. Je ještě zajímavé zmínit, že pozdní izolát, který byl izolován z plic zdravého člověka nevykazoval zvýšenou schopnost intracelulárního přetrvání. Z těchto výsledků se dá vyvozovat, že *S. aureus* vykazuje lepší schopnost přetrvávat intracelulárně v závislosti na čase, na své genetické adaptaci (Δhem) a zároveň v závislosti na dysfunkci epiteliálních buněk (Tan, 2019).

K pochopení vzniku perzistorů u *S. aureus* přispělo významně studium SCV, protože některé charakteristiky SCV jsou též součástí i životního cyklu perzistorů. Nejvýraznější společné znaky jsou pomalý růst v důsledku nižší metabolické aktivity (Amato et al. 2014), dále také snížená exprese virulencních faktorů a zvýšená exprese bakteriálních adhezínů (Sendi & Proctor, 2009).

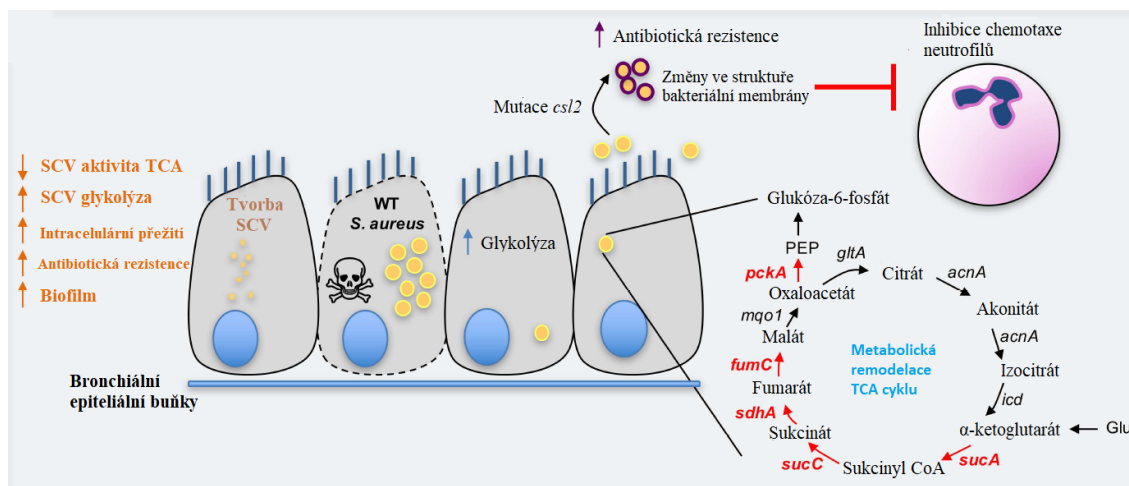
Za hlavní mechanismus snížení virulence je u SCV zodpovědná snížená exprese Agr modulu, zodpovědného za tvorbu toxinů (Tuchscherr et al. 2010). Stejně tak je tomu u perzistentního fenotypu, viz níže. SCV s perzistory sdílí též některé zásadní genetické změny. Jedna z nejsilnějších a nejlépe pospaných indikací jsou změny v elektrontransportním řetězci způsobené mutacemi v heminu, a to nejčastěji ztrátou prostetické skupiny (hemu; Δhem) (Proctor et al. 2006). U SCV se také často objevovala mutace vedoucí k úplné ztrátě RNAlIIII (Vaudaux et al. 2002; Kohler et al. 2003, 2008; Kahl et al., 2005). RNAlIIII je součástí quorum sensing modulu Agr, který je silně asociován s perzistencí u *S. aureus* a jeho funkce je podrobněji popsána v následující kapitole.

V plicním epitelu se také objevuje subpopulace stafylokoků, která vykazuje normální růst a usmrcování hostitelských buněk. Bylo zjištěno, že během perzistentní infekce se objevují buňky

mající zvýšenou schopnost proteolýzy (Marbach et al. 2019, viz obrázek č. 4). V tomhle případě hovořím o perzistujících buňkách jako o buňkách vedoucí k perzistentní infekci (viz kapitola 2.1.).

Jako poslední byla během perzistentní infekce definována subpopulace, která zvyšuje svou vytrvalost pomocí změn v metabolické dráze trikarboxylových kyselin (TCA). U SCV byla zaznamenána snížená aktivita TCA cyklu, která má navíc za následek snížení elektrochemického gradientu, který je vyžadován pro absorpci aminoglykosidů, čímž se stává SCV odolnější k tomuto antibiotiku (Somerville & Proctor, 2009). U jiných buněk *S. aureus* se naopak ukázaly některé geny TCA cyklu mít zvýšenou expresi. Tato subpopulace vykazuje například vyšší expresi genů pro 2-oxoglutarátdehydrogenázu (*sucA*), pro sukcinylsyntetázu (*sucC*), sukcinátdehydrogenázu (*sdhA*) nebo fumarát hydratázu (*fumC*) (shrnuto v Riquelme, Lung & Prince, 2020). Již dříve bylo zjištěno, že ciprofloxacin zvyšuje expresi některých enzymů TCA cyklu a tyto výsledky také naznačily, že takové zvýšení exprese usnadňuje perzistenci a pozdější vznik rezistence (Cirz et al. 2007). Tyto enzymy jsou zahrnuty v aktivitě cyklu TCA, viz červené šipky v obrázku 4. Tyhle výsledky byly už dvakrát potvrzeny i pomocí proteomických studií (Medina et al. 2019, Suilaman a Lam, 2020). Důvodem je nejspíše skutečnost, že buňka se při zpomaleném růstu spoléhá na katabolismus aminokyselin a tyhle enzymy zvyšují svou tvorbu pro dodání meziproductů, jako je oxaloacetát, α -ketoglutarát a sukcinylkoenzym A. Také vykazují zvýšenou tvorbu fosfoenolpyruvát karboxikinázy (*pckA*) pro podporu glukoneogeneze v případě nedostatku glukózy (Halsey & Cortney et al. 2017).

Se spojitostí TCA cyklu a perzistorů přišly ještě další dva významné experimenty. První z nich prokázal, že za sníženou hladinu ATP může změna exprese enzymů cyklu trikarboxylových kyselin (Zalis et al. 2019). O rok dříve bylo publikováno, že perzistori *S. aureus* mají snížený membránový potenciál, a že je za to odpovědná právě inhibice enzymů TCA (Wang et al. 2018).



Obrázek č. 4: Grafická ukázka metabolických změn *S. aureus* v bronchiálních buňkách. Je zde ukázána subpopulace buněk, která se replikuje a způsobuje smrt buněk (WT), formace intracelulárního fenotypu SCV, subpopulace podporující katabolismus aminokyselin zvýšením aktivity TCA cyklu (červené šipky). Dále jsou zde ukázány mutanty *csf2*, které vedou k bakteriální rezistenci a umožňují *S. aureus* se vyhnout účinku neutrofilů. Převzato a upraveno z Riquelme, Lung & Prince, 2020.

U *S. aureus* je také důležité připomenout schopnost tvořit biofilm. *S. aureus* disponuje pozoruhodnou řadou mechanismů, jakými dokáže biofilm vytvářet v různých částech lidského těla (shrnuto v review Zapotoczna, 2016). Tato schopnost také výrazně přispívá k přežití *S. aureus* v plicní tkáni. Na několika chronologických izolátech byla pozorována vyšší schopnost tvořit biofilm u pozdních izolátů oproti těm časným (Tan et al. 2019). Tvorba biofilmu tedy hraje při adaptaci na plicní tkáň také zásadní roli.

Adaptace na hostitele též zahrnuje vznik rezistentních kmenů v odpovědi na antibiotický stres. Konkrétně jedna mutace způsobuje vyšší odolnost *S. aureus* a dalších G+ bakterií zároveň k antibiotiku a neutrofilům. Jde o jednobodovou mutaci v genu *csf2*, což má za následek zvýšenou syntézu kardiolipinu a sníženou syntézu fosfatidylglycerolu (Patton et al. 2019). Takovéto změny ve struktuře bakteriální buňky vedou k rezistenci na cyklické lipopeptidy a daptomycin. Daptomycin je antibiotikum, které se používá při závažných infekcích způsobených G+ bakteriemi, působící i na MRSA. Proto je narůstající rezistence k tomuto antibiotiku závažným klinickým problémem. Snížení syntézy fosfatidylglycerolu také vede k inhibici neutrofilní chemotaxe (viz obrázek č. 4).

Schopnost odolávat neutrofilům je další vlastnost objevovaná u adaptovaných izolátů stafylokoků. Je významná hlavně v situaci, kdy se buňka stafylokoků vyskytuje mimo intracelulární prostředí. Neutrofilové zabíjejí bakterie tvorbou takzvaných NETs (neutrophil extracellular traps), které zachycují bakterie pomocí chromatinových vláken a následně je eradikují pomocí antimikrobiálních proteinů, které jsou soustředěny na těchto vláknech (Brinkmann et al. 2004). Tvorba těchto NETs je zvýšena u pacientů s cystickou fibrózou (Gray

et al. 2018) a díky masivnímu uvolňování neutrofilních obranných peptidů je plicní tkáň těchto pacientů značně ničena. Bylo zjištěno, že izoláty *S. aureus* ze sputa pacientů s cystickou fibrózou vykazují zvýšenou expresi nukleázy, která napomáhá úniku z této neutrofilové pasti a hraje důležitou strategii v přežití stafylokoků zanícené tkáni (Herzog et al. 2019). V další studii bylo použito kultivační médium napodobující lidské sputum ve snaze napodobit podmínky v hostiteli. Z takto narostlých buněk vyizolovali RNA a osekvenovali jí. Tím odhalili, že pozdní izoláty (6 let) mají výrazně zvýšenou expresi *spa* genu (Windmüller et al. 2015). Produkt genu, protein Spa se váže na IgG receptory Fc fragmentů, které se nachází na neutrofilech a tím zabrání, aby byl stafylokok fagocytován (Foster, 2005). Takto zvýšená tvorba Spa proteinu je dalším mechanismem, jak se bakterie brání imunitnímu systému hostitele.

2.4.2. Hlavní regulátor perzistence u *Staphylococcus aureus*

Za hlavní regulátor perzistence u *Staphylococcus aureus* je dnes považován modul mezibuněčné komunikace (quorum sensing modul) nazvaný Agr. V podmínkách vysoké buněčné denzity zvyšuje produkci virulenčních faktorů, snižuje expresi kolonizačních faktorů a je úzce spojen s tvorbou biofilmu. Poprvé byl Agr lokus popsán jako modul, který produkuje exoproteiny (Peng et al. 1988). Do souvislosti s patogenezí byl dán o něco později, kdy mutanty v *agr* operonu vykazovaly nižší schopnost tvorby destruktivních lézí u myši (Abdelnour et al. 1993). Poté byly takové mutanty pravidelně nacházeny v klinických izolátech od pacientů trpících cystickou fibrózou, jak jsem zmiňovala výše. 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). Úplná ztráta Agr byla asociována s chronickými infekcemi, kdy byly tyto mutanty získány od pacientů trpících CF spolu s bakteriálními infekcemi plic (Kahl et al. 2005; Hirschhausen et al. 2013).

Agr operon je uspořádán kolem dvou divergentních promotorů, P2 a P3, z nichž se exprimují dva primární transkripty, RNAII a RNAIII, v uvedeném pořadí (viz obrázek č. 5) (Novick et al. 1995). RNAII kóduje geny *agrA*, *agrB*, *agrC* a *agrD*. *agrB*, produkt genu *agrB*, je integrální membránová endopeptidáza, která proteolyticky štěpí *agrD*. Gen *agrD* kóduje prekurzor feromonu autoindukujícího peptidu AIP (auto-inducing peptid). Probíhá to tak, že rozpoznává C-terminální sekvenci v genu pro thiolakton AIP, a tím přispívá k jeho maturaci i exportu. Agr systém je aktivován, když koncentrace extracelulárního AIP dosáhne koncentrace prahové. *agrC* a *agrA* jsou součástí dvousložkového systému přenosu signálu, ve kterém *agrC* je membránová histidinkináza a *agrA* je regulátor odpovědi (Novick et al. 1995). Popsáno podrobněji, AIP se váže na N-konec *agrC* a konformační změna způsobí spojení senzoru a kinázy, což vede k autofosforylaci a aktivaci *agrC* kinázové aktivity. *agrC*~P následně fosforyluje regulátor dvoukomponentového systému *agrA*. Fosforylovaný *agrA*~P se váže s

vysokou afinitou do místa v oblasti P2-P3 *agr* lokusu, přičemž jeho afinita je silnější k P2 promotoru (Koenig et al. 2004). Diferenciální afinita AgrA~P k promotorům P2 a P3 zásadně ovlivňuje typ infekce v různých orgánech. Bylo demonstrováno, že aktivací promotoru P3 vznikaly buňky schopné zvýšené disperze a virulence. Naproti tomu aktivace P2 promotoru vedla ke zvýšené tvorbě biofilmu v srdeční a ledvinové tkáni myši (García-Betancur et al. 2017). Dále bylo také zjištěno, že stačí jediná substituce aminokyseliny v AgrC (tyrosin za cystein v poloze 223) k destabilizaci interakce AgrC-AgrA s následnou diferenciální regulací repertoáru genů virulence, což má za následek přechod od cytotoxického fenotypu (akutní infekce) na kolonizující fenotyp (chornická infekce) (Shambat et al. 2016).

Regulátor AgrA se dokáže vázat také do promotorů virulenčních genů tzv. *psm* (phenol soluble modulins) genů (viz obrázek č. 5) 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). Tyto malé difuzibilní molekuly významně přispívají k aktivním bakterémiím stimulací tvorby hemolytických toxinů, které narušují tkáň hostitele (Recsei et al. 1986). Bylo také zjištěno, že reprimují tvorbu perzistorů, protože jim vrací citlivost k antibiotikům (Bojer et al. 2018). Toto zjištění by mohlo potvrzovat jejich úlohu při reaktivaci perzistorů, viz diskuze.

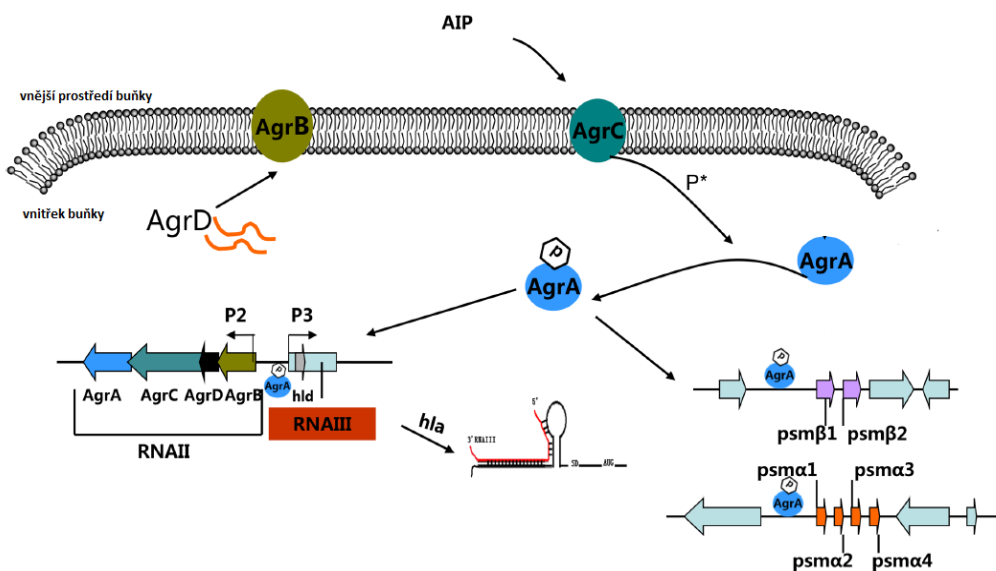
RNAIII naproti tomu kóduje gen pro delta toxin (*hld*), a navíc funguje jako posttranskripční regulátor několika dalších virulenčních genů (Boisset et al. 2007). Navíc se ukázalo, že RNAIII řídí tvorbu a akumulaci biofilmu (Coelho et al. 2008) a později se potvrdilo, že vysoká koncentrace RNAIII má na tvorbu biofilmu inhibiční efekt (Lauderdale et al. 2009). Toto zjištění potvrzuje domněnku, že RNAIII je více exprimovaná spíše v akutní fázi infekce.

Velice rozsáhlou roli má Agr modul v tvorbě biofilmu, který je pro perzistory typický. Zdá se, že Agr systém ovlivňuje tvorbu biofilmu na úrovni vzniku a určuje, zda dojde k tvorbě strukturní nebo disperzní formy biofilmu. Mnoho výzkumů ukázalo, že potlačení Agr je nezbytné pro tvorbu biofilmu, zatímco aktivace Agr systému je nezbytná pro rozrušení biofilmu (Boles & Horswill, 2008). Agr systém může ovlivnit formu biofilmu různým způsobem. Například k vytvořenému biofilmu byla přidána molekula AIP, které aktivuje Agr modul, což mělo za následek oddělení biofilmu zvýšenou sekrecí extracelulárních proteáz (Boles & Horswill, 2008). Navíc, bylo zjištěno, že i molekuly PSM jsou zapojeny do disperze biofilmů (Dastgheyb et al. 2015). Jako monomery podporují PSM rozebírání biofilmů, ale když polymerizují do vláken podobných amyloidu, zvýhodňují vznik biofilmu (Solano et al. 2014).

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 virulenčních faktorů prostřednictvím RNAIII, a to vede k akutní infekci. Naopak represe *agr* operonu způsobuje navození stavu perzistence, jehož výsledkem je chronická infekce.

Agr modul je také dáván do souvislosti s obecnou stresovou odpovědí, i když na zjištění jakým způsobem, se teprve čeká. Nicméně již bylo několikrát dokázáno, že u mutant v sigma faktoru B ($\Delta sigB$), hlavním regulátoru SOS odpovědi, dochází k menší míře k vnitrobuněčné perzistenci než při infekci divokým kmenem *S. aureus*. (Moisan et al. 2006). Nedávná studie také zjistila, že deficitní klony v *sigB* převládaly při chronické mastitidě skotu (Marbach et al. 2019). Tyto mutanty také ztratily schopnost enkapsidace, což se již dříve ukázalo jako významný faktor vedoucí k chronické infekci (Lattar et al. 2009; Tuchscher et al. 2010). Také nedávná studie prokázala, že SigB je nezbytný pro tvorbu SCV fenotypu, protože při jeho delecii ke vzniku tohoto fenotypu nedocházelo (Tuchscher et al. 2017).

Různé environmentální a metabolické faktory, jako je pH, koncentrace glukózy, reaktivní druhy kyslíku (ROS) a dostupnost živin mohou také modulovat funkci Agr systému u *S. aureus*. Příkladem může být nedávná studie, která popsala, že při vystavení *S. aureus* nikotinu dochází ke zvýšené tvorbě biofilmu, a to jak u klinických izolátů, tak u divokého kmene. S největší pravděpodobností je tak tvorba biofilmu obecná obranná strategie stafylokoků před nepříznivými účinky, kterým byl v tomto případě nikotin (Shi et al. 2019).



Obrázek č. 5: Quorum sensing modul Agr *Staphylococcus aureus* se znázorněným uspořádáním *agr* operonu se dvěma divergentními promotory, z kterých jsou transkribovány RNAII a RNAIII. Je zde také ukázáno umístění působení produktů genů v operonu - AgrA, AgrB, AgrC a AgrD. AgrA se též váže do promotorů pro *psma* a *psm β* , účastnících se akutní infekce. Převzato a upraveno z Tan et al. 2019.

2.5. Studium perzistence – omezení a jejich řešení, výzvy a slibné metody

Největší výzva ve výzkumu perzistence momentálně obecně spočívá v tom, jakými metody ji vlastně studovat, aby byly získané poznatky pravdivé a byly co možná nejméně ovlivněny manipulací s buňkami. Jádrem komplikací je v redundanci mechanismů, které se na perzistenci podílejí. Proto je nutné tento fenotyp zkoumat systematicky a nejvíce progresivní způsoby studia spočívají v kombinaci více experimentálních přístupů. V souvislosti s tím se již objevila spousta zavádějících informací i v literatuře a je třeba s ní zacházet velmi opatrně (shrnutí v review Kim, 2016). Například nedávná studie, která popisuje aktivní efluxní pumpu odstraňující antibiotikum z buňky (Pu et al. 2016). Podle následné diskuze Kim a Wood (2017) chybovala v poskytnutí zdroje uhlíku, kdy umožnila buňkám revertovat zpět do aktivního stavu.

Prvotní problém, kterému výzkumníci čelí je fakt, že jich je jen velmi malá část populace, méně než 1 %. Tento problém se nejčastěji řeší „obohacováním“ perzistorů v médiu, kdy se podpoří mechanismy, o kterých se ví, že k jejich vzniku vedou. Oblíbeným způsobem v laboratořích bylo navození nutričního stresu (Radzikowski et al. 2016; Amato, 2014). Jsou zde však argumenty, že takovéto buňky perzistory ve skutečnosti nejsou, protože v odpovědi na nutriční stres spouští obecnou stresovou odpověď, a tak vznikají spíše tolerantní a stále metabolicky aktivní buňky (Kim & Wood, 2017). Tento způsob navození perzistence před jejím studiem bohužel vedl k mnoha zmatečným informacím ohledně metabolismu perzistorů (shrnutí v review Kim, 2016). Dalším úspěšným způsobem, jak navýšit perzistory, a který dosud nebyl kritizován, je použití chemických činidel. Pro inhibici transkripce byl použit rifampin, který inhibuje syntézu mRNA, tetracyklin, který inhibuje translaci a CCCP, který inhibuje syntézu ATP. Ukázalo se, že předběžné ošetření těmito látkami zvýšilo perzistentní populaci z 0,01 % na 10–100 % (Kwan et al. 2013).

Dalším velkým problémem je oddělení perzistorů od dalších subpopulací, které jsou též dormantní, a také vykazují schopnost přežít antibiotikovou léčbu. Největší výzva spočívá v oddělení perzistentních a tzv. VBNC buněk (viz kapitola 2.1.). Jednoduchým řešením by mohla být úprava antibiotické léčby, která změní alespoň poměr subpopulací ve prospěch perzistorů. Něco takové provedl Bramford, který ošetřil buňky ve stacionární fázi ampicilinem o koncentraci 10x MIC a získal vyšší podíl perzistorů než VBNC. Když však koncentraci jen o něco změnil (25 x MIC) už to neplatilo (Bramford et al. 2017). Vzhledem k tomu, že byla prokázána velká kontinuita mezi perzistory a VBNC (Ayrapetyan, 2015), vyvstává otázka, jestli by nebylo příhodnější nahlížet na ně jako na celek, pro který platí získané informace současně. Například prvotní proteomická studie perzistorů uvedla, že by mohla postačit informace o jakémsi průměrném proteomickém profilu kontinua (Sulaiman & Lam, 2019).

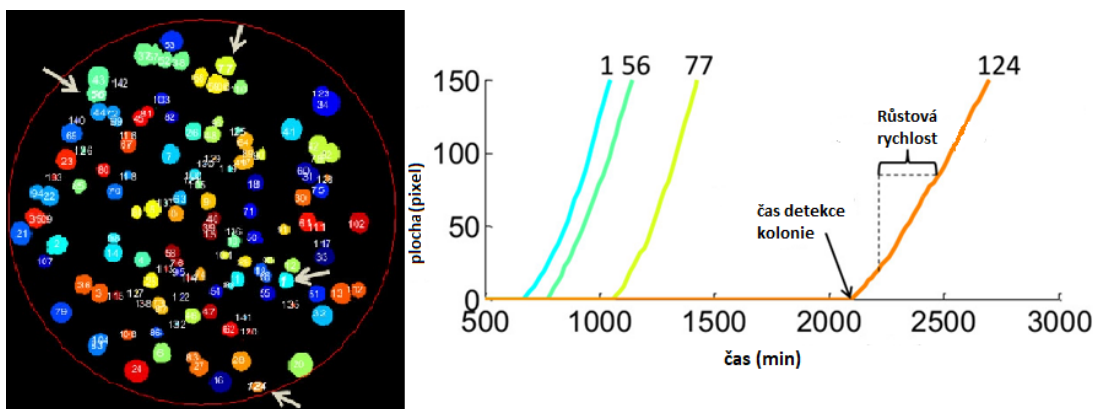
Možnost, jak buňky úspěšně rozdělovat, může být pomocí průtokové cytometrie (FC). Tou se dá zároveň studovat i perzistentní fyziologie, kdy se do bakteriální suspenze přidá fluorescenční sonda ukazující nějakou fyziologickou vlastnost bakteriální buňky. Na základě

signálu pak mohou být buňky tříděny do populací – tato metoda se nazývá FACS (fluorescent activating sorting) a je pro studium metabolismu perzistorů velmi užitečná (Orman et al. 2016). Protože jsou perzistori heterogenní, je důležité mít takovéto metody poskytující fenotypovou distribuci.

Tyto metody přinesly některé základní informace o fyziologickém stavu perzistorů, jejichž znalost je nutná pro odhalení terapeutických cílů. Metoda je však časově a finančně náročná, a také umožňuje studovat jen omezené množství buněk. Problém s monitorováním je také ten, že můžeme sledovat bakterie pouze v určité fázi růstu, a když budeme například monitorovat ty co dorůstají brzy, nemůžeme zároveň monitorovat ty, které dorůstají později (Balaban et al. 2019). Také značně omezující je skutečnost, že se fluorescenční sondy nedají kombinovat libovolně vzhledem k překryvu svých emisních spekter.

Vědecká skupina z Princetonu v USA přišla s velice progresivní metodou, která kombinuje FACS, měření tolerance vůči antibiotikům a NGS (next-generation sequencing) sekvenaci. Nazvali ji „Persister FACS-Seq“, a i přes pomalejší proces je velmi úspěšná v odhalování perzistentních fenotypů, ze kterých mohou být sestavovány fenotypové knihovny (Henry & Brinyldsen, 2016).

Další problém, ale i výzvou je, že žádná z těchto metod nesleduje vyrůstání z perzistentního stavu, o němž je známo velice málo, ale pro klinickou praxi je neméně důležitý. Velmi přínosným řešením je proto metoda tzv. ScanLag. Je to metoda pro měření přímého vyrůstání kolonií a má velký potenciál být primární metodou pro sledování vyrůstání z perzistence. Nějakou dobu je již známá, například přinesla fenotypovou charakterizaci *E. coli* při vzniku jejích rezistentních variant (Levin-Reisman, 2017). Metoda funguje tak, že jsou Petriho misky s bakteriemi umístěny na skenery a díky nim jsou získávány časosběrné obrázky, které jsou pak pomocí softwaru automaticky vyhodnocovány (viz obrázek č. 6). Tato metoda dokáže přesně změřit růstovou rychlost a analyzovat dobu lag fáze (Levin-Reisman, Fridman & Balaban, 2014). Právě prodloužení lag fáze je pro perzistentní buňky charakteristické (viz kapitola 2.3.), a která se dá manuálními metodami těžko rozlišit. Další velká výhoda je, že jde o nízkonákladovou metodu.



Obrázek č. 6: Výstupní obrázek ze ScanLagu pro detekci vyrůstání z perzistence. Ke každé kolonii je přiřazena jiná barva a číslo. Šedé šipky ukazují na reprezentativní kolonie. Kolonie jsou detekovány na základě prahu intenzity udávané v pixelech (osa y). Na ose x je vynesena čas, kdy je kolonie detekována. Růstová rychlost se pak vypočítá jako doba, kdy kolonie dosáhne určitého prahu nastaveného v programu (zde je to doba od 20 do 80 pixelů). Převzato a upraveno z Levin-Reisman, Fridman & Balaban, 2014.

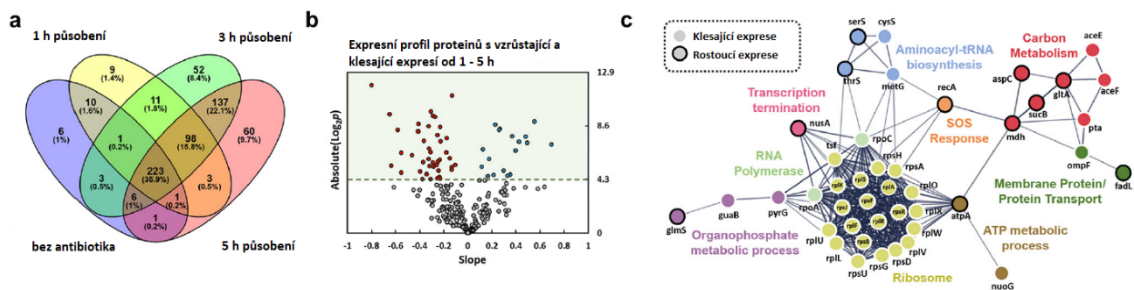
Také proteomické studie by mohly být užitečným nástrojem pro studium perzistence, protože vnášejí větší pochopení do signalizačních kaskád, a zároveň do jejich dynamiky za různých fyziologických podmínek (Sulaiman & Lam, 2019). S existencí jakýchsi perzistentních proteinů, jak jsem zmiňovala v předešlé kapitole, se počítá hlavně proto, že změny v perzistentním fenotypu jsou rychlé a protein-proteinové interakce nabízí rychlou změnu fyziologie. Je také nutné zmínit, že i v dalších studiích, které sledovaly změny v expresi proteinů při dlouhodobých infekcích, nacházeli výrazné změny exprese u proteinů s doposud hypotetickou funkcí (Windmüller, 2015).

Největší omezení pro proteomiku představuje nízká frakce perzistorů v populaci (1 % ve stacionární fázi), která pro standardní analýzu vyžaduje vysokou koncentraci proteinů. Další problém přichází ve chvíli, kdy se subpopulace selektuje pomocí antibiotik. Zůstává zde totiž mnoho mrtvých, ale stále neporušených buněk, které je potřeba od perzistorů oddělit. S velice sofistikovanou metodou přišly pánové Sulaiman a Lam, kteří se aplikací proteomiky na studium perzistence intenzivně zabývají. Metoda používá magnetické kuličky s afinitou k mrtvým buňkám, které se dostanou jen do buněk, které mají významně narušenou membránu antibiotiky. Když se s takovými kuličkami populace vystavená antibiotikům inkubuje, navážou se na narušené buňky a ty se pak oddělí pomocí magnetické kolony. S dostatečným množstvím perzistentních buněk lze pak provést proteomickou analýzu.

Na tuto metodu autoři navázali dále a provedli významný experiment, kdy vystavovaly *E. coli* několika různým antibiotikům v cyklech (ampicilin, ciprofloxacin a apramycin). Vybrané antibiotika měly záměrně jiný mechanismus účinku. Nejprve nechali kulturu *E. coli* inkubovat společně s antibiotikem, poté ho odstranili a nechali růst přes noc. Tento postup opakovali několikrát a odhalili tak vzniknuté tolerantní populace ke specifické třídě antibiotik, kterých bakterie docílili jednobodovou záměnou v genech, z nichž některé již byly dány do souvislosti

s vyšší tolerancí (perzistencí) a některé dosud ne. Z těch, co již byly s perzistencí spojeny, je mutace v genu pro adenylátcyklázu (Δcya) nezbytnou pro tvorbu cAMP. Již dříve se tento mutant (Δcya) ukázal jako pomaleji rostoucí vykazující vyšší perzistenci. V této starší studii byl u mutantu Δcya též popsán vznik filamentárních populací, což indikuje, že u nich byla spuštěna SOS odpověď. To by mohlo vysvětlovat i čtvrtý zpozorovaný jev, a to zvýšenou toleranci k beta-laktamovým antibiotikům (Molina-Quiroz et al. 2018). Stejný jev pozorovali i v této studii, kde experimentátoři vyslovili hypotézu, že buňky protahováním záměrně oddalují dělení spojené se syntézou buněčné stěny, na které beta-laktamová antibiotika cílí (Sulaiman & Lam, 2020).

Následná proteomická analýza a srovnání profilu mezi jednotlivými vzniklými populacemi umožňuje určit nejdůležitější proteiny, které vykazují podobnou expresi mezi heterotolerantními populacemi. Lze takhle určit společně exprimované proteiny, tedy ty tvořené bez ohledu na spouštěč. Právě tyto proteiny by mohly mít pro naše poznání nejdůležitější význam jako markery perzistence. Jako nadstavbu lze pak ještě použít program (STRING), který na základě databázi vytváří pravděpodobné protein-proteinové interakce, což může přinést lepší pochopení metabolické provázanosti (viz obrázek č. 7).



Obrázek č. 7: Výsledky z analýzy proteomu perzistorů. a) Vénův diagram pro srovnání proteomu v 1, 3 a 5 hodinách vystavení antibiotiku. b) Bodový diagram „volcano“ znázorňující expresní profil jednotlivých proteinů v 1-5 hodinách působení antibiotika. Klesající expresi je vyznačena červeně, rostoucí modře. c) Síť proteinových interakcí se zvyšujícími se a snižujícími se expresními profily během léčby antibiotiky predikovaná programem STRING. Převzato a upraveno z Sulaiman & Lam, 2020.

Cyklické vystavování antibiotikům společně s proteomickou analýzou je tedy další velmi slibná cesta k přesnějšímu popsání perzistentního fenotypu, protože v sobě zahrnuje postupný vznik tohoto fenotypu s velmi přesnou analýzou změn, ke kterým v něm dochází (Sulaiman & Lam, 2020). Touto metodou bylo prokázán již dříve známý fakt, že ve stacionární fázi vzniká více perzistorů.

Odhalení proteomu perzistorů by dále mohlo přinést silnější důkazy o resuscitace perzistorů, heterotoleranci na antibiotika a studování adaptačních strategií. Společně s dalšími takovými studiemi by mohly být v budoucnu predikovány perzistentní, a dokonce i rezistentní kmeny ještě před tím, než skutečně vzniknou, což by mohlo mít pro klinickou praxi obrovský

význam. Proteomika je také slibným klíčem k vytvoření tolik potřebných biomarkerů pro klinickou diagnostiku, kde by právě tyto společně exprimované proteiny mohly být markery perzistence (Sulaiman & Lam, 2019).

3. Materiál

3.1. Klinické izoláty

V této práci jsem pracovala se sedmi bakteriálními klinickými izoláty *Staphylococcus aureus*. V tabulce jsou zaznamenány jen mutace, které jsem sledovala.

Pacient č.	označení izolátu	datum odběru	typ mutace
1.	28A	10.10.2017	primoizolát
	37A	27.07.2018	frameshift u proteinu s hypotetickou funkcí v operonu s <i>glmU</i>
	38A	17.12.2018	delece promotorové části mezi <i>agrB</i> a <i>hem</i> frameshift u proteinu s hypotetickou funkcí v operonu s <i>glmU</i>
	38C	17.12.2018	frameshift u proteinu s hypotetickou funkcí v operonu s <i>glmU</i>
2.	42A	07.08.2017	primoizolát
	43A	03.09.2018	žádná
	44A	04.03.2019	<i>agrA</i> 84 I -> N (bodová záměna na pozici 84, vedoucí k aminokyselinové záměně isoleucinu za asparagin)

3.2. 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 *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 BHI média (Oxoid) rozpuštěno v 1 litru destilované vody, sterilizováno

3.3. Antibiotika

Antibiotikum	Zkratka	Výrobce	Koncentrace zásobního roztoku (mg/ml)
Ciprofloxacin	Cip	Fluka	25
Oxacilin	Oxa	Bristol-Meyers Squibb	50
Vankomycin	Van	MB Biomedicals	50

Zásobní roztoky byly uchovávány v -20 °C.

3.4. Enzymy

Reverzní transkriptáza (RevertAid Reverse Transcriptase)	ThermoFisher Scientific
--	-------------------------

3.5. Chemikálie

Agaróza – TopVision Agarose	Thermo Scientific
CCCP (karbonyl kyanid m-chlorofenylhydrazon)	Sigma
DiOC (2)3 (3,3'-dietyloxakarbocyaniniodid)	ThermoFisher Scientific
DEPC-H ₂ O	Sigma
DMSO	Merck
DNA loading dye	Fermentas
dNTP mix (10 mM)	Fermentas
EDTA	Lachema
Ethanol	Lachema
Ethidium Bromid	Sigma
Gene Ruler, DNA Ladder Mix	Fermentas
Glycerol	Sigma
Inhibitor RNAáz (Ribolock)	ThermoFisher Scientific
Isopropanol	Lachema
NaCl	Roth
PBS	Molecular probes
Random hexamer primer	ThermoFisher Scientific
SDS (dodecylsírán sodný)	Sigma
TO-PRO-3 (To-Pro3 iodid)	ThermoFisher Scientific
Tris-HCl	Sigma

3.6. Roztoky

Roztoky pro křivky hynutí:

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

Roztoky pro průtokovou cytometrii:

1x PBS (5 ml 10x PBS + 45 ml destilované vody, zfiltrováno přes membránový filtr 0,2 µm)

Pracovní roztok DiOC(2)3: (50 µl DiOC(2)3 a 950 µl DMSO)

Pracovní TO-PRO-3: (1 µl To-pro-3 a 1000 µl DMSO)

Roztoky pro horizontální gelovou elektroforézu:

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

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

3.7. Primery pro qPCR

Uvedené primery od komerčního výrobce (Eurofins genomics) jsem naředila množstvím vody uvedeným v příbalové informaci.

Primer	Sekvence	Tm
Gyráza	F: ACTGATGCCGATGTGGA	52,0 °C
	R: AACGGTGGCTGTGCAATA	54,0 °C
Hyp	F: TTGCGTTTGAATGATGCTC	52,4 °C
	R: GGCATTGTTTTTAATTCGTTG	52,0 °C
GlmU	F: ATGGCGAAATCACACTTAG	52,4 °C
	R: CGCAATCAATGTTTCTAATGT	52,0 °C
RNAIII	F: TTCACTGTGTCGATAATCCA	53,2 °C
	R: TGATTTCAATGGCACAAGAT	51,1 °C
AgrA	F: GCGAAGACGATCCAAAAC	53,7 °C
	R: CTTGCTCAAGCACCTCA	52,8 °C

3.8. Komerční soupravy

Kit	Výrobce	Využití
TRI REAGENT® BD	Molecular Research Center	izolace RNA
Luna Universal qPCR Master Mix	NE BioLabs	kvantitativní PCR
premix One Taq Hot Start	NE BioLabs	kvantitativní PCR
Souprava pro stanovení MIC ciprofloxacin, oxacilin a vankomycin (výrobce Microlatest)		

3.9. 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	ThermoFisher scientific
NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spektrofotometr	ThermoFisher scientific
PCR thermocykler	VWR Doppio
Real-time PCR cycler	ROCHE LC480
Průtokový cytometr	BC Cytoflex
UV lampa	Vilber Lourmat
SpektrofotometrVarioSkan Flash	ThermoFisher Scientific

3.10. Programy a internetové odkazy databází

Cytextpert – program na vyhodnocení výsledků z průtokové cytometrie

FloJo – program na vyhodnocení výsledků z průtokové cytometrie

Light Cycler 480 Software – program na vyhodnocení výsledků z kvantitativního PCR

<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

4. Metody

4.1. Kultivace bakteriální kultury v tekutém médiu

Pro kultivaci bakterií v tekutém médiu jsem použila BHI médium. Zaočkování jsem provedla pomocí sterilní bakteriální kličky, kterou jsem nabrala velmi malé množství bakteriální kultury z pevného média a přenesla ho do tekutého média. Pro zajištění maximální sterility jsem všechna zaočkování prováděla v UV boxu. Kultivace bakteriálních kultur následně probíhala ve 100 ml zkumavkách umístěných v třepačce při 37 °C a 180 RPM.

4.2. Příprava konzerv pro uchovávání kmenů

Pro dlouhodobé skladování jsem bakteriální kmeny uchovávala v 2 % 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 mikrozkušavky napipetovala 0,5 ml média (pro *S. aureus* BHI), do kterého jsem pomocí kličky resuspendovala biomasu z agarové plotny příslušného bakteriálního klonu, případně jsem použila již narostlou kulturu v tekutém médiu. Potom jsem do mikrozkušavky 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.

4.3. Kultivace bakteriální kultury na pevném médiu

Pro kultivaci bakterií na pevném médiu jsem použila BHI agar na Petriho miskách. Pro oživení kultury z konzerv jsem bakteriální kulturu nanasla a rozetřela na pevné médium pomocí sterilního párátko. Veškeré očkování na pevné médium jsem prováděla v UV boxu. Petriho misky jsem následně umístila do termostatu a nechala kultivovat při 37 °C.

4.4. Určení minimální inhibiční koncentrace klinických izolátů

A. Diluční metoda

Pro určení MIC studovaných izolátů jsem použila komerční sadu Microtatest. Bakteriální kulturu kultivovanou přes noc jsem přeočkovala do čerstvého SM média (je součástí sady) a napěstovala na $OD_{600} = 0,5$. 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.

4.5. Křivka hynutí s antibiotiky

1. Nejprve jsem z hlubokomrazícího boxu vyndala požadovanou kulturu a sterilním párátkem z ní odebrala část, kterou jsem rozetřela na agarovou plotnu a nechala a kultivovat v termostatu při 37 °C přes noc (viz kapitola 4.2.).
2. Z této misky jsem si připravila tekutou kulturu odpovídajícího kmene a kultivovala ji přes noc na třepačce (ON kultura) (viz kapitola 4.1.)
3. Do čtyř 100 ml baněk (kontrola a tři vybraná antibiotika) jsem sterilně nalila 10 ml čerstvého BHI média.
4. Změřila jsem OD₆₀₀ ON kultury, a spočítala odpovídající množství kultury k naočkování do čerstvého BHI na počáteční OD₆₀₀ 0,05 a tímto množstvím ON kultury jsem zaočkovala připravené baňky s BHI médiem vytemperovaným na 37 °C.
5. Takto naočkované kultury jsem nechala růst až do OD₆₀₀ = 0,5 (34 °C, RPM: 180) 1–2 hodin dle izolátu.
6. Po dosažení OD₆₀₀ přibližně 0,5 jsem odebrala z kontrolní kultury 100 µl do mikrozkušavky pro stanovení křivky hynutí a 200 µl pro stanovení FC. Které jsem dále zpracovala, viz kapitola 4.6.
7. Potom jsem ke zbývajícím kulturám přidala jednotlivá antibiotika – dle MIC a koncentrace zásobního roztoku jsem vypočítala množství přidaného ATB, tak aby jeho celková koncentrace odpovídala 100x MIC.
8. Dále jsem odebírala v hodinových intervalech vzorky na stanovení CFU a stanovení OD₆₀₀ takto:
 - a. Pro stanovení OD jsem odebrala jsem 200 µl kultury do kyvety, přidala 1800 µl 2M NaCl a změřila OD₆₀₀ kultury.
 - b. Pro stanovení CFU jsem odebrala 100 µl kultury do mikrozkušavky a přidala 900 µl 2M NaCl.
 - c. Mikrozkušavky jsem zcentrifugovala (3200 x g, 5 min, laboratorní teplota) (neprovádí se u prvního odběru).
 - d. U zcentrifugovaných mikrozkušavek jsem odebrala supernatant (900 µl) a přidala 900 µl 2 M NaCl.
 - e. Vytvořila jsem dekadickou ředící řadu v počtu ředění odpovídající OD₆₀₀.
 - f. Jednotlivá ředění jsem vysela na pevné BHI médium metodou kapkového výsevu: 10 µl daného ředění jsem napipetovala do matrice na pevné BHI médium.
 - g. Protože bakterie v kapkových testech občas nevyrostly přistoupila jsem ke klasickému stanovení CFU: 100 µl určitého ředění jsem napipetovala na pevné BHI médium a sterilně rozetřela hokejkou.
 - h. Takto připravené agarové plotny jsem nechala kultivovat v termostatu při 37°C.

- i. Nárůsty na miskách jsem vyhodnotila po 24 až 48 h kultivace.

4.6. Průtoková cytometrie

1. Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii probíhala současně se stanovením CFU pro měření křivek hynutí a byl prováděn paralelně při stejné kultivaci (viz kapitola 4.5. body 1-6).
2. Pro přípravu vzorků na FC jsem odebírala z každé kultury 200 μ l do mikrozkušavky ve stejných intervalech jako pro křivky hynutí.
3. Mikrozkušavky jsem zcentrifugovala (3200 x g, 5 min, laboratorní teplota), odebrala supernatan a přidala 200 μ l PBS (1:10 naředěný roztok PBS) a 4 μ l DiOC(2)3 (1:20 v DMSO naředěný 3 mM roztok DiOC(2)3) a krátce zvortexovala.
4. Umístila jsem vzorky na 15 minut do termostatu, po uplynutí času jsem je přemístila na led v uzavřené nádobě pro ochranu před světlem. Každou hodinu jsem kroky 5 až 8 opakovala po dobu čtyř hodin.
5. Krátce před měřením na průtokovém cytometru jsem k buňkám přidala 2 μ l TO-PRO-3 (1:1000 v DMSO naředěný 1mM roztok To-pro-3) a zvortexovala.
6. Vzorky jsem změřila na průtokovém cytometru CytoFLEX S (Beckman Coulter, vybaven 4 lasery a 13 fluorescenčními detektory), který je součástí servisního pracoviště PřF UK sekce Biologie: DiOC2(3) jsem analyzovala na přístroji použitím excitace při 488 nm (modrý laser), TO-PRO-3 jsem excitovala při 638 nm (červeným laser). Zelenou fluorescenci DiOC2(3) jsem detekovala s použitím bandpass filtru 530/30nm (APD gain 500), červenou fluorescenci DiOC2(3) při 610/20 nm (APD gain 2000) a červenou fluorescenci TO-PRO-3 jsem detekovala při 660/20 nm (APD gain 376). 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.* **Pro identifikaci jednotlivých subpopulací byly připraveny kontrolní vzorky odebrané před přidáním antibiotik a zpracované stejným způsobem jako ostatní:** Pro buňky nerespirující jsem k buňkám před obarvením přidala 10 μ l 500 μ M CCCP), (buňky permeabilizované), jsem zahřívala v termobloku po dobu 10 min na 90 °C, poslední byly **nebarvené buňky, které jsem neobarvila vůbec.**

4.7. Sběr buněk pro qPCR

1. Při kultivaci buněk jsem postupovala stejně jako u stanovení křivky hynutí (viz kapitola 4.5.) až do kroku 6. S tím rozdílem, že jsem noční kulturu zaočkovala do 200 ml baňky s 20ml BHI media.

2. V časech 10, 30, 60 a 90 minut jsem odebrala 2 ml kultury z každé baňky, zcentrifugovala jsem ji (3200 x g, 5 min, laboratorní teplota) a odebrala supernatan.
3. Takto připravený pelet buněk jsem okamžitě ponořila do kapalného dusíku a následně skladovala buňky v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C do izolace RNA.

4.8. Izolace RNA

1. K peletu bakteriálních buněk (viz kapitola 4.7.) jsem přidala 750 µl RNA izolačního kitu TRI REAGENT® BD a krátce zvortexovala.
2. Vzorky jsem nechala 5 minut stát při pokojové teplotě. Poté jsem k nim přidala 200µl chloroformu a 15 sekund vortexovala do homogenní směsi.
3. Vzorky jsem nechala 5 minut stát a poté centrifugovala (12 000 g, 15 minut, 4 °C).
4. Horní bezbarvou vodnou fází jsem opatrně nasála pipetou a přenesla do čisté mikrozkušavky (RNase free), přidala k ní 500 µl izopropanolu a nechala stát 7 minut při pokojové teplotě.
5. Vzorky jsem centrifugovala (12 000 g, 8 minut, 4 °C) a poté odebrala opatrně supernatan.
6. K peletu jsem přidala 1 ml 75 % etanolu a krátce zvortexovala. Poté jsem vzorky centrifugovala (7 500 g, 5 minut, 4 °C).
7. Odstranila jsem etanolový supernatan a pelet nechala vyschnout 5 minut na vzduchu.
8. Poté jsem k peletu přidala 1 µl Ribolocku a 40 µl RNase free water.
9. Následně jsem změřila koncentraci získané RNA pomocí NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spektrofotometr od ThermoFisher Scientific.
10. Vzorky jsem skladovala v při teplotě -80 °C.

4.9. Převod RNA na cDNA

1. Do PCR mikrozkušavky jsem napipetovala 20 µl vyizolované RNA a 2 µl *random hexamer primer* (zásobní roztok 0,2 µg/ µl).
2. Mikrozkušavky jsem umístila do thermocycleru a inkubovala je 5 min při 70 °C.
3. Vzorky jsem přemístila na led a přidali k nim 8 µl *RevertAid Reverse Transcriptase pufri* (5x koncentrovaný), 0,8 µl *dNTP mix* (ZR 10mM), 1 µl *RNase inhibitor* (ZR 20U/ µl) a 6,2 µl DEPC-H₂O. Celkový objem reakce 38 µl.
4. Inkubovala jsem 5 min při 25 °C.
5. Přidala jsem 0,2 µl *RevertAid Reverse Transcriptase* (ZR 200 U/ µl).
6. Inkubovala jsem 10 min při 25 °C.
7. Inkubovala jsem 1 h při 42 °C.
8. Pro ukončení reakce jsem inkubovala ještě 10 minut při 70 °C.
9. Koncentraci a čistotu cDNA jsem změřila pomocí NanoDropu.

10. Provedla jsem kontrolu úspěšnosti převodu RNA na cDNA pomocí horizontální gelové elektroforézy.

4.10. **Ověření funkčnosti primerů metodou PCR**

1. Do PCR mikrokumavky jsem napipetovala PCR reakci následujícího složení:

premix One Taq Hot Start	12,5 µl
forward primer	0,5 µl
reverse primer	0,5 µl
template DNA	200 ng – 1 µg
nuclease free-water	doplňit objem do 25 µl

2. PCR reakce probíhala podle následujícího programu:

- ✓ Úvodní denaturace 95 °C 3 min
 - ✓ Denaturace 95 °C 30 s
 - ✓ Nasedání primerů 52,0 °C 30 s
 - ✓ Elongace 72 °C 30 s
 - ✓ Konec elongace 72 °C 3 min
 - ✓ Chlazení vzorků při 4 °C
- } 35x

3. Pro ověření správnosti reakce jsem použila horizontální gelovou elektroforézu

4.11. **Horizontální gelová elektroforéza**

1. Připravila jsem si 1,5 % (w/v) agarózový gel: Do 50 ml 1x TAE jsem přidala 0,5 g agarózy a zamíchala v baňce
2. Gel jsem po dobu jedné minuty povařila v mikrovlnce a promíchávala až se agaróza v baňce úplně rozpustila
3. Gel jsem nechala chladnout a během toho jsem do baňky přidala 2,5 µl 1 % zásobního roztoku ethidium bromidu
4. Obsah baňky jsem vylila do formičky na gel
5. Do vybraných míst jsem umístila dva hřebínky a gel nechala ztuhnout
6. Ztuhlý gel jsem přemístila do vaničky na horizontální elektroforézu s TAE pufrem
7. Připravila jsem si vzorky na elektroforézu:
 - a. Jako marker jsem v jamkách mikrotitrační destičky smíchala 2 µl *Gene Ruler DNA Ladder Mix* a 3 µl *DNA loading dye*.
 - b. Pro vlastní vzorky jsem smíchala 5 µl cDNA a 3 µl *DNA loading dye*
 - c. Všechny vzorky jsem napipetovala do jamek v gelu.
 - d. Pro separaci molekul v gelu jsem použila stejnosměrné napětí o velikosti 4 V/cm².

4.12. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

1. Pro kvantitativní RT PCR jsem použila komerční kit Luna Universal qPCR Master Mix. Do 1,5 ml mikrozkušavek jsem si připravila premixy – jeden s referenčními primery *gyrB*, další se sledovanými primery pro geny *hyp*, *agrB*, *glmU* a *maIII*. Pro jeden templát měl premix následující složení:

Komerční kit Luna 10 μ l
Primer F 1 μ l
Primer R 1 μ l
Beznukleázová voda 3 μ l
Celkový objem 15 μ l

2. Premixy jsem rozpipetovala do 384 jamkové destičky pro qPCR po 15 μ l a do každé jamky jsem přidala 5 μ l templátu cDNA v technických duplikátech (v případě kontrolní reakce 5 μ l beznukleázové vody)
3. Destičku jsem zalepila folií a krátce zcentrifugovala na Centrifuge 5430 (Eppendorf)
4. Destičku jsem vložila do Real-time PCR cycler ROCHE LC480, kde jsem spustila následující program:
 - ✓ Úvodní denaturace 94 °C 15 min
 - ✓ Denaturace 95 °C 10 s
 - ✓ Nasednutí primerů 52 °C 10 s
 - ✓ Prodlužování primerů 72 °C 25 s45x
- ✓ „Melting curve analysis“: Denaturační analýza
- ✓ Postupné zvýšení teploty na 72 °C (4,8 °C / s)
- ✓ Chlazení destičky na 4 °C

4.13. Měření optické hustoty

Ke stanovení hustoty bakteriální populace v tekutém BHI médiu jsem používala metodu měření optické hustoty kultury pomocí spektrofotometru Helios γ . K měření jsem nastavila vlnovou délku světla 600 nm (OD_{600}). Jako blank jsem používala dH_2O nebo BHI médium. Objem pro měření byl 2 ml. Použity byly jednorázové plastové kyvety.

4.14. Mnohonásobné měření optické denzity v mikrotitrační destičce

1. Pokus jsem provedla stejně jako křivku hynutí (viz kapitola 4.5.) až do kroku 5.
2. Po dosažení OD_{600} přibližně 0,5 jsem z baněk, ve kterých se kultura inkubovala s antibiotiky (ciprofloxacin, oxacilin, vankomycin), odebrala 300 μ l kultury do mikrozkušavky.
3. Do odpovídajících baněk jsem následně přidala stonásobnou koncentraci minimální inhibiční koncentrace antibiotika.
4. V UV boxu jsem s odebranými vzorky vytvořila ředící řady od 10^0 až 10^{-4} nebo 10^0 , 1:1, 2:3, 10^{-1} v předem zahřátém BHI.
5. Jednotlivá ředění jsem v technických triplicátech v množství 100 μ l napipetovala do sterilní 96 jamkové mikrotitrační destičky. Do třech jamek jsem napipetovala čisté BHI jako blank a negativní kontrolu.
6. Takto zhotovenou destičku jsem dala měřit na spektrofotometru VarioSkan, po dobu 4 hodin a nastavila program:

Incubate 34 °C	kontinuální teplota inkubace
Shake – speed 600, 5	nastavení třepačky
Kinetic loop – 20 min, 12x	četnosti měření – 12x po 20 minutách
-> Photometric – 600 nm	měření OD při 600 nm

7. Antibiotika jsem na bakteriální kultury nechala působit 4 hodiny, poté jsem ze všech třech baněk odebrala 300 μ l kultury, zcentrifugovala (3200 x g, 5 min, laboratorní teplota), odebrala supernatan a doplnila 300 μ l zahřátým BHI médiem. S těmito vzorky jsem provedla kroky 4 a 5.
8. Zhotovenou destičku jsem dala měřit na spektrofotometru VarioSkan (krok 6) s upraveným množstvím měření (30x po 20 minutách)

5. Výsledky

5.1. Charakteristika kmenů - adaptační mutace

Cíl: Podle sekvence chronologických izolátů vyhledat mutace v kandidátních genech pro perzistenci (agr) a sledovat další částé. Vybrat geny pro stanovení jejich exprese během antibiotického stresu.

Pro svou diplomovou práci jsem využívala údaje ze sekvenace, která byla provedena v MBÚ AV ČR s.r.o. Naše chronologické izoláty byly podle MLST sekvence a spa typizace dány do příbuznosti. Nalezené mutace odpovídají zjištění, že primárním regulátorem perzistence u *Staphylococcus aureus* je Agr modul (viz kapitola 2.4.2.). U prvního pacienta se objevila delece v promotorové oblasti mezi geny *agrB* a *hld* u nejpozději odebraného izolátu (38A), tedy asi 1,2 roku po diagnostikování cystické fibrózy. Podobný případ nastal i u druhé trojice chronologických izolátů, kdy se v nejpozději odebraném izolátu (44A) objevila missense mutace v genu *agrA* (vedoucí k záměně isoleucinu za asparagin). Další několikrát se objevená mutace, a z našeho pohledu tedy významná, byl frameshift u genu pro protein s dosud hypotetickou funkcí. Tento gen je v práci označován jako *hyp* a je zajímavé, že jde o gen lokalizovaný ve společném operonu s genem *glmU*. Genu *glmU* byla prokázána duální funkce při tvorbě aktivovaného prekurzoru buněčné stěny UDP-N-acetylglukosaminu a syntézy lipidu A (Mengin-Lecreulx & Van Heijenoort, 1994).

Pro stanovení míry genové exprese jsme vybrali geny, v kterých se podle sekvenace objevila mutace. Šlo o geny *hyp*, *glmU*, *agrA* a *rnaIII*, kdy *agrA* a *rnaIII* jsou součástí Agr modulu (viz kapitola 2.4.2.) a zbylé vybrané dva jsou popsány výše.

V izolátu 38C se jako další adaptační mutace objevila mutace v MutS, což je typická adaptační mutace, která se často objevuje i v izolátech *S. aureus* z plic pacientů trpících cystickou fibrózou (Prunier et al. 2003). Souvislost s perzistencí prokázána prozatím nebyla, proto jsme se jí dále nezabývala.

Se všemi vybranými klinickými izoláty jsem následně stanovila míru perzistence zhotovením křivek hynutí a pomocí VarioSkanu (viz kapitoly 5.3. a 5.6.), a také měření membránového potenciálu pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 5.4.). Díky těmto výsledkům a znalosti sekvence bylo následně možné usuzovat, jak tyto mutace mění schopnost perzistovat, a také jak ovlivňují fyziologii perzistorů.

	Mutace mutS	Mutace mutL	Mutace Agr	Mutace SigB	Další sledované mutace	ATB citlivost
28A	x	x	x	x		citlivý
37A	x	x	x	x	frameshift GlmU	citlivý
38A	x	x	delece AgrB/hld	x	frameshift GlmU	citlivý
38C	369ST	x	x	x	frameshift GlmU	citlivý
42A	x	x	x	x		citlivý
43A	x	x	x	x		citlivý
44A	x	x	AgrA 84IN	x		citlivý

Tabulka č. 1: Výskyt mutací v reparačním systému mutS/mutL, v kandidátních genech pro perzistenci (Agr a SigB), a také další časté nalezené mutace společně s citlivostí k antibiotikům. Dodáno z MBÚ AV ČR.

5.2. Určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) klinických izolátů

Cíl: Stanovit minimální inhibiční koncentraci u studovaných izolátů

Pro pokusy, kdy byla kultura vystavována antibiotikům, bylo potřeba stanovit MIC pro vybraná antibiotika u všech klinických izolátů, které byly v experimentech studovány. Pro stanovení MIC jsem použila komerční sadu Microlatest (viz kapitola 4.4). Získané výsledky mi později bylo dodáno i z FN v Motole, proto jsem je mohla mezi sebou porovnat a jejich hodnoty odpovídaly těm mnou zjištěným. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 2.

Pacient	Izolát	Ciprofloxacin ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Oxacilin ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Vankomycin ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1.	28A	0,5	1	1
	37A	0,5	1	1
	38A	0,5	1	1
	38C	0,5	1	1
2.	42A	0,5	0,25	1
	43A	0,5	0,25	1
	44A	0,5	0,12	2

Tabulka č. 2: Naměřené MIC studovaných izolátů pro jednotlivá používaná antibiotika

5.3. Stanovení křivek hynutí po působení antibiotik pro chronologické izoláty

Cíl: Stanovit křivky hynutí po působení třech vybraných antibiotik a stanovit míru schopnosti perzistovat u jednotlivých izolátů metodou CFU.

Stanovila jsem křivky hynutí postupným vyséváním bakteriální kultury, která byla v exponenciální fázi vystavena působení antibiotika o koncentraci 100x MIC. Postupovala jsem,

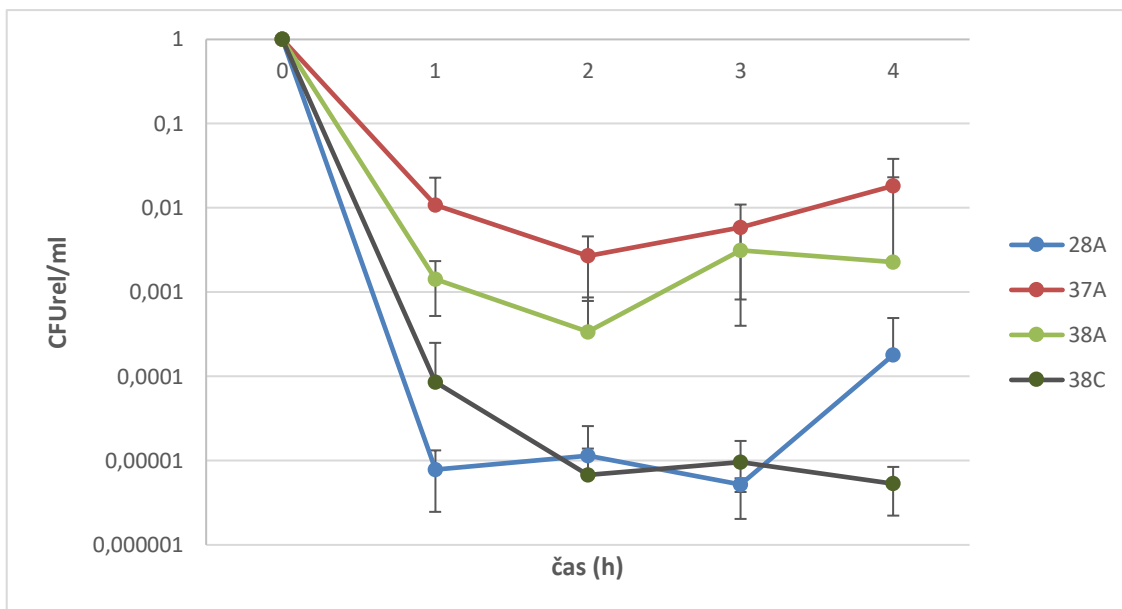
jak je popsáno v kapitole 4.1.5. Vysévala jsem metodou kapkového výsevu na agarovou plotnu ve čtyřech ředěních ($10^{-1} - 10^{-4}$). Pro kontrolu a eliminaci chybějících hodnot, kdy některá nízká ředění nevyrostala, jsem pro každé antibiotikum v každé hodině vysévala jedno ředění i metodou celoplošného roztěru (viz kapitola 4.5., bod g.). Všechny pokusy jsem provedla v biologických triplikátech.

Aby bylo možné porovnávat jednotlivé biologické replikáty, hodnoty CFU z jednotlivých odběrů jsem vztáhla na CFU kontroly (čas T0 před přidání antibiotik) podle vzorce:

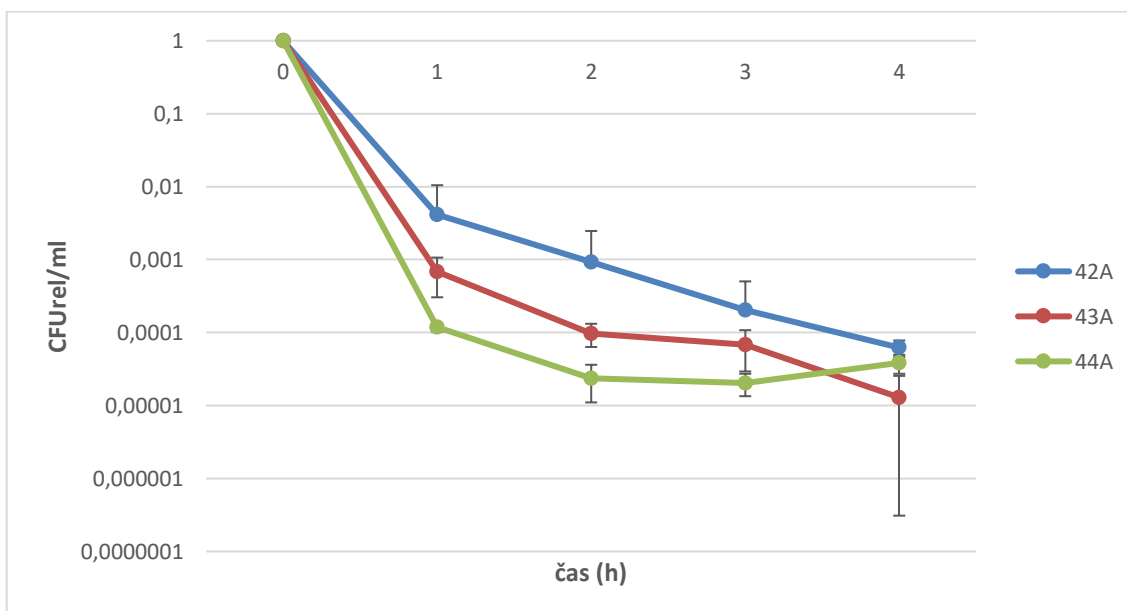
$$CFU_{rel} = \frac{CFU(T1 - T5)}{CFU_{T0}}$$

Pro stanovení křivek hynutí jsem používala takové druhy antibiotik, které se běžně používají na léčbu infekcí u pacientů s cystickou fibrózou a mají rozdílný mechanismus působení. Používala jsem je v koncentraci odpovídající stonásobku jejich MIC. Jednalo se o fluorochinolonové antibiotikum ciprofloxacin, beta-laktamové antibiotikum oxacilin a glykopeptidové antibiotikum vankomycin.

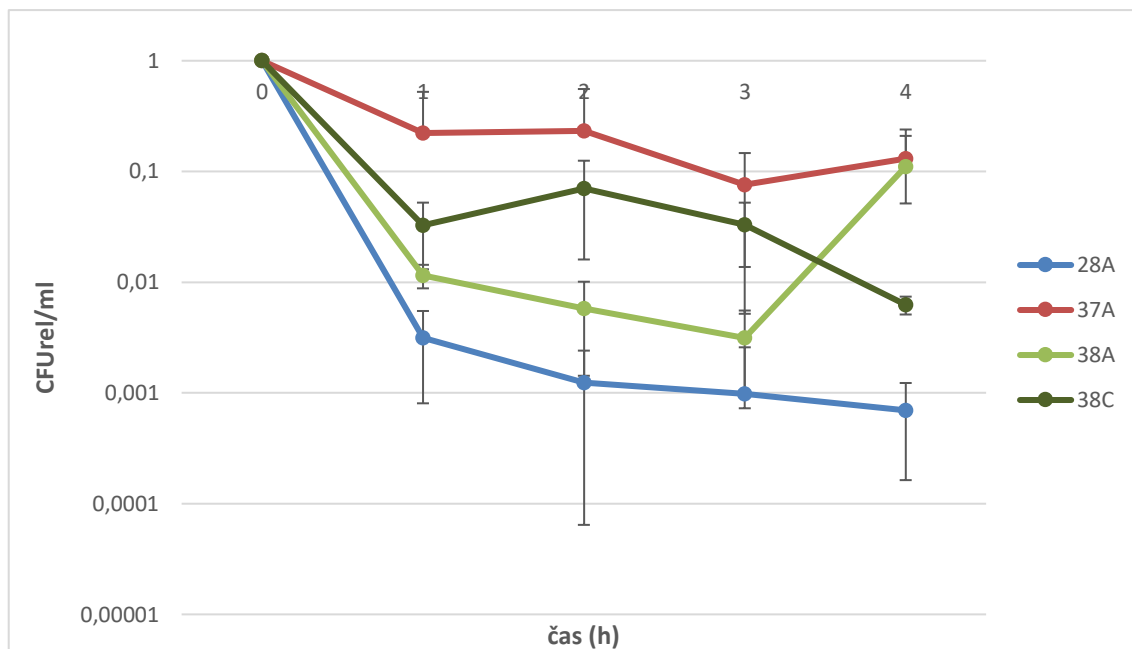
Abych mohla porovnat, jak se změnila schopnost jednotlivých izolátů perzistovat v čase, vynesla jsem tři chronologické izoláty do společného grafu, a to pro každé antibiotikum zvlášť. Viz grafy č. 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b.



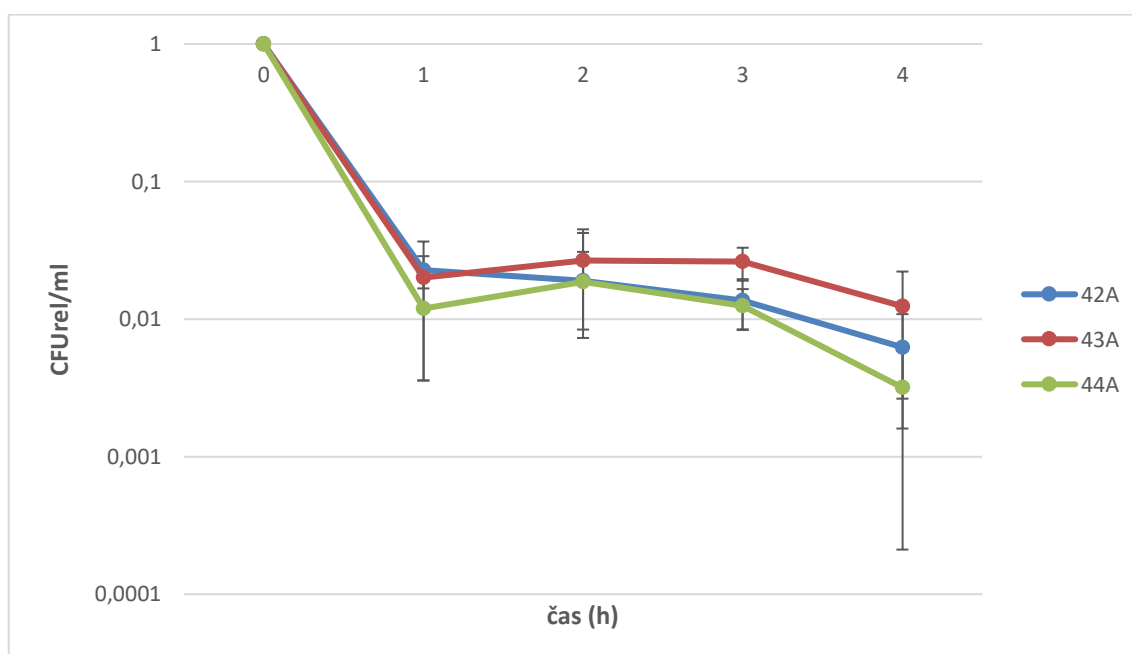
Graf č.1a: Křivka hynutí u izolátů 28A, 37A, 38A a 38C po působení 100x MIC **ciprofloxacinu**. Graf znázorňuje relativní počet přeživších buněk v každé hodině v průběhu působení antibiotika. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmičky při základu 10. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů.



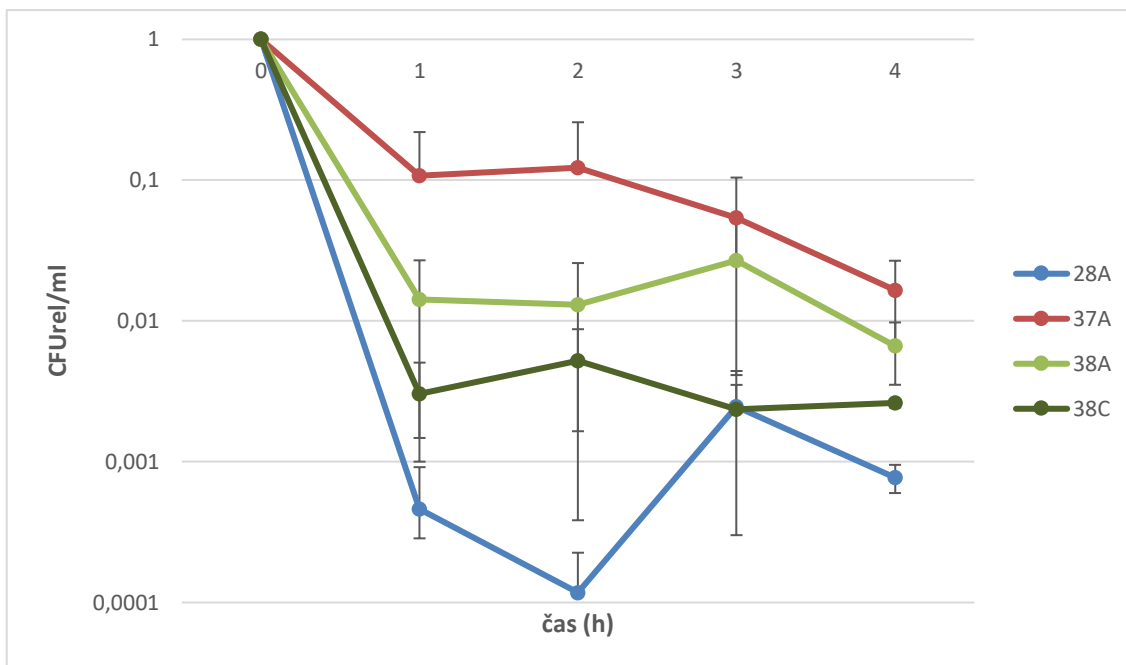
Graf č. 1b: Křivka hynutí u izolátů 42A, 43A, 44A po působení 100x MIC **ciprofloxacinu**. Graf znázorňuje relativní počet přeživších buněk v každé hodině v průběhu působení antibiotika. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmičky při základu 10. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů.



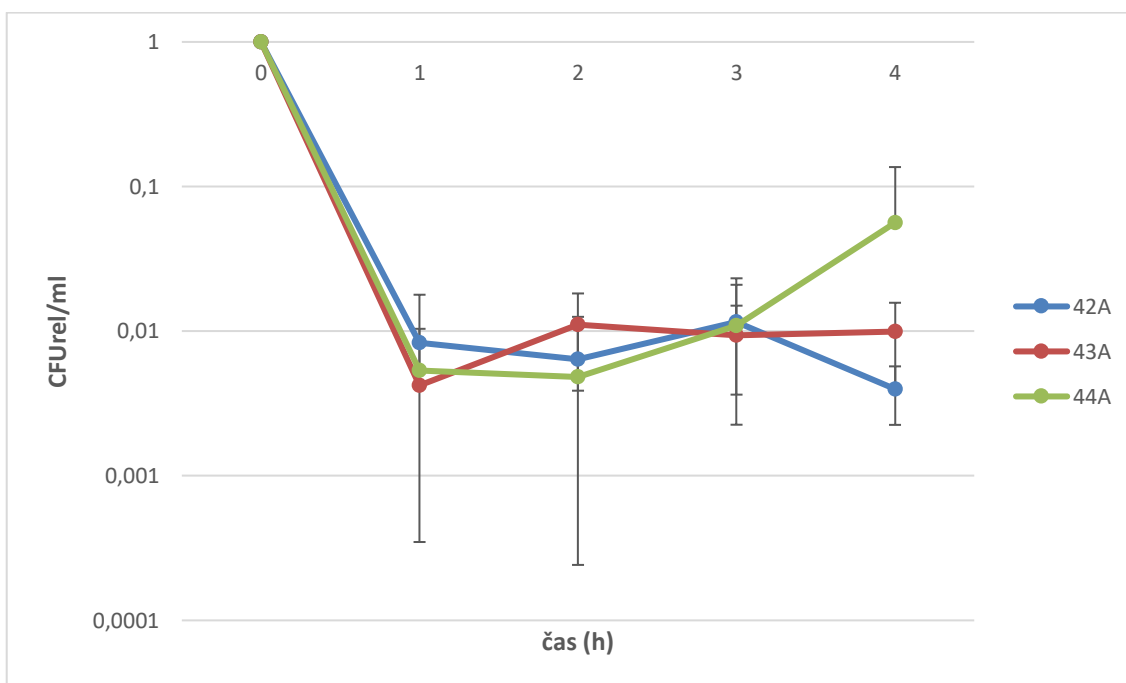
Graf č. 2a: Křivka hynutí u izolátů 28A, 37A, 38A a 38C po působení 100x MIC **oxacilinu**. Graf znázorňuje počet přeživších buněk v každé hodině v průběhu působení antibiotika. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmičticky při základu 10. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 2b: Křivka hynutí u izolátů 42A, 43A, 44A po působení 100x MIC **oxacilinu**. Graf znázorňuje počet přeživších buněk v každé hodině v průběhu působení antibiotika. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmičticky při základu 10. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 3a: Křivka hynutí u izolátů 28A, 37A, 38A, 38C po působení 100x MIC **vankomycinu**. Graf znázorňuje počet přeživších buněk v každé hodině v průběhu působení antibiotika. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmicky při základu 10. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 3b: Křivka hynutí u izolátů 42A, 43A, 44A po působení 100x MIC **vankomycinu**. Graf znázorňuje počet přeživších buněk v každé hodině po působení antibiotika. Hodnoty na ose y jsou vyneseny logaritmicky při základu 10. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů.

U všech studovaných chronologických izolátů jsem pozorovala charakteristickou bifázickou křivku hynutí. Při srovnání jednotlivých antibiotik jsem sledovala následující.

Po ciprofloxacinu se míra schopnosti perzistovat u první čtveřice chronologických izolátů zvýšila, a to o dva řády oproti primoizolátu. U další trojice chronologických izolátů se míra schopnosti perzistovat oproti primoizolátu mírně snížila. V tomto případě šlo o snížení v rámci jednoho a půl řádu. Rozdílný výsledek je nejspíše způsoben tím, že v první čtveřici chronologických izolátů se vyskytla mutace v *Agr* lokusu, která má podle všech dostupných informací na zvýšení perzistence zásadní vliv (viz diskuze).

Jak vyplývá z křivek hynutí pro oxacilin, schopnost perzistovat se u prvního pacienta po roce zvýšila o dva řády. Po roce zase klesla o více než jeden řád, nicméně stále zůstává vyšší než u primoizolátu. U druhého pacienta se schopnost perzistovat v čase v závislosti na působení oxacilinu téměř nezměnila.

Působení vankomycinu ukázalo, že schopnost perzistovat se u prvního pacienta změnila a to tak, že se v čase zvýšila s maximálním rozdílem třech řádů. U druhého pacienta zůstala schopnost perzistovat opět nezměněná. Ve všech případech vznikalo méně perzistorů po působení ciprofloxacinem, a to o 1-2 řády. Nejvíce perzistorů vznikalo po působení oxacilinem, ale oproti vankomycinu nebyl rozdíl již tak velký.

Obecně lze shrnout, že u chronologických izolátů od prvního pacienta (28A, 37A, 38A a 38C) byly změny ve schopnosti perzistovat v čase patrné, a to tak, že schopnost perzistovat se v čase zvýšila. U chronologických izolátů od druhého pacienta (42A, 43A, 44A) nebyly rozdíly v čase tak patrné. Jen u působení ciprofloxacinem se schopnost tvořit perzistory o 1,5 řádu snížila oproti primoizolátu (42A). Jsou zde však často velké směrodatné odchylky, které mohou být dány nepočítelným CFU v malých ředěních, a naopak obtížným vyrůstáním v nízkých ředěních (viz diskuze).

Izoláty 38A a 38C jsou odebrány ve stejný čas, kdy 38A má oproti 38C delecii v *agrB/hld* a dvojice slouží tedy pro průkaznější srovnání vlivu této mutace na schopnost perzistovat. Zjistili jsme, že v případě ciprofloxacinu se schopnost perzistovat liší o dva řády, a v případě antibiotik působících na stěnu - oxacilinu a vankomycinu o jeden řád, ale zde s velkými SD.

5.4. Vliv antibiotik na membránový potenciál u jednotlivých izolátů

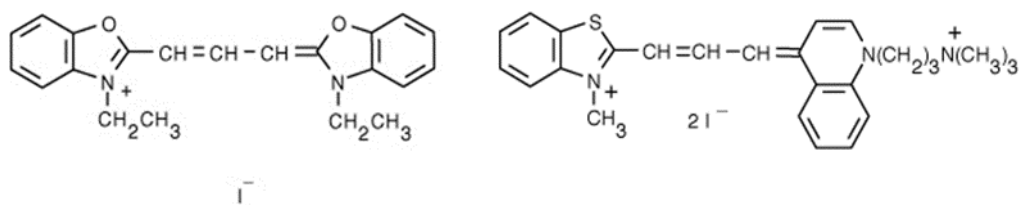
Cíl: Pozorovat vliv studovaných antibiotik na formování subpopulace s nižším membránovým potenciálem a tuto subpopulaci kvantifikovat vůči mrtvým a buňkám s membránovým potenciálem.

V tomto experimentu jsem analyzovala chronologické klinické izoláty *S. aureus* 28A, 37A, 38A, 42A, 43 a 44A. V jednotlivých časech křivky hynutí – 1, 2, 3 a 4 hodiny od přidání antibiotika ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu. V časech jsem buňky odebrala, centrifugovala a resuspendovala v PBS. Potom jsem je dle návodu obarvila a změřila (postup a podmínky měření viz kapitola 4.6.). Všechna měření jsem provedla v biologickém triplicátu a kultura byla odebírána ze stejné kultivace jako pro sestavení křivek hynutí (viz kapitola 4.5.).

Pro studium fyziologie těchto chronologických izolátů jsem použila duální barvení fluorescenčními sondami DiOC2(3) (3,3'-diethyloxakarbokyanin jodid) a TO-PRO-3. TO-PRO-3 je hydrofilní molekula vykazující červenou fluorescenci, vázající se na nukleové kyseliny. Díky svým hydrofilním vlastnostem je neschopná projít membránou, prochází v ní jen v případě jejího poškození, a slouží tak jako indikátor mrtvých buněk. Naproti tomu DiOC2(3) je lipofilní molekula, která dobře prochází membránou pouze pokud má buňka membránový potenciál (Shapiro & Nebe von Caron, 2004). V případě, že DiOC2(3) neprochází membránou, tak vykazuje zelenou fluorescenci, při akumulaci v buňce však začne agregovat a dochází k posunu do červeného spektra. Takto se mi podařilo odlišit subpopulace s MP (červená fluorescence) a bez MP (zelená fluorescence). Protože buňky ztrácejí MP postupně a emisní spektra se tak mohou překrývat, je potřeba vynášet poměr zelené a červené fluorescence, takto (Novo et al. 2000):

$$\text{Dioc ratio} = \text{zelená fluorescence DiOC2(3)} / \text{červená fluorescence DiOC2(3)}$$

Kombinace těchto dvou fluorescenčních sond ve vnesení (Dioc ratio vůči TO-PRO-3) mi tak umožnila rozlišit tři subpopulace – buňky s membránovým potenciálem, buňky bez membránového potenciálu a buňky permeabilizované (mrtvé). Čtvrtou subpopulaci, která by měla představovat buňky s membránovým potenciálem, avšak permeabilizované, jsem neuvažovala, protože z hlediska fyziologie není takový stav možný. V tomto vnesení jsem rozdělila buňky do tří subpopulací pro časy T1–T4 po přidání antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu.



Obrázek č. 8: Chemická struktura molekul DiOC2(3) (vlevo) a TO-PRO-3 (vpravo), které jsem použila při měření na průtokovém cytometru. Převzato z fluorophores.org.

Pro rozlišení jsem si ještě musela připravit kontrolní vzorky. Celkem jsem si pro každý izolát v čase T0 připravila 3 kontroly - mrtvé buňky s permeabilizovanou membránou (zahřátí na 80 °C po dobu 15 min), buňky se zkratovaným MP, ale s neporušené membránou (přidáním 500μM CCCP) a buňky neobarvené.

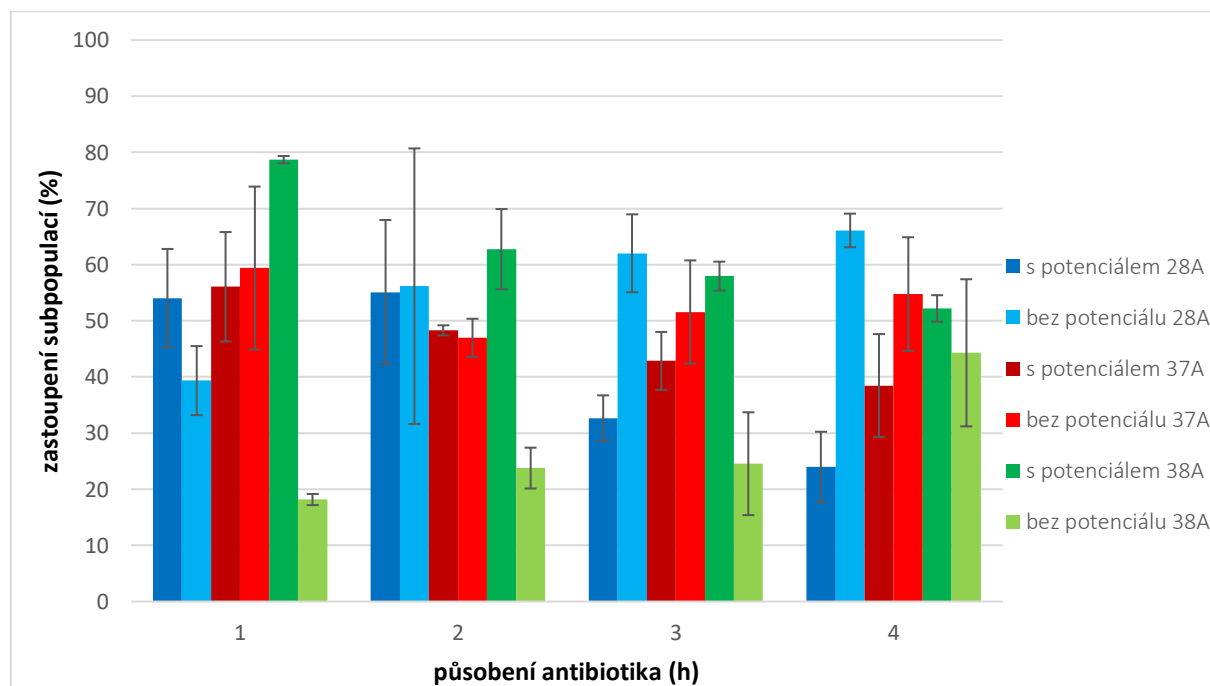
Výsledky jsem nejprve vyhodnocovala v programu Cytexpert. Pro rozbor procentuálního zastoupení populací jsem použila program FloJo. V programu FloJo jsem vynesemím FSC vůči SSC vhodně odlišila subpopulace buněk od zbytků membrán a proteinů, abych testovala v následujících vyneseních pouze buňky. Buňky jsem následně analyzovala ve vynesení Dioc ratio vůči TO-PRO-3. Abych mohla sledovat, jak se měnilo zastoupení subpopulací v čase, a jak se toto zastoupení liší mezi chronologickými izoláty, vynesla jsem výsledky do grafů (viz grafy č. 4a, 4b, 4c, 5a, 5b, 5c). Procentuální zastoupení mrtvé subpopulace jsem pro větší přehlednost do grafů nevynešela.

U první trojice chronologických izolátů došlo po působení ciprofloxacinu k postupné ztrátě membránového potenciálu. Nicméně u izolátu, odebraného s odstupem třičtvrtě roka (37A), bylo procento buněk bez potenciálu menší než v primoizolátu (28A), a v izolátu s ročním odstupem (38A) pak dokonce buňky s potenciálem převládaly nad těmi bez potenciálu a to i v čase T4 (viz graf č. 3a). 38A má již delecii v *agrB/hld*, což může být důvodem lepšímu odolávání antibiotiku. V případě působení oxacilinu a vankomycinu, což jsou antibiotika působící na buněčnou stěnu došlo ke ztrátě membránového potenciálu ihned v čase T1 a tento poměr se již významně neměnil po celou dobu experimentu (viz grafy č. 3b, 3c). Jen u primoizolátu 28A v čase T1 nedocházelo k ztrátě membránového potenciálu po působení oxacilinu oproti následným izolátům 37A a 38A tak výrazně (viz graf č. 3b).

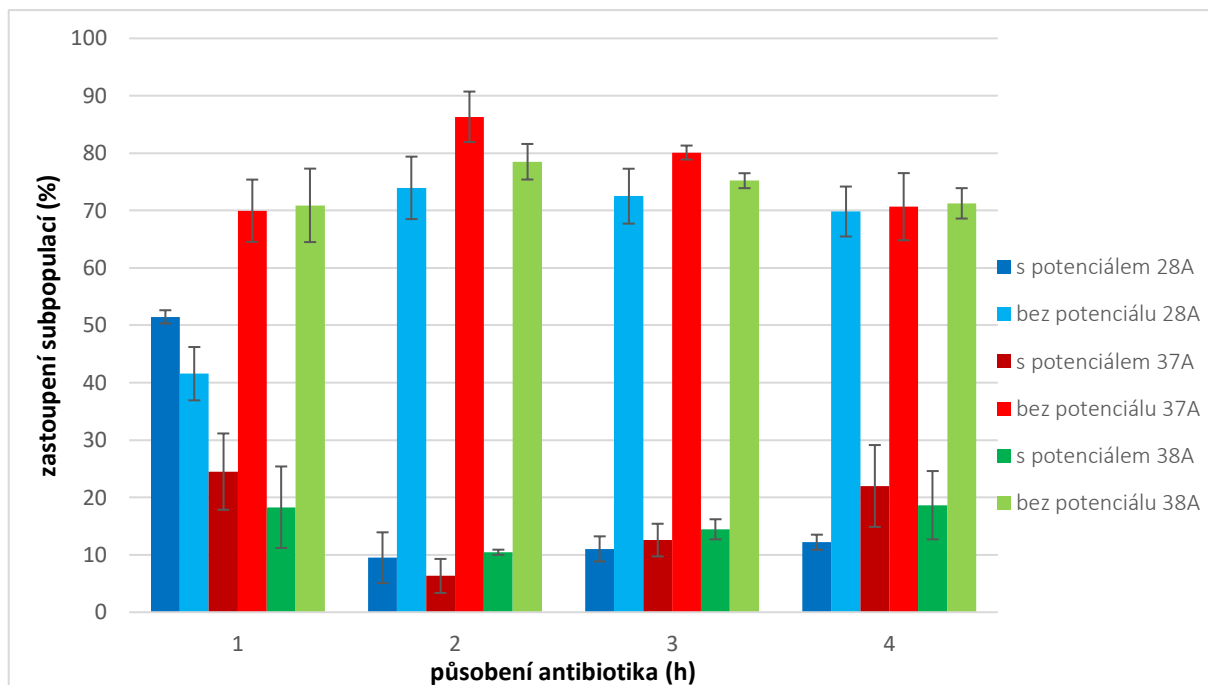
U druhé trojice chronologických izolátů došlo po působení ciprofloxacinu také k postupné ztrátě membránového potenciálu a v čase T4 pozorujeme procentuální vyrovnání subpopulací, kdy obě zaujímají zhruba 50 %. V čase T2 a T3 lze vidět jistou tendenci u pozdějších izolátů (43A a 44A) lépe si udržet membránový potenciál oproti primoizolátu (42A) (viz graf č. 4a). Důvodem může být zase skutečnost, že jsou izoláty lépe adaptované, a že u izolátu 44A se objevila první bodová záměna v genu *agrA*. Zajímavější je situace u oxacilinu, kdy oproti

první trojici izolátů nedošlo k dramatickému snížení membránového potenciálu, přestože jde o antibiotikum působící na buněčnou stěnu. Po čtyřech hodinách působení se počet buněk, které neměly potenciál dokonce snížil oproti časům T2 a T3 a to v případě všech izolátů (viz graf č. 4b). V případě vankomycinu byla situace již značně podobná první trojici izolátů, kdy došlo k rychlé ztrátě membránového potenciálu v čase T1 a zůstalo to u všech izolátů nezměněno až do času T4 (viz graf č. 4c).

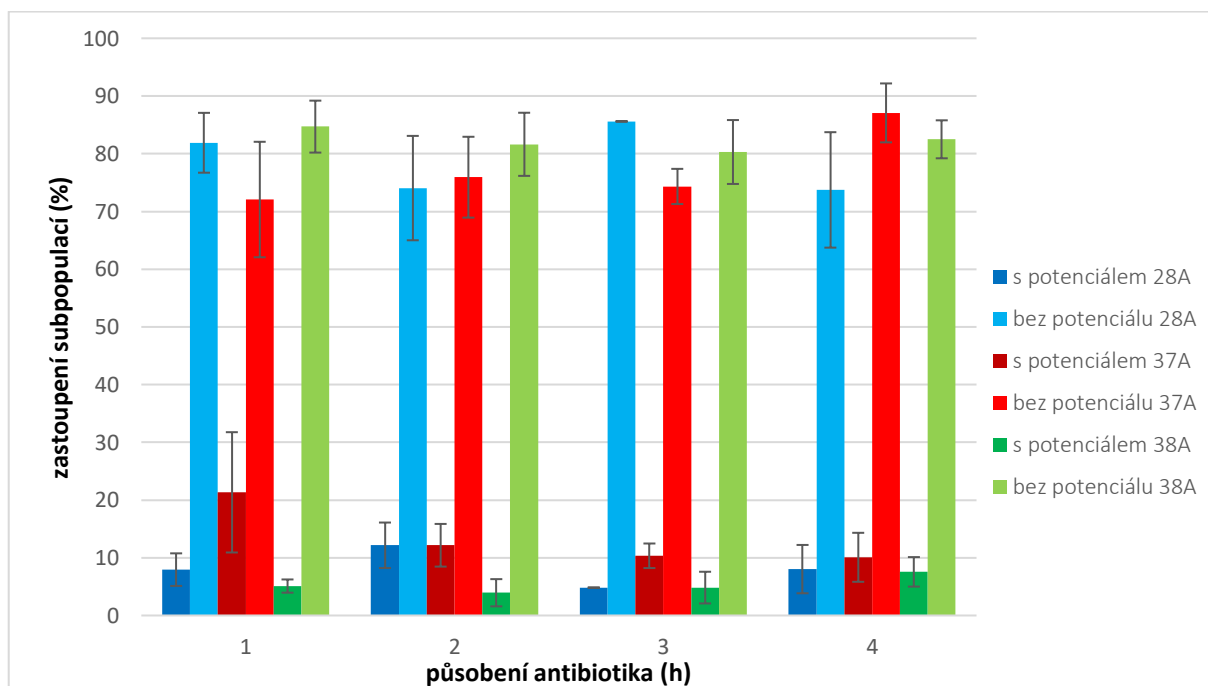
Z vynesných grafů lze vyvodit, že na fyziologický stav buněk má větší vliv použité antibiotikum spíše než genetická podstata izolátu samotného. Pouze v případě ciprofloxacinu působícího na gyrázu, lze pozorovat, že delece genu *agrB/hld* může nejspíše stafylokoků zvyhodňovat v boji s antibiotiky. K přesnějším závěrům by bylo potřeba srovnat více izolátů, které mají zásadní mutace v hlavním regulátoru perzistence - Agr modulu nebo připravit mutanta pouze se změnou v Agr systému.



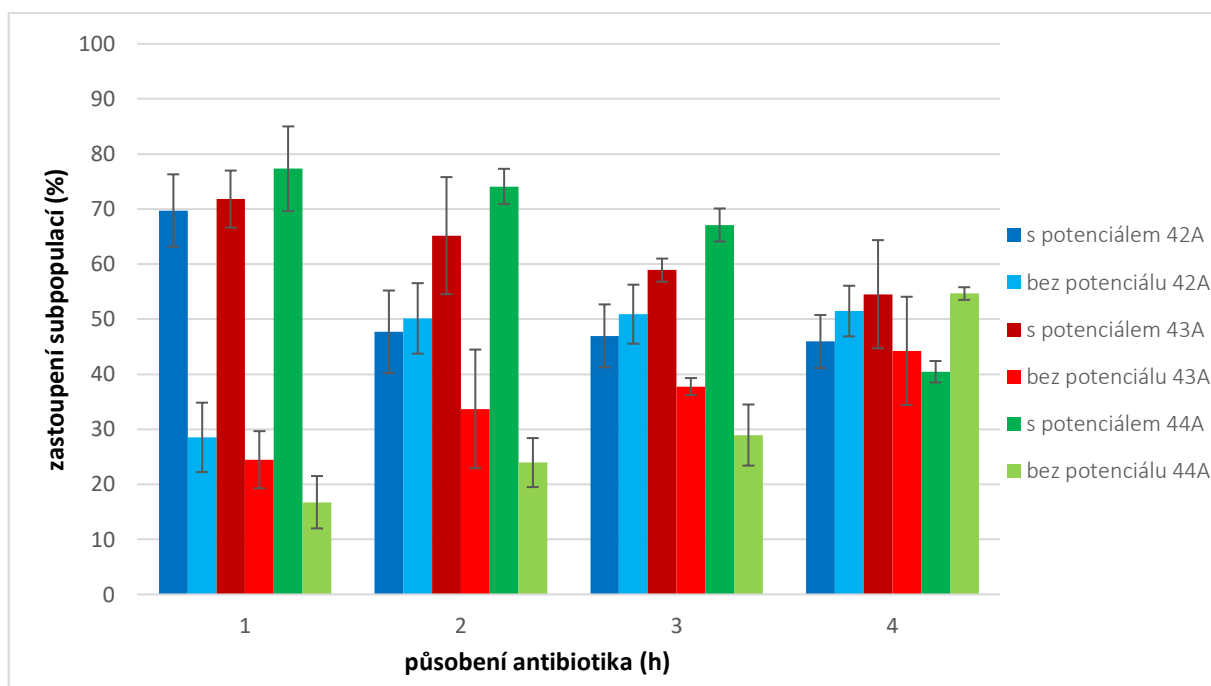
Graf č. 3a: Zastoupení buněk s potenciálem a bez potenciálu v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení 100x MIC ciprofloxacinu u první trojice chronologických izolátů. Vynesné hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



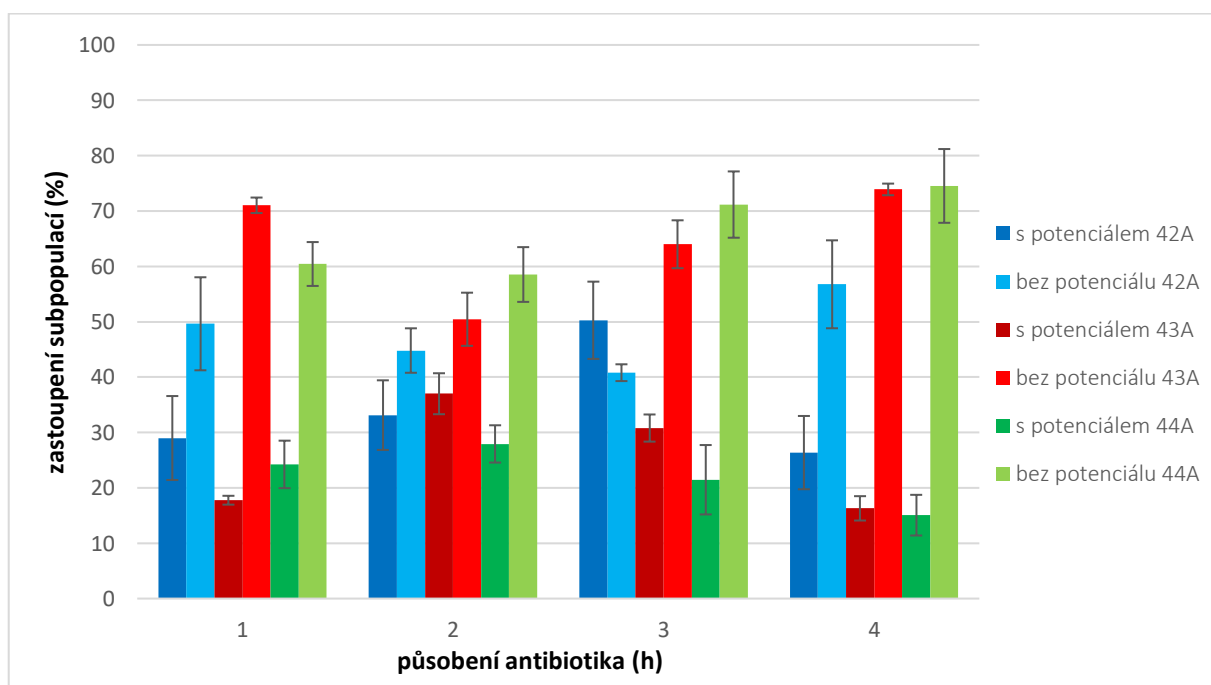
Graf č. 3b: Zastoupení buněk s potenciálem a bez potenciálu v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení 100x MIC oxacilinu u první trojice chronologických izolátů. Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



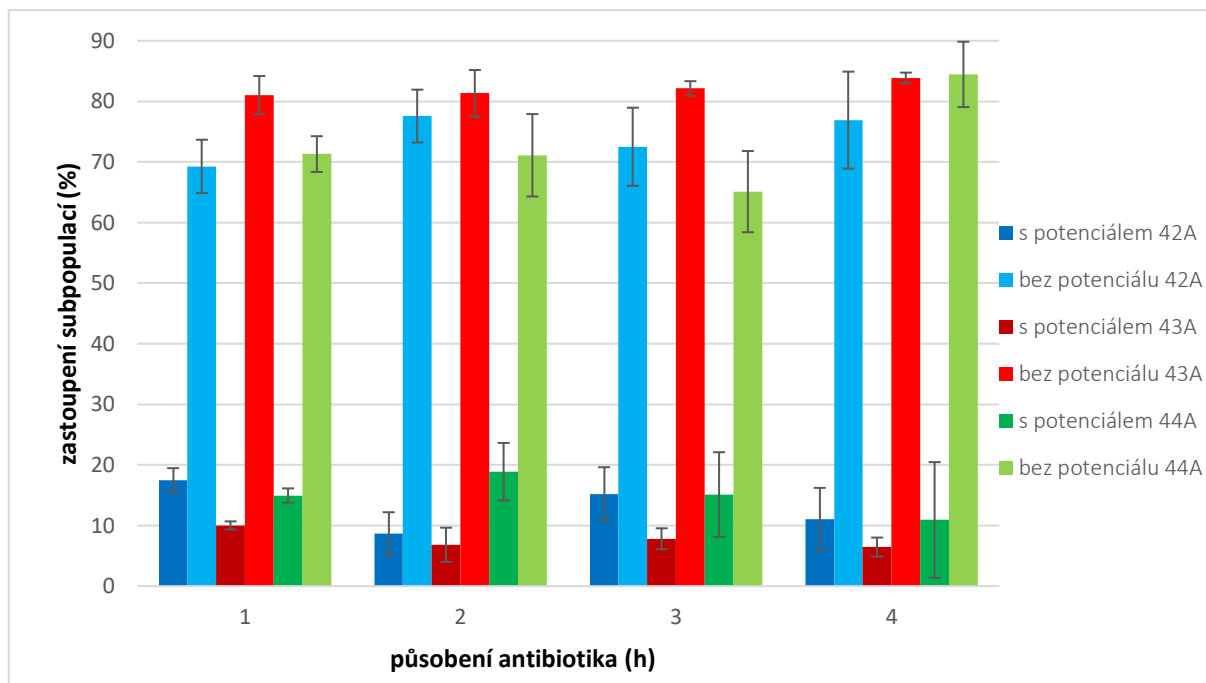
Graf č. 3c: Zastoupení buněk s potenciálem a bez potenciálu v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení 100x MIC vankomycinu u první trojice chronologických izolátů. Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 4a: Zastoupení buněk s potenciálem a bez potenciálu v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC ciprofloxacinu u druhé trojice chronologických izolátů**. Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 4b: Zastoupení buněk s potenciálem a bez potenciálu v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení **100x MIC oxacilinu u druhé trojice chronologických izolátů**. Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.



Graf č. 4c: Zastoupení buněk s potenciálem a bez potenciálu v populaci (%) v průběhu času křivky hynutí (1, 2, 3, 4 hodiny) po působení 100x MIC vankomycinu u druhé trojice chronologických izolátů. Vynesené hodnoty jsou průměrem ze tří biologických replikátů. Chybové úsečky ukazují standardní odchylky ze tří biologických replikátů.

5.5. Stanovení exprese genů *hyp*, *glmU*, *agrA*, *rnaIII* metodou kvantitativní qPCR u první trojice chronologických izolátů

Cíl: Posoudit, zda a v jaké míře jsou v průběhu křivky hynutí exprimovány geny *hyp*, *glmU*, *agrA* a *rnaIII*.

Pro určení míry exprese genů našeho zájmu v průběhu křivky hynutí jsem vyzolovala RNA v jednotlivých časech a poté ji převedla na cDNA reverzní transkripcí (viz kapitola 4.9.). Koncentraci cDNA jsem změřila na Nanodropu (viz tabulka č. 3), který také ověřil čistotu izolované RNA a cDNA u jednotlivých vzorků. Ve všech případech bylo znečištění zanedbatelné.

označení vzorku	čas (min)	ciprofloxacín koncentrace cDNA	oxacilin koncentrace cDNA	vankomycin koncentrace cDNA
28A	0"	1927,8 ng/μl	1876,1 ng/μl	1901,5 ng/μl
	10"	2648,1 ng/μl	2814,5 ng/μl	338,478 ng/μl
	30"	2209,4 ng/μl	1796,3 ng/μl	403,651 ng/μl
	90"	3094,3 ng/μl	3520 ng/μl	1417,929 ng/μl
37A	0"	2047,69 ng/μl	1745,364 ng/μl	1869,2 ng/μl
	10"	637,586 ng/μl	572,416 ng/μl	359,577 ng/μl
	30"	458,026 ng/μl	1090,353 ng/μl	961,212 ng/μl
	90"	890,394 ng/μl	649,326 ng/μl	917,296 ng/μl
38A	0"	4164,940 ng/μl	1786,47 ng/μl	1058,267 ng/μl
	10"	10990,591 ng/μl	780,322 ng/μl	3382,056 ng/μl
	30"	777,250 ng/μl	816,043 ng/μl	919,436 ng/μl
	90"	817,665 ng/μl	740,808 ng/μl	1066,255 ng/μl

Tabulka č. 3: Koncentrace převedené cDNA v jednotlivých časech odběru po působení vybraných antibiotik

Protože se hodnoty koncentrace cDNA se v jednotlivých vzorcích i časech lišily (viz tabulka č. 3), musela jsem přistoupit k vhodnému naředění cDNA na stejnou hodnotu koncentrace celkové cDNA. jako výchozí koncentraci jsem brala tu s nejmenší hodnotou (28A čas 30" vankomycin,) a zbylé vzorky vhodně naředila. Poté jsem přidala takové množství RNase-free water abych mohla do každé jamky přidat 5 μl, jak je uvedeno v protokolu (viz kapitola 4.9.).

Se získanou cDNA a příslušnými primery jsem provedla samotnou kvantifikaci jednotlivých transkriptů metodou RT PCR na přístroji LightCycler 480. Stejnou cDNA jsem použila také pro opětovné RT PCR. Každé ze dvou měření bylo provedeno pro všechny cDNA ze studovaných izolátů, a to v technickém duplikátu. Díky tomu jsem měla pro každý vzorek 4 hodnoty Ct, které jsem mohla zprůměrovat pro co nejpřesnější výsledek. K 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, a fluorofor vázající se do malého žlábků dsDNA, který je odvozený od SYBR® green I. Fluorescence vzrůstá v momentě vazby fluoroforu do malého žlábků dsDNA. 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. Všechny hodnoty Ct jsem získala pomocí programu LightCycler 480 Software, který je vypočítává automaticky.

Pro zjištění efektivity reakce jsem pro každý gen vytvořila ředící řadu se snižující se koncentrací DNA (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5}). K výpočtu jsem použila

matematický model vycházející z publikace z roku 2001 (Pfaffl, 2001). Nejdříve jsem z hodnot průměrné Ct pro standardní křivku v závislosti na přirozeném logaritmu z množství cDNA v ředící řadě ($\ln(cDNA)$) sestavila přímku, z jejíž směrnice jsem vypočítala účinnost reakce (efektivitu, Ef):

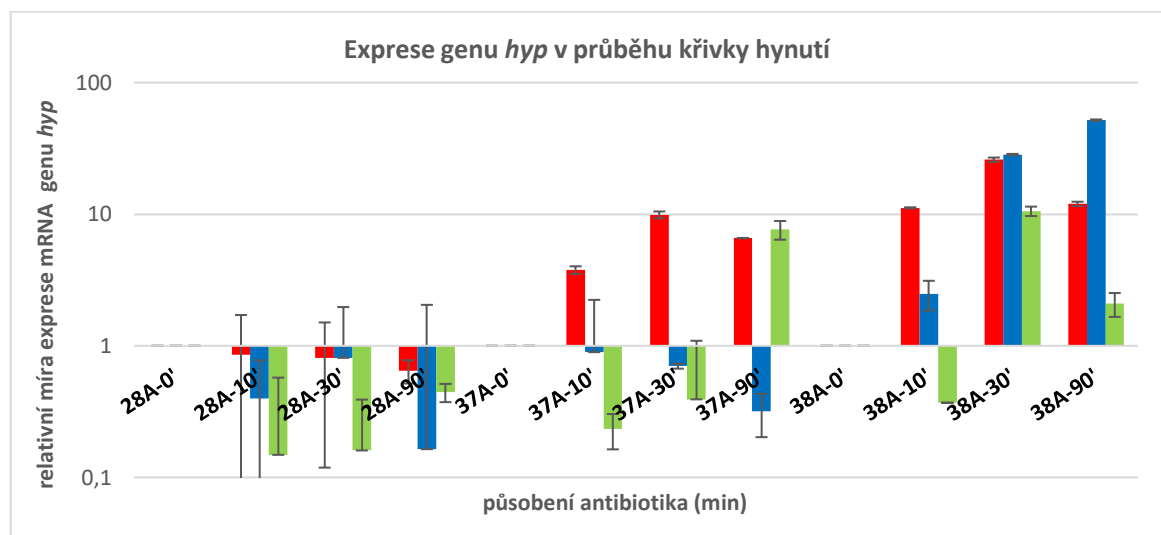
$$Ef = 10^{-1/směrnice}$$

Pro každý gen vyšla efektivita v rozmezí 1,96-2, což označuje velkou účinnost reakce. Účinnost jsem následně využila pro výpočty míry exprese sledovaných genů (*hyp*, *glmU*, *agrA*, *rnaIII*), které byly porovnávány s mírou exprese referenčního genu pro gyrázu (*gyrB*). Výpočet relativní míry exprese cílového genu (R) po přidání antibiotik ke kultuře (vzorek) jsem provedla podle rovnice (Pfaffl, 2001):

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

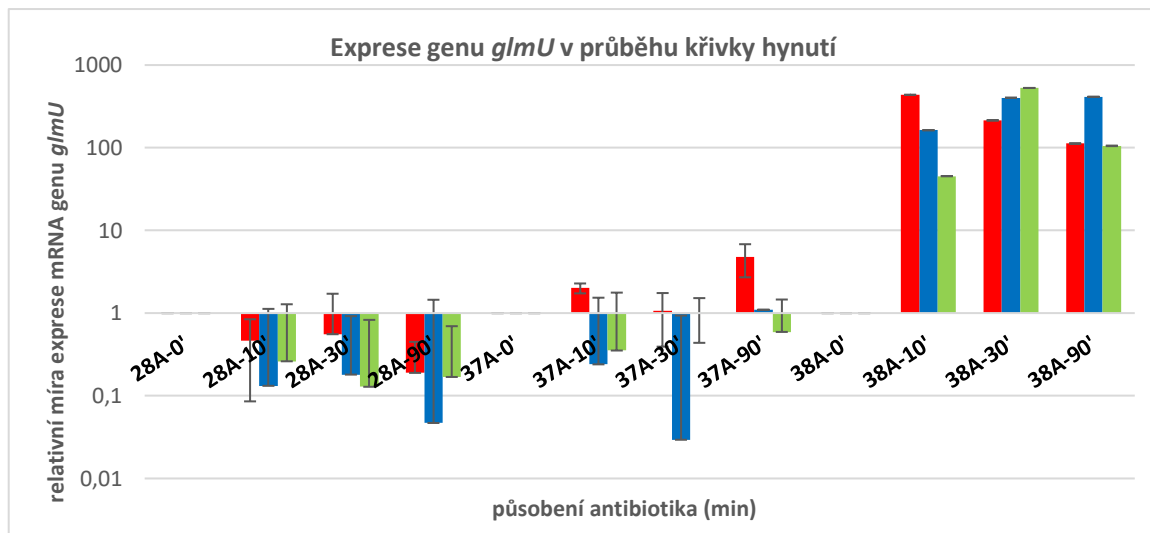
Pokud se hodnoty Ct u technických replikátů lišily o více než 0,5 nezapočítala jsem je do celkového průměru.

Abych mohla porovnat, jak se mění exprese genů našeho zájmu v rámci chronologických izolátů a jaký vliv na expresi mají jednotlivá antibiotika a jejich doba působení, vynesla jsem zjištěnou relativní expresi do grafů pro každý gen zvlášť (viz grafy č. 5, 6, 7 a 8).



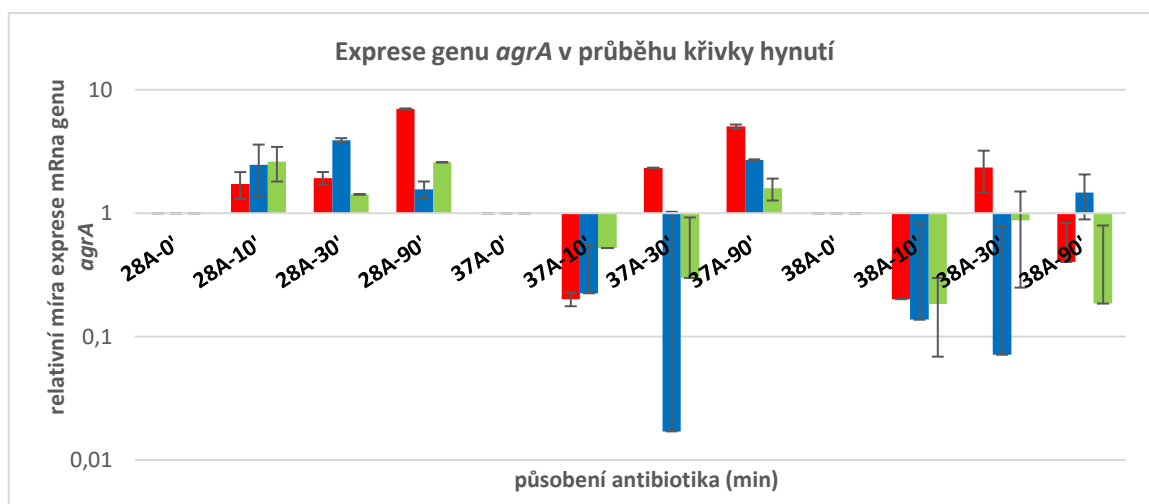
Graf č. 5: Relativní míra exprese genu *hyp* u chronologických izolátů od prvního pacienta v časech 10, 30 a 90 minut po působení ciprofloxacinu (červeně), oxacilinu (modře) a vankomycinu (zeleně). Hladina mRNA je normalizována vzhledem ke kontrolnímu vzorku v čase T0 (kultura bez antibiotika). Chybové úsečky označují standardní odchylky z biologických replikátů ve dvou nezávislých měřeních oba provedené ve dvou technických replikátech.

Z grafu ukazující expresi genu pro protein s hypotetickou funkcí je patrné, že u primoizolátu (28A) je gen *hyp* méně exprimován oproti následným izolátům 37A a 38A. U izolátu 37A je zaznamenán nárůst exprese pouze u antibiotika ciprofloxacinu a po 1,5 hodině působení vankomycinu. U izolátu 38A je zvýšená exprese *hyp* nejvíce patrná po působení ciprofloxacinu a oxacilinu, u kterého zde záleží i na době působení, protože dosahuje desetinásobně vyšších hodnot ve 30ti a 90ti minutách oproti 10ti minutovému působení.



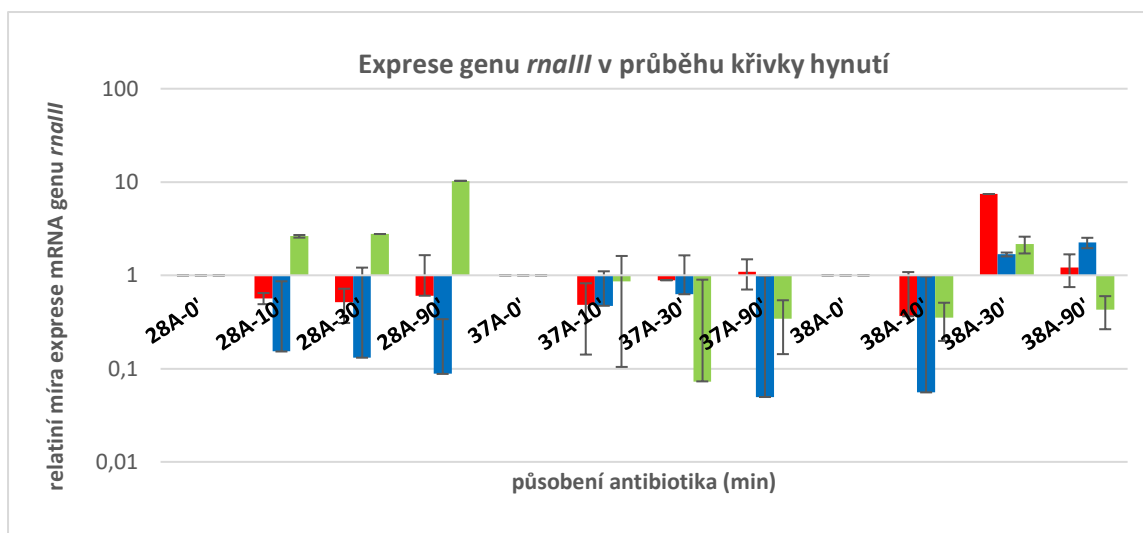
Graf č. 6: Relativní míra exprese genu *glmU* u chronologických izolátů od prvního pacienta v časech 10, 30 a 90 minut po působení ciprofloxacinu (červeně), oxacilinu (modře) a vankomycinu (zeleně). Hladina mRNA je normalizována vzhledem ke kontrolnímu vzorku v čase T0 (kultura bez antibiotika). Chybové úsečky označují standardní odchylky z biologických replikátů ve dvou nezávislých měřeních, obě provedené ve dvou technických replikátech.

V grafu ukazujícím relativní míru exprese genu *glmU* lze vidět rapidní nárůst exprese u nejpozdnějšího izolátu z trojice (38A). U prvních dvou izolátů (28A a 37A) se zdá, že je exprese o něco snižena oproti stavu bez antibiotika, vzhledem k velkým směrodatným dochytkám (SD), to však nelze tvrdit s určitostí. Nicméně u izolátu 38A dochází k více jak sto násobnému nárůstu exprese *glmU* u všech antibiotik, a to bezprostředně po aplikaci antibiotika.



Graf č. 7 : Relativní míra exprese genu *agrA* u chronologických izolátů od prvního pacienta v časech 10, 30 a 90 minut po působení ciprofloxacinu (červeně), oxacilinu (modře) a vankomycinu (zeleně). Hladina mRNA je normalizována vzhledem ke kontrolnímu vzorku v čase T0 (kultura bez antibiotika). Chybové úsečky označují standardní odchylky z biologických replikátů ve dvou nezávislých měřeních, obě provedené ve dvou technických replikátech.

V grafu pro relativní míru exprese genu *agrA* lze vidět velké rozdíly hlavně u oxacilinu. U primoizolátu (28A) je u všech antibiotik exprese o něco málo zvýšená oproti kontrolnímu stavu. U následného izolátu (37A) je v čase 10 a 30 minut exprese snížena zejména u oxacilinu. Po delším působení antibiotika (90 minut) však exprese u všech antibiotik vzrůstá s tím, že největší nárůst je patrný u oxacilinu. Podobný výsledek lze sledovat i u posledního izolátu (38A), kdy je do půl hodiny působení oxacilinu exprese *agrA* desetinásobně snížena, po 90ti minutách je však ještě o něco málo vyšší oproti kontrolnímu stavu bez antibiotika. U zbylých dvou antibiotik vzhledem k malým změnám v expresi společně s velkými SD nelze jednoznačně říci jestli je exprese snížena nebo zvýšená.



Graf č. 8: Relativní míra exprese genu *rnalIII* u chronologických izolátů od prvního pacienta v časech 10, 30 a 90 minut po působení ciprofloxacinu (červeně), oxacilinu (modře) a vankomycinu (zeleně). Hladina mRNA je normalizována vzhledem ke kontrolnímu vzorku v čase T0 (kultura bez antibiotika). Chybové úsečky označují standardní odchylky z biologických replikátů ve dvou nezávislých měřeních, obě provedené ve dvou technických replikátech.

V grafu zobrazujícím relativní míru exprese genu *rnalIII* nejsou vidět dramatické změny. U primoizolátu (28A) lze vidět rozdíl mezi antibiotiky, kdy po působení ciprofloxacinu je exprese nepatrně snížena, po působení oxacilinu snížena desetinásobně, ale po působení vankomycinu exprese oproti kontrolnímu vzorku vzrůstá a navíc lze vidět závislost toho růstu i na čase. U izolátu 37A se zdá, že exprese zůstává víceméně nezměněná. Přestože ve 30ti minutách lze vidět sníženou expresi po vankomycinu a v 90ti minutách nižší expresi po oxacilinu, nedá se kvůli vysokým SD vyvodit jasný trend. U izolátu 38A se zdá, že po krátkém působení všech antibiotik (10 minut) se nejprve exprese *rnalIII* sníží, po delším působení o něco vzrůstá.

Z výsledků měřené genové exprese se dá vyvozovat, že typ antibiotika, ani jejich doba působení nemá na změnu v genové expresi sledovaných genů zdaleka takový vliv jako stáří izolátu a jeho adaptační mutace. Nejvíce patrné je to u genu pro protein s hypotetickou funkcí a u genu *glmU*, kdy nejvíc adaptovaný izolát (38A), který navíc získal adaptační mutaci v *Agr* modulu, vykazoval mnohonásobně vyšší expresi oproti časnějším izolátům (28A a 37A).

5.4. Stanovení růstové křivky před a po působení antibiotik v mikrotitrační destičce

Cíl: Pokusit se převést metodu stanovení křivky hynutí do mikrotitrační destičky, která by umožnila rychlejší a mnohačetnější stanovení. Dále sledovat vyrůstání z perzistentního stavu.

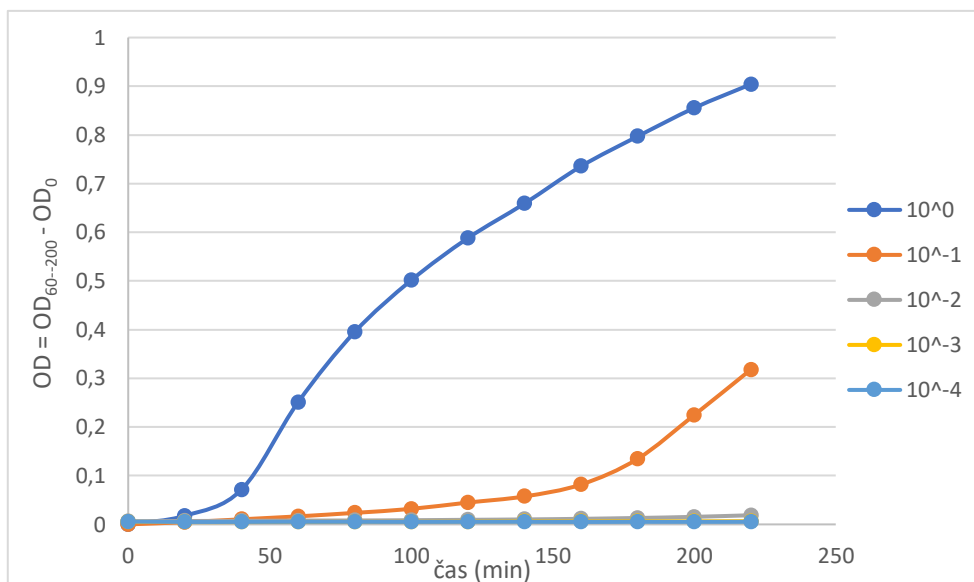
Protože je měření křivek hynutí značně časově náročné, aplikovala jsem metodu přímé kvantifikace tolerance a perzistence podle Balaban (2017).

Tato studie přinesla matematickou definici tolerance skrze hodnotu, která zahrnuje závislost míry přežití bakteriální populace na koncentraci a času působení antibiotika, podobně jako MIC. Tuto hodnotu je označena jako MDK₉₉ a představuje minimální dobu pro usmrcení 99% populace. Tato metoda byla testována na *E. coli*, a společně s MIC by mohla představovat klasický standard pro měření odolnosti bakterií proti antibiotickému působení v klinické praxi. Automatizace metody spočívá v možnosti použití 96 jamkové destičky, kdy každá jamka může představovat různou koncentraci antibiotika, nebo jako v našem případě, různou koncentraci biomasy. Pro ukončení expozice antibiotikům se jednoduše odstředí a doplní čerstvým BHI a je tak možno sledovat opětovné vyrůstání z perzistence (Balaban, 2017).

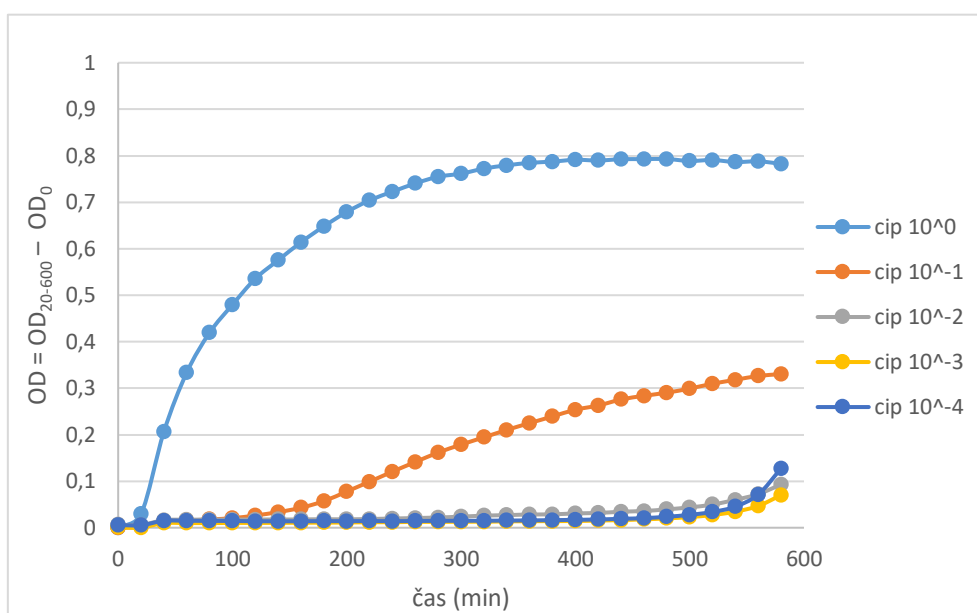
My jsme použili trochu odlišný postup, kdy jsme nejprve sledovaly růst naředěné bakteriální populace před vystavením antibiotik a v druhé, odlišné, destičce následně růst po čtyř hodinovém působení antibiotik (viz kapitola 4.14.).

Pro měření průběhu růstu kultury před přidáním antibiotik jsme kulturu naředily v desítkovém ředění až do 10^{-4} a měřily hodnoty OD v 20ti minutových intervalech po dobu 4 hodin (viz kapitola 4.14.). Už v této části experimentu se ukázalo, že vyrůstá dokáže kultura dobře jen v nízkém ředění (10^0 a 10^{-1}). Neuvádím růstové křivky všech izolátů, protože měly vždy podobný průběh. Na grafech č. 9 a 11 jsou ukázkové růstové křivky pro izolát 28A a 38A. Křivky byly dále použity pro výpočet doby zdvojení (viz následná kapitola 5.6.1.).

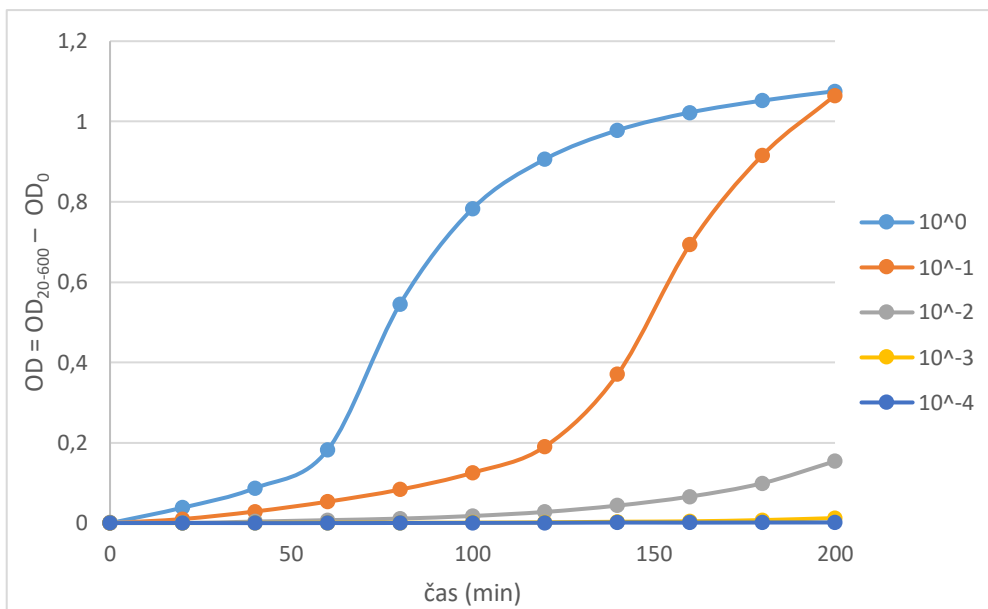
Při měření vyrůstání z perzistence (po působení antibiotik) jsme nejprve prováděli ředění 10^0 – 10^{-4} , stejně jako před aplikací antibiotika, ale již při desetinasobném ředění (10^{-1}) byl opětovný růst bakteriální kultury nižší až neidentifikovatelný (viz grafy č. 10, 12 pro izoláty 28A a 38A). Záleželo též na aplikovaném antibiotiku. Po ciprofloxacinu bylo vyrůstání po odstranění antibiotiky lepší (rychlejší a méně závislé na ředění). Po oxacilinu i vankomycinu při desetinasobném ředění kultury nebyl zaznamenán nárůst biomasy v měřeném časovém rozsahu. Z těchto důvodů jsme přistoupili k dílčímu ředění 10^0 , 1:1, $2^{(kultura)} \cdot 3^{(BHI)}$, 10^{-1} . Výsledek u izolátů 44A a 38C ukazují grafy č. 13 a 14. Z těchto výsledků je patrné, že vyrůstání je závislé na výchozí koncentraci inokula a rychlost vyrůstání klesá neúměrně k ředění. Měření jsme prováděli v technickém triplikátu, který vycházel z jedné kultivace. Protože šlo o testování prozatím nevyzkoušené metody, uvádím výsledky jen pro určité kmeny a antibiotika.



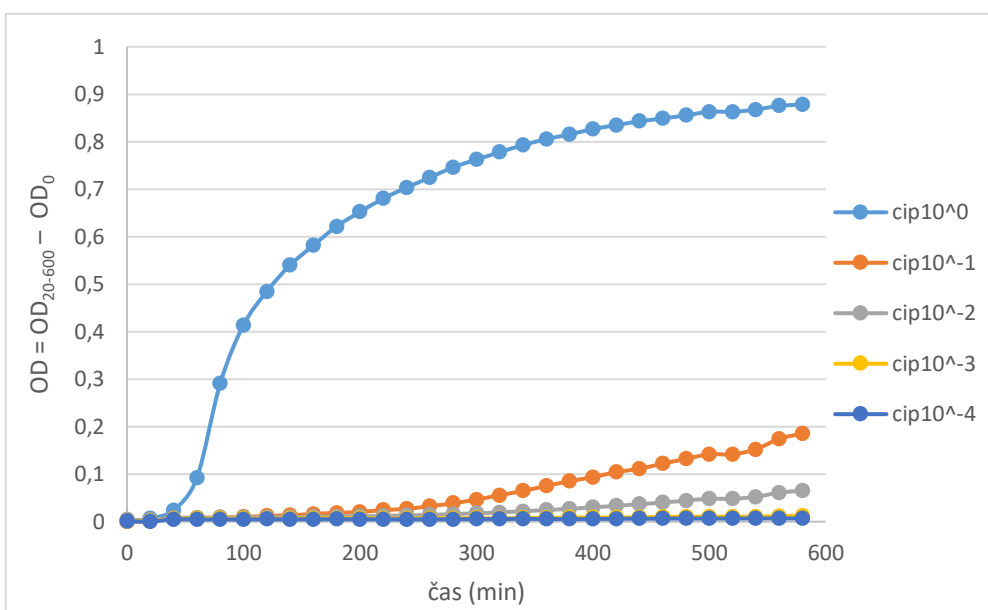
Graf č. 9: Naměřená růstová křivka pro izolát 28A před působením antibiotika v desítkovém ředění



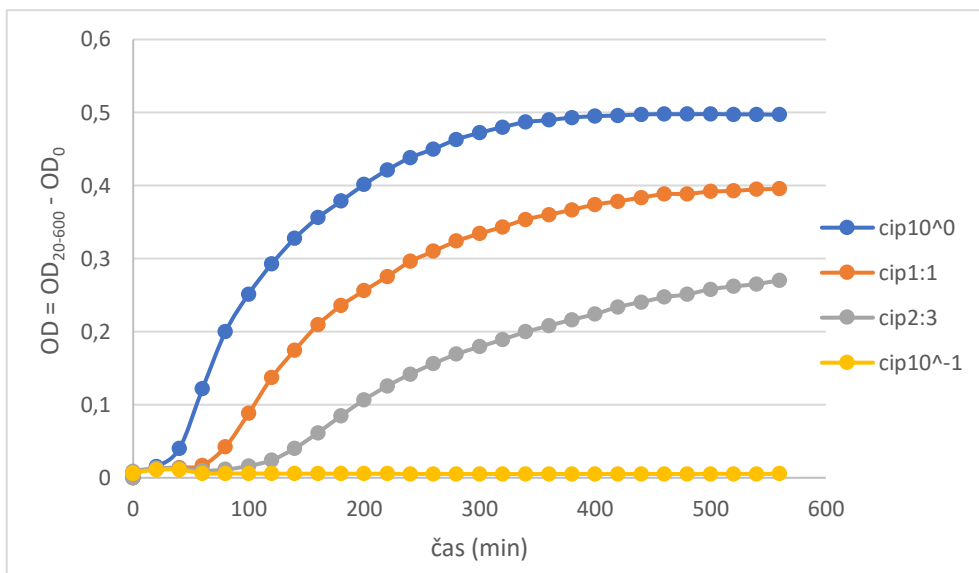
Graf č. 10: Naměřená růstová křivka po 4 hodinovém působení ciprofloxacinu pro izolát 28A v desítkovém ředění



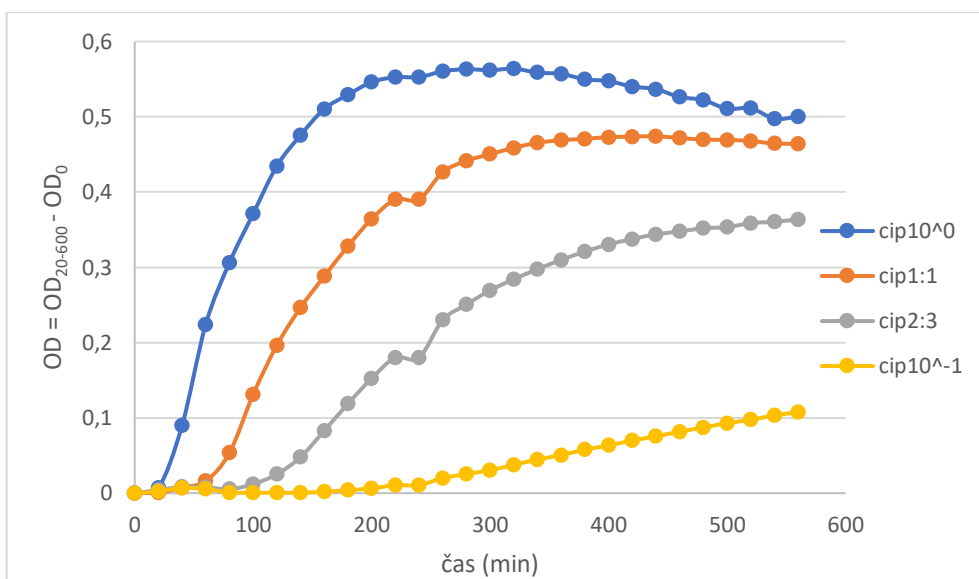
Graf č. 11: Naměřená růstová křivka pro izolát **38A** před působením antibiotika v desítkovém ředění



Graf č. 12: Naměřená růstová křivka po 4 hodinovém působení **ciprofloxacinu** pro izolát **38A** v desítkovém ředění



Graf č. 13: Naměřená růstová křivka po 4 hodinovém působení **ciprofloxacinu u kmene 44A** v dílčím ředění



Graf č. 14: Naměřená růstová křivka po 4 hodinovém působení **ciprofloxacinu u kmene 38C** v dílčím ředění

5.4.1. Stanovení doby zdvojení u klinických izolátů

Cíl: Posoudit, zda u mutovaných izolátů dochází ke změně v růstové rychlosti před a po působení antibiotika a je tato rychlost ovlivněna adaptací izolátu

Z hodnot OD naměřených pomocí mnohačetného stanovení OD v mikrotitrační destičce (viz předchozí kapitola) jsem vypočetla dobu zdvojení pro každý izolát, a to před působením antibiotika a poté také po jejich působení. Použila jsem naměřené hodnoty OD pro neředěný vzorek (10^0).

Cílem bylo posoudit, zda dochází ke změně v růstové rychlosti u pozdějších izolátů, jestli se růstová rychlost mění v závislosti na získané mutaci, a jak dokáží ty samé izoláty obnovit svůj růst po tom, co jsou vystaveny čtyři hodiny antibiotikům ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu, a také jak je tato schopnost rozdílná pro jednotlivá antibiotika. Všechny výsledné doby zdvojení jsem vynesla do tabulek č. 3 a 4.

Z výsledku je patrné, že mutant v Agr operonu u *S. aureus* (delece *agrB/hld*), měl v našem případě patrně kratší dobu zdvojení (38A) před působením antibiotického stresu. Pro kontrolu dobře slouží i izolát 38C, který byl z pacienta získán ve stejném odběru, ale díky absenci mutace v Agr modulu je jeho doba zdvojení blízká primoizolátu, který slouží jako srovnávací (neadaptovaný) kmen.

Pacient	Kmen	Doba zdvojení ($T_{1/2}$)(minuty)
1. pacient	28A	28
	37A	24
	38A	22
	38C	31
2. pacient	42A	31
	43A	33
	44A	32

Tabulka č. 4: Doba zdvojení studovaných klinických izolátů měřené pomocí VarioSkanu Doba zdvojení byla vypočtena ze směrnice přímky (k) ze semilogaritmického vynesení hodnot pro OD ($\text{Log}_2(\text{OD} \cdot 1000)$) proti času (t), podle vzorce: $T_{1/2} = 1 / k$

Pacient	Izolát	$T_{1/2}$ cip (minuty)	$T_{1/2}$ oxa (minuty)	$T_{1/2}$ van (minuty)
1.	28A	110	61	70
	37A	43	39	35
	38A	64	48	46
	38C	67	37	35
2.	42A	84	77	63
	43A	84	83	63
	44A	59	33	32

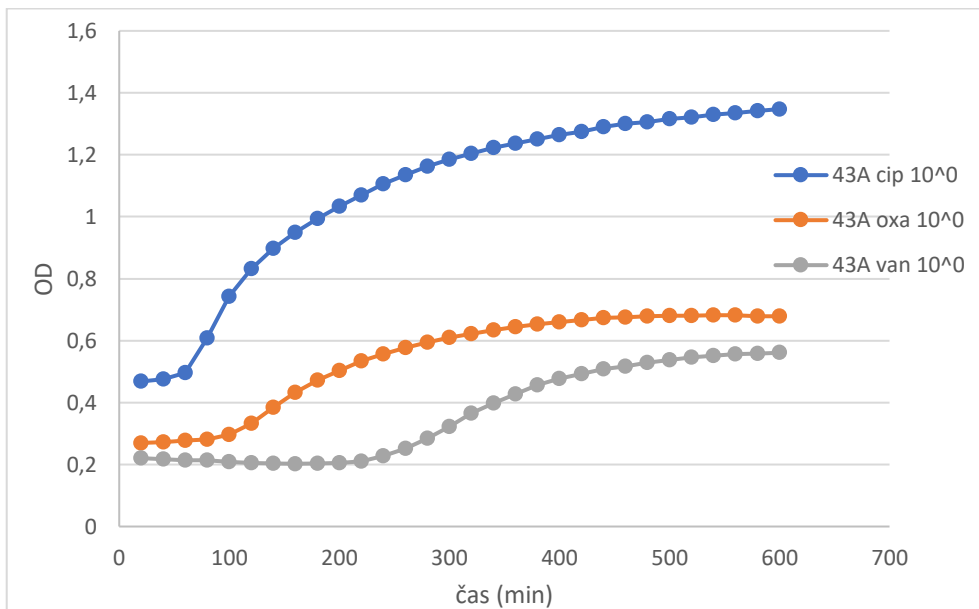
Tabulka č. 5: Doba zdvojení pro jednotlivé izoláty po čtyř hodinovém působení ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu. Doba zdvojení byla vypočtena ze směrnice přímky (k) ze semilogaritmického vynesení hodnot pro OD ($\text{Log}_2(\text{OD} \cdot 1000)$) proti času (t), podle vzorce: $T_{1/2} = 1 / k$

Abych mohla posoudit délku lagu, a pro větší přehlednost, jsem u grafů č. 9-14 odečetla rozdílnou počáteční naměřenou hodnotu OD od všech naměřených OD příslušné křivky, a tak

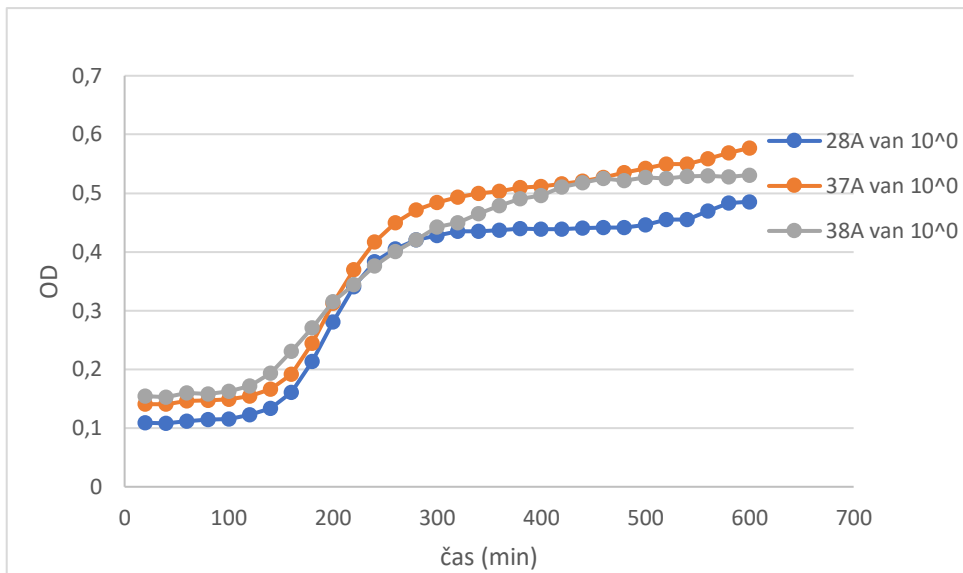
jsem získala u všech měření počátek roven nule ($OD_{20-600} - OD_0$). Opětovný růst byl nejrychlejší po působení ciprofloxacinu a nejvíce zpožděný po vankomycinu. Tento trend je dobře viditelný i na grafech bez matematické úpravy počáteční hodnoty OD. Příkladné grafy uvádím pro izolát 43A (viz graf č. 15).

Po vypočtení doby zdvojení rostly nejpomaleji ty izoláty, na které působil čtyři hodiny ciprofloxacin. Růst po oxacilinu a vankomycinu byl s výjimkou izolátu 43A srovnatelný, s tím, že u vankomycinu byla doba zdvojení ještě o něco nižší oproti oxacilinu. Po zaměření se na korelaci doby zdvojení se stářím izolátu a získanou mutací jsem došla k závěru, že rychleji rostly adaptované izoláty, a to již ty odebrané po půl roce (37A a 43A). Toto platilo po působení všech antibiotik. Také jsem došla k závěru, že adaptované izoláty měly podobný průběh růstové křivky (viz graf č. 16).

Po jisté optimalizaci by metoda mohla sloužit jako ukazatel nejen míry schopnosti perzistovat, ale i schopnost vyrůstání z perzistence. Pro přesnější určování růstových parametrů je třeba optimalizovat metodu na stejný počáteční počet buněk. Z toho důvodu jsem u grafů č. 15 a 16 neprovedla matematickou úpravu udělující všem řaděním počátek $OD = OD_{20-600} - OD_0$), viz rozdílná počáteční OD u grafu č. 15 a 16. Nicméně se nám alespoň podařilo sledovat, jak má na výsledné vyrůstání vliv ředění a použité antibiotikum. Vypočítali jsme též doby zdvojení, které jasněji ukázaly, jak dané izoláty rostou před a po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu.



Graf č. 15: Růstové křivky po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu u izolátu 43A, na kterém lze pozorovat prodloužení lag fáze v závislosti na použitém antibiotiku



Graf č. 16: Růstové křivky po působení vankomycinu u izolátů 28A, 37A a 38A

6. Diskuze

Staphylococcus aureus je grampozitivní, podmíněně patogenní bakterie, která u většiny lidí nepůsobí žádné problémy, a je pouze komenzálem kůže a dýchacího traktu. Jako většina komenzálu však může být v jistých případech původcem velmi vážných onemocnění vedoucích i ke smrti (endokarditida, osteomyelitida). U *S. aureus* je patogenicitu částečně způsobena schopností perzistovat v prostředí hostitele, kde navozuje fyziologicky tlumený stav, který buňce umožní vyhnout se toxicitě antibiotik a imunitnímu systému, což vede ke vzniku chronických infekcí. Přepínání mezi utlumeným a aktivním stavem, kdy je stafylokok schopný produkce mnoha virulenních faktorů je podle současných znalostí řízený Agr systémem. Perzistence u bakterií je v poslední době hojně studovaný fenomén, protože přetrvávající perzistentní infekce jsou v klinické praxi obecně závažným problémem, nejen u stafylokoků.

Perzistence je komplexní jev, který se obtížně studuje a naše poznání je stále nedostačující k tomu, abychom mohli dojít k obecnému konsensu. Výzvy ve studiu jsou obecně jejich malé množství v populaci, heterogenní mechanismy, jakým se perzistentního stavu docílí, a také skutečnost, že buňka je schopná z toho stavu rychle přepnout zpět do stavu aktivního. Celé studium navíc komplikuje fakt, že u *S. aureus* neexistuje srovnávací kmen, který by byl opravdu prokazatelně perzistentní oproti neperzistentním buňkám. Z těchto důvodů je téměř nezbytné přistupovat ke studiu perzistorů komplexně a získávat informace několika experimentálními přístupy.

Jedním z nich je studium vzniku adaptačních mutací. V laboratořích se pomocí antibiotik vytváří podmínky simulující tvorbu perzistence (tzv. studie ALE = adaptive laboratory evolution), které nám umožňují sledovat k jakým adaptačním změnám u perzistorů dochází a v jakém časovém sledu. První a nejvýznamnější takové studie se ukázaly jako velmi slibné (Fridman, 2014; Van den Berg, 2016). Další možností je studium chronologických izolátů z chronických infekcí, kde adaptační mutace zvyšující schopnost perzistovat již vznikly.

Tyto studie by mohly vést až k predikování vzniku perzistentních, a také rezistentních populací, protože se ukazuje, že právě vznik perzistentních a tolerantních buněk je jakýsi předstupeň vzniku buněk rezistentních (shrnutí v review Cohen et al. 2013), viz kapitola 2.2.

Prvním cílem mé diplomové práce bylo použít již vypracovanou metodu pro stanovení perzistentní populace, a to stanovení křivek hynutí vycházející z předchozích prací v naší laboratoři, která je všeobecně považovanou kvantitativní metodu stanovení míry perzistence. Metodu jsem prováděla na získaných primoizolátech, které představovaly dosud neadaptované izoláty a dalších dvou (třech) následných izolátů od dvou různých pacientů. Tímto jsem mohla zjistit, jak se schopnost perzistovat mění v čase a posoudit, zda i krátký časový úsek stačí k získání vyšší schopnosti perzistovat. Také jsem mohla posoudit, jak se tato schopnost liší na základě

použitého antibiotika. Všechny izoláty byly osekvenovány v MBÚ AV ČR, což mi dále umožnilo dát do souvislosti míru perzistence se získanými adaptačními mutacemi. Pro zjištění, jaké koncentraci antibiotika mám studované izoláty vystavit jsem pro každý izolát stanovila hodnotu MIC pro používaná antibiotika ciprofloxacin, oxacilin a vankomycin.

V druhé části mé diplomové práce jsem se věnovala otázce fyziologického stavu perzistence, konkrétně snížení membránového potenciálu na základě antibiotického působení. Protože bylo popsáno, že perzistentní buňky mají snížený membránový potenciál, chtěli jsme otestovat, jak se mění membránový potenciál u studovaných izolátů v průběhu křivek hynutí.

Pomocí průtokové cytometrie jsem chtěla dokázat, jak vybraná antibiotika působí na membránový potenciál buněk a jak s tím opět souvisí stáří nebo získané mutace izolátů a míra perzistence zjištěná stanovením CFU. Díky duálnímu fluorescenčnímu barvení jsem v průběhu křivek hynutí rozlišila buňky s membránovým potenciálem, bez potenciálu a mrtvé, permeabilizované buňky v průběhu křivek hynutí. Jako kontrolní vzorky mi zde sloužily neobarvené buňky, buňky nemající membránový potenciál po působení protonoforu CCCP a buňky mrtvé vzniklé působením vysoké teploty (80 °C, 15 minut).

V třetí části jsem se zaměřila na molekulární podstatu perzistence, konkrétně sledování genové exprese metodou kvantitativní RT PCR u vybraných genů, v kterých byly studované izoláty mutované (*hyp* gen pro protein s hypotetickou funkcí, *glmU*, *agrA*) nebo mají prokázanou souvislost s perzistencí (*rnaIII*). Genová exprese byla měřená v časových intervalech křivky hynutí do 90 minuty působení antibiotik.

V poslední části mé diplomové práce jsem se pokusila použít automatické a mnohačetné stanovení přírůstku biomasy kontinuálním měřením OD k monitorování průběhu vyrůstání jednotlivých izolátů z perzistence v mikrotitrační destičce. Tato metoda by se mohla využít při testování buněk na schopnost perzistence i v klinické praxi. Tuto metodu jsem otestovala na všech sedmi studovaných izolátech pro všechna používaná antibiotika.

Moje práce začala výběrem izolátů, které byly podrobeny zkoumání. V získaných datech ze sekvenční analýzy MBÚ AV ČR s.r.o., kde byly nalezeny všechny mutace v porovnání s nejbližším klonálním předkem, jsme se zaměřila na mutace, které u *Staphylococcus aureus* byly již v literatuře popsány jako související s perzistencí. Šlo zejména o mutace v Agr lokus. U prvního pacienta se v posledním chronologickém izolátu objevila mutace v jednom z genů Agr, a to delece promotorové části mezi geny *agrB* a *hld* u druhého pacienta (viz obrázek č. 5). Těž v posledním chronologickém izolátu byla bodová mutace v genu pro *agrA*. 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 u klinických izolátů pocházejících z dýchacího traktu pacientů s CF již dříve (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). U prvního pacienta

se již u druhého chronologického izolátu (38A) objevila mutace v genu pro hypotetický protein, který je součástí operonu společně s genem *glmU*.

U první čtveřice izolátů se hodnoty MIC v průběhu času nezměnily. U trojice odebrané z druhého pacienta však došlo k zvýšení MIC pro vankomycin u v pořadí třetího chronologického izolátu. Naopak zde došlo ke snížení MIC pro oxacilin u nejvíce adaptovaného izolátu (viz tabulka č. 1). První případ nám potvrzuje, že u perzistentních buněk nedochází ke změně v MIC (viz úvod). U kmene 44A však došlo ke zvýšení MIC pro vankomycin z MIC = 1 na MIC = 2. Za zvýšení MIC mohou být zodpovědné některé mutace, které izolát získal. O tom, které jsou za to zodpovědné, však mohu pouze spekulovat. Dalším důvodem pro zvýšení hodnoty MIC může být přítomnost rezistentních buněk. Jak bylo pojednáno výše, perzistori jsou jakýsi předstupeň vzniku rezistentních buněk (Colon et al., 2013). Podle literatury se mohou tyto buňky skrývat v průběhu křivek hynutí a mohou se v ní odhalit až v delším čase po působení antibiotika. Tuto hypotézu by mohl podpořit i sledovaný nárůst perzistorů v posledním čase měření křivky hynutí u kmene 44A (viz graf č. 3b). Přítomnost rezistentních buněk může celkově zvyšovat míru perzistence v kvantitativních testech (Balaban et al., 2019).

Křivky hynutí studovaných klinických izolátů vykazovaly vždy bifázický průběh, který je pro perzistentní populaci typický (viz grafy č. 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b). U prvního pacienta jsem sledovala nárůst schopnosti perzistovat v závislosti na získaných mutacích. Konkrétně šlo o deleci v promotorové oblasti mezi geny *agrB* a *hld* u nejvíce adaptovaného izolátu (38A). Tato mutace měla jistě nějaký vliv na expresi probíhající z těchto mutovaných genů. Dále měl tento izolát mutaci v genu pro hypotetický protein (*hyp*), o kterém víme, že je ve stejném operonu jako gen *glmU*, který se účastní syntézy buněčné stěny. Rozdíl ve schopnosti perzistovat v závislosti na adaptaci šlo sledovat po působení všech antibiotik. Nejvýraznější zvýšení nastalo u ciprofloxacinu (o tři řády), u oxacilinu a vankomycinu byl nejvyšší nárůst o dva řády oproti primoizolátu.

Nejvíce adaptovaný izolát (38A) vykazoval vyšší míru perzistence i oproti izolátu odebranému ve stejný čas, který ale neobsahoval mutaci v operonu Agr (38C). Nárůst schopnosti perzistovat po působení všech antibiotik šlo však vidět již u izolátu odebraného o rok dříve (37A) a to dokonce o něco vyšší než u pozdějšího izolátu 38A. Tento izolát má mutaci pouze v genu pro hypotetický protein, který do souvislosti s perzistencí doposud dáván nebyl.

U druhého pacienta závislost schopnosti perzistovat na adaptační mutaci v Agr operonu patrná nebyla. Zde byla zjištěna pouze bodová záměna v genu *agrA* vedoucí k záměně aminokyseliny, u nejvíce adaptovaného izolátu (44A). Tato mutace zřejmě nemá na regulaci Agr takový vliv, a proto jsme nesledovali výrazné změny v míře perzistence po působení žádného antibiotika. Dokonce se zde objevil jev opačný oproti očekávání, kdy míra perzistence v čase klesala. Rozdíl v řádech nebyl však tak výrazný šlo 1 -1,5 řádu mezi primoizolátem a nejdéle odebraným izolátem, s tím, že mezi jednotlivými biologickými triplikáty byly velké odchylky (viz grafy č. 1b, 2b, 3b). Toto může odkazovat na nedostatky této metody, kdy sledujeme pouze

vyrůstání z perzistence a kultura je před výsevem zároveň ředěná. Proto dochází k tomu, že adaptované izoláty vyrůstají hůře. Tato metoda se již u mé předchůdkyně ukazovala jako nevhodná, protože při vysokém ředění kultury populace často vůbec nevyrůstaly. Zdůvodnění bylo takové, že její izoláty byly již velmi adaptované a měly časté mutace v Agr systému a takové izoláty mají pravděpodobně sníženou nebo žádnou schopnost produkovat molekuly podporující resuscitaci perzistorů (Pascoe et al. 2014). Já jsem se s takovými problémy setkala pouze u izolátů s mutací v Agr u izolátu 38A. Důvodem je nejspíše fakt, že moje izoláty tolik adaptované dosud nebyly, a tudíž se nezhoršovala produkce molekul, které by mohly podporovat resuscitaci perzistorů, a které jsou nejspíše produkovány Agr operonem. Dalším důvodem, proč u druhého pacienta nebyla výrazná změna v míře perzistence v takto provedeném srovnávacím experimentu může být skutečnost, že poměrně vysokou schopnost perzistovat vykazuje již primoizolát (42A, viz grafy č. 1b, 2b, 3b).

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). Podobné srovnání provedla minulý rok i má předchůdkyně s chronickými izoláty *S. aureus*, kde sledovala, k jakým změnám v úrovni perzistence dochází v rámci dvou klonálních izolátů od pacientů s CF. Přišla též na to, že míra schopnosti perzistovat je nejvíce zvýšená u *agr* mutanta. Z našich výsledků dále vyplývá, že za schopnost perzistovat mohou být zodpovědny i jiné mutace než v Agr operonu.

V druhé části práce jsem se pokusila ukázat, jak působení studovaných antibiotik ovlivňuje membránový potenciál (MP) v průběhu křivky hynutí. Snížení membránového potenciálu bylo zjištěno u perzistentních buněk *E. coli*, kde je za to nejspíše zodpovědná indukce pórotvorného toxinu HokB (Verstraeten et al. 2015). U *S. aureus* bylo popsáno, že za snížení membránového potenciálu je zodpovědná změna exprese enzymů TCA cyklu. Experimentátoři vycházeli ze zjištění, že mutanti v TCA cyklu vykazují výrazně vyšší podíl perzistorů (Ma, Chao et al. 2010). Skupina paní Wang měřením membránového potenciálu pomocí DiOC(2)3 zároveň dokázala, že mutanty v TCA cyklu vykazují nižší membránový potenciál po působení ciprofloxacinu (Wang et al. 2018).. Podle literatury tedy nižší MP charakterizuje perzistentní buňky, a proto jsme se rozhodli MP u studovaných izolátů změřit.

Membránový potenciál jsme měřili po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu a výsledky jsou zaznamenány v grafech č. 3a, 3b, 3c a 4a, 4b, 4c pro každého pacienta a každé antibiotikum zvlášť. Pro větší přehlednost neuvádím čas T0, kde bylo téměř 100 % buněk s potenciálem. Zjistili jsme, že po působení ciprofloxacinu dochází ke ztrátě membránového potenciálu v populaci buněk nejméně (viz grafy č. 3a a 4a). Důvodem je pravděpodobně fakt, že ciprofloxacin působí na gyrázu, a ne na buněčnou stěnu jako zbylé dvě antibiotika.

U prvního pacienta docházelo v průběhu křivky hynutí k procentuálnímu nárůstu populace bez potenciálu, kdy nejvyšší nárůst byl po 4 hodinách působení. Lze zde pozorovat

trend, kdy u adaptovanějších izolátů docházelo ke ztrátě MP v populaci pomaleji a po 4 hodinách stále převládala populace s potenciálem. U adaptovaných izolátů se poměr populací s potenciálem a bez potenciálu vyrovnal. Primoizolát oproti tomu měl jasně víc buněk bez MP ve čtvrté hodině působení ciprofloxacinu (viz graf č. 3a).

U druhého pacienta rozdíl mezi izoláty výrazný nebyl. A ve čtvrté hodině působení ciprofloxacinu byly populace s potenciálem a bez potenciálu ve stejném poměru u primoizolátu i u následných chronologických izolátů (viz graf č. 4a). Toto měření částečně koreluje s průběhem křivek hynutí, kde byly větší změny v měřeném CFU mezi dvěma pacienty spíše než mezi antibiotiky.

U antibiotik inhibujících buněčnou stěnu došlo k poměrně rychlé ztrátě MP v celé populaci buněk již v první hodině jejich působení. Ve čtvrté hodině již byla většina buněk bez potenciálu (u oxacilinu šlo 80 % a u vankomycinu o 90 %), a to u obou pacientů (viz grafy č. 3b, 3c a 4b, 4c). Obecně lze ještě konstatovat, že po působení oxacilinu nedochází ke ztrátě MP tak rychle jako po působení vankomycinu.

Z výše uvedených odstavců vyplývá, že každé antibiotikum působí na fyziologický stav přeživších bakterií různým způsobem. Je také pravda, že každé z těchto antibiotik má rozdílné působení. Ciprofloxacin je fluorochinolové antibiotikum inhibující gyrázu, Oxacilin je beta-laktamové antibiotikum, které u rostoucích buněk inhibuje transpeptidaci a karboxypeptidaci při syntéze peptidoglykanu vazbou na proteiny vázající penicilin (PBP). Posledním používaným byl glykopeptidový vankomycin, který inhibuje syntézu BS vazbou na stěnové prekurzory, které tak nemohou tvořit zesílení pomocí transpeptidáz a dochází tak k zastavení růstu.

Podle těchto poznatků je zřejmé, že oxacilin a vankomycin razantněji indukují snížení membránového potenciálu. Na snížení membránového potenciálu u *S. aureus* má tedy vliv zvolené antibiotikum spíše než genetické změny izolátů. Také jsme došli k závěru, že měření fyziologického stavu pomocí FC není zcela vypovídající, protože ztráta membránového potenciálu se nedá korelovat s mírou perzistence, kterou jsme získali stanovením CFU. Příkladem je primoizolát 28A, kdy míra perzistorů po působení perzistorů byla nejnižší při stanovení CFU, ale podle údajů z FC převažovala subpopulace bez potenciálu a byla vyšší než u kmene 38A, který naopak při CFU vykazoval vyšší míru perzistence, ale více buněk s potenciálem (viz grafy č. 1a, 2a, 3a). Toto zjištění není v souladu s literaturou, kdy perzistori vykazují výrazně nižší membránový potenciál. Vhodnější využití průtokové cytometrie pro stanovení perzistorů by mohla být kombinace měření genové exprese genů, které jsou jasně spojeny s perzistencí, a měřením fyziologického stavu typického pro perzistory jako je právě nízký membránový potenciál (Henry & Brynildsen, 2016).

V další části jsme provedli měření míry genové exprese u tří izolátů od prvního pacienta, u kterých víme, že ovlivňují míru perzistence. Exprese genu pro protein s hypotetickou funkcí (*hyp*) a genu *glmU* u izolátů 28A a 37A se po působení antibiotik nezměnila oproti kontrole

(kultura bez antibiotika), přestože u 37A již mutace pro *hyp* byla. U izolátu 38A došlo u obou genů k výraznému nárůstu exprese po působení všech antibiotik (viz graf č. 5 a 6). Tento výsledek můžeme interpretovat tak, že protein kódovaný genem *hyp* může reagovat na antibiotikem zvýšenou produkcí prekurzorů pro buněčnou stěnu a tím zvyšovat odolnost vůči antibiotiku.

U genu *agrA* jsme zaznamenali mírně zvýšenou expresi po působení antibiotik u izolátu 28A. O *AgrA* je známo, že podporuje tvorbu biofilmu a vznik chronické infekce (viz kapitola 2.4.2.). U izolátu 37A došlo naopak ke snížení exprese *agrA* v desáté a třicáté minutě působení, v devadesáté minutě naopak k jeho nárůstu. U 38A ke zvýšení exprese nedochází, což díky deleci v promotorové části *Agr* operonu se dá předpokládat (viz graf č. 7). Vzhledem k této deleci dohromady s kolísavým průběhem exprese u izolátu 37A se bohužel nedá dojít k nějakému jasnému závěru. Dalo by se spekulovat, že *AgrA* nějak ovlivňuje exprese genu pro hypotetický protein a genu *glmU*.

Z výsledků pro gen *rnaIII* můžeme dedukovat, že se během perzistence neindukuje, protože nedocházelo k jeho vyšší expresi oproti kontrole ani u primoizolátu (viz graf č. 8). Toto zjištění je v souladu s literaturou, kdy bylo několikrát prokázáno, že *rnaIII* je silně exprimováno v akutní infekci, a naopak během chronické, kde se vyskytují perzistori je jeho produkce potlačena (Vaudaux a kol., 2002). Tento gen by proto mohl být vhodný pro rozlišení perzistujících buněk společně s dalšími metodami. Například by to mohl být jeden z genů fúzovaný s fluorescenčním proteinem pro použití v průtokové cytometrii s dalšími metabolickými indikátory.

Metoda stanovení genové exprese je tedy vhodná ke zkoumání molekulárních mechanismů perzistence, o její míře však mnoho nevyovídá. Vzhledem k heterogenitě perzistorů se nedá příliš očekávat, že míra exprese jednoho nebo i více genů bude v budoucnu dostatečně průkazná pro použití v klinické praxi při detekování perzistorů.

Pro sledování dynamiky vyrůstání z perzistence jsme použili kontinuální měření OD pomocí spektrofotometru VarioSkan. Zde jsme charakterizovali růstovou rychlost bez působení antibiotika a následně také po čtyřech hodinách působení antibiotika. Podle růstové křivky bez působení antibiotika sem určila dobu zdvojení, kde jsem zjistila, že mutanty v *Agr* operonu mají vyšší růstovou rychlost (viz tabulka č. 4). Doba zdvojení pod určitý čas by tak také mohla indukovat zvýšenou schopnost perzistovat. Pro takové tvrzení by bylo třeba udělat statistiku pro mnohem větší počet izolátů. Navíc tato spojitost kratší doby zdvojení s mutací v *Agr* operonu dosud publikována nebyla.

Při vyrůstání po působení antibiotik jsme narazily na technické problémy. Byl zde významný vliv ředění, kdy více jak 10x ředěné izoláty nevyrostaly ani po deseti hodinách sledování. Po dílčím ředění, které jsme aplikovali na izoláty 38C a 44A (viz grafy č. 13 a 14) biomasa již narůstala. Zde se dá spekulovat o úloze molekul mezibuněčné komunikace (quorum sensing), které by podporovaly resuscitaci perzistorů, protože těch při ředění kultury v médiu

ubývá. Toto zjištění se nachází již v publikaci, kde se za resuscitaci perzistorů zdají být odpovědné faktory PSM, jejichž exprese je pod přímým vlivem Agr systému (Bojer et al. 2018). Horší resuscitace u izolátů s mutací v Agr tuto domněnku potvrzuje. Také to může lépe vysvětlit horší vyrůstání na agarových plotnách při vyšším ředění kultury během stanovení CFU, viz výše. Dále je třeba zmínit, že ani měření v intervalu 10 hodin nebylo dostatečné pro zaznamenání nárůstu biomasy v nižším ředění. V experimentu, který měřil vyrůstání *Listeria monocytogenes* v mikrotitrační destičce po vystavení rozličným stresům, byl opětovný nárůst biomasy zaznamenán až po 20 hodinách a více (Guillier, Pardon & Augustin, 2005). V dalších podobných experimentech by bylo třeba tedy otestovat delší dobu kultivace s kontinuálním měřením OD.

Po vypočtení doby zdvojení po působení antibiotik, což mělo představovat vyrůstání z perzistence, jsem sledovala její výrazné prodloužení oproti stavu před působením antibiotik (viz tabulka č. 5). Toto zjištění, ale není v souladu s literaturou, kde bylo pomocí průtokové cytometrie měřeno vyrůstání z perzistence na kmeni *E. coli* a zjistilo se, že při vyrůstání po působení ampicilinu nedochází ke změně v době zdvojení oproti normálnímu stavu, kdy populace žádnému antibiotiku vystavena nebyla (Mohiuddin et al. 2020). Já jsem však měla jiný druh bakterií, a navíc adaptované izoláty, kde mohla být situace odlišná. Také jsem k zjištění růstové rychlosti využila metodu měření OD v rámci celé populace, která je jistě méně přesná, než měření na úrovni jedné buňky pomocí průtokové cytometrie jak to provedl pan Mohiuddin a spol.

Dále jsem zjistila, že naše primoizoláty mají u obou pacientů delší dobu zdvojení při vyrůstání z perzistence oproti pozdějším izolátům. To by se dalo vysvětlit tak, že adaptovanější izoláty získávají vyšší odolnost proti působení antibiotik. V literatuře je mnohokrát uváděno, že izoláty z chronických infekcí jsou odolnější proti mnoha vlivům (viz kapitola 2.4.1.).

Při vyrůstání z perzistence jsme pozorovali též výrazné změny v délce lag fáze mezi jednotlivými antibiotiky a mezi chronologickými izoláty. Po působení ciprofloxacinu byla lag fáze biomasy nejméně výrazná (přibližně 60 minut), po oxacilinu byla již delší (100 minut) a po působení vankomycinu se biomasa rozrůstala nejpomaleji (200 minut) (viz graf č. 15). Rozdíly mezi antibiotiky v rámci jednoho izolátu přisuzují postantibiotickému efektu, kdy se bakteriální suspenze rozrůstá pomaleji z důvodu obnovy poškození struktur nebo syntézy nových enzymů, a to má za následek delší lag fázi v růstové křivce (MacKenzie & Gould, 1993), viz graf č. 15. O fluorochinolonech, mezi které patří ciprofloxacin je známo, že na jejich působení má vliv bakteriální denzita a to takový, že jejich účinek s rostoucí denzitou klesá. Tímto by se dala vysvětlit nejkratší lag fáze biomasy po působení ciprofloxacinu v nulovém ředění. Bakterie nejspíše nebyly antibiotikem tolik zasaženy. Dále i naše zjištění, že u většiny buněk nedochází ke ztrátě membránového potenciálu. Naproti tomu vankomycin je antibiotikum s velmi razantním baktericidním účinkem (viz námi naměřená ztráta MP v celé populaci již poprvé hodině působení), a nejspíše právě proto je zde opětovně rozrůstání nejpomalejší.

Postupné prodlužování lag fáze u perzistujících buněk bylo pozorováno v několika nezávislých experimentech zmíněných v přehledu literatury v kapitole č. 2.2. Prodloužená lag fáze je brána jako zvýhodňující adaptace spojována s vyšší tolerancí k antibiotikům, která může vést až k rezistenci (Fridman et al. 2014; Levin-Reisman et al. 2017). V těchto studiích byly bakterie vystavovány antibiotikům v cyklech, mezi kterými byla antibiotika odstraněna a následně opět přidávána. Ukázalo se, že u bakteriální populace došlo k prodloužení lag fáze již po několikátém cyklu. Tedy docházelo k postupné adaptaci bakterií na působení antibiotika. Z toho důvodu jsem porovnávala, zda dochází k většímu prodloužení lag fáze po působení antibiotik u adaptovanějších izolátů oproti primoizolátu. Zjistila jsem, že ani u jednoho pacienta nedošlo u adaptovanějších izolátů k výraznému prodloužení lag fáze, a tedy pozdějšímu nárůstu biomasy, a to po působení žádného antibiotika. Ukázkový graf uvádím pro vankomycin, a to pro trojici izolátů od prvního pacienta (28A, 37A, 38A, viz graf č. 16). Pro odhalení změn v lag fázi, jak bylo popsáno v literatuře by bylo nejspíše třeba zkoumat adaptovanější izoláty nebo na toto stanovení použít přesnější metody, například ScanLag, viz kapitola 2.5. Také nemám informace o tom, kdy a kterými antibiotiky byli pacienti léčeni, a na které antibiotikum tedy u studovaných izolátů mohla vznikat tolerance.

Proto, aby se stanovení pomocí kontinuálního měření OD dalo použít v praxi, by metoda musela být více optimalizována, zejména na stejnou počáteční koncentraci biomasy, viz rozdílná počáteční OD u grafu č. 15 a 16.

7. Souhrn

Cílem mé práce bylo porovnat jednotlivé metody studia perzistorů, které by se mohly v budoucnu používat v klinické praxi, a také rozšířit znalosti o chování perzistorů díky těmto metodám. Zároveň jsem sledovala, jak se schopnost perzistovat mění během adaptace na hostitele, a jak je tato změna ovlivněna získanými mutacemi.

V mojí diplomové práci bylo dosaženo těchto cílů:

1. Pomocí křivky hynutí jsem zjistila míru perzistence u klinických chronologických izolátů od dvou pacientů s cystickou fibrózou a zjistila jsem, že schopnost perzistovat stoupá s adaptací izolátu. Také jsem zjistila, že mutanti v genech *agr* a *hyp* více perzistují.
2. Sledovala jsem vliv antibiotik na membránový potenciál pomocí průtokové cytometrie a určila jsem zastoupení subpopulací v průběhu působení antibiotika. Zjistila jsem, že takovéto odlišení subpopulací se nedá korelovat s mírou perzistence.
3. Stanovila jsem míru genové exprese pro geny, v kterých byly izoláty mutované. Zjistila jsem, že geny, které se účastní syntézy buněčné stěny jsou během působení antibiotik v adaptovaných izolátech výrazně více exprimovány.
4. Pomocí stanovení genové exprese jsem dále potvrdila, že gen *rnaIII*, který je součástí *Agr* operonu, je v chronických infekcích potlačován.
5. Otestovala jsem metodu kontinuálního stanovení OD pro zjištění dynamiky vyrůstání z perzistence. Zjistila jsem, že má na toto vyrůstání zásadní vliv ředění, a že mutace v *agr* genech zvyšují růstovou rychlost.
6. Kontinuálním měřením OD jsem u izolátů sledovala prodlužování lag fáze po vyrůstání z perzistence v závislosti na použitém antibiotiku.

8. Seznam 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. *Infect Immun*, 61(9), 3879-3885
2. Amato, S. M., & Brynildsen, M. P. (2015). Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress. *Curr Biol*, 25(16), 2090-2098
3. Amato, S. M., Orman, M. A., & Brynildsen, M. P. (2013). Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, 50(4), 475-487
4. Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *J Bacteriol*, 200(20)
5. Ayrapetyan, M., Williams, T. C., Baxter, R., & Oliver, J. D. (2015). Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. *Infect Immun*, 83(11), 4194-4203
6. Baharoglu, Z., Garriss, G., & Mazel, D. (2013). Multiple Pathways of Genome Plasticity Leading to Development of Antibiotic Resistance. *Antibiotics (Basel)*, 2(2), 288-315.
7. Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol*, 17(7), 441-448
8. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690), 1622-1625
9. Balwit, J. M., van Langevelde, P., Vann, J. M., & Proctor, R. A. (1994). Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis*, 170(4), 1033-1037
10. Bamford, R. A., Smith, A., Metz, J., Glover, G., Titball, R. W., & Pagliara, S. (2017). Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biol*, 15(1), 121
11. Bernier, S. P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A. S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J. Y., Beloin, C. (2013). Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet*, 9(1)
12. Bigger, J., (1944) Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, 244, 497-500
13. Black, D. S., Irwin, B., & Moyed, H. S. (1994). Autoregulation of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *Journal of bacteriology*, 176(13), 4081-4091.
14. Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Romby, P. (2007). *Staphylococcus aureus* RNAlII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev*, 21(11), 1353-1366
15. Bojer, M. S., Lindemose, S., Vestergaard, M., & Ingmer, H. (2018). Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in. *Front Microbiol*, 9, 255

16. Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 4(4)
17. Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol*, 19(9), 449-455
18. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol*, 14(5), 320-330
19. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535
20. Cirz, R. T., Jones, M. B., Gingles, N. A., Minogue, T. D., Jarrahi, B., Peterson, S. N., & Romesberg, F. E. (2007). Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol*, 189(2), 531-539
21. Coelho, L. R., Souza, R. R., Ferreira, F. A., Guimarães, M. A., Ferreira-Carvalho, B. T., & Figueiredo, A. M. S. (2008). agr RNAPIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 154(Pt 11), 3480-3490
22. Cohen, N. R., Lobritz, M. A., & Collins, J. J. (2013). Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe*, 13(6), 632-642
23. Dastgheyb, S. S., Villaruz, A. E., Le, K. Y., Tan, V. Y., Duong, A. C., Chatterjee, S. S., Otto, M. (2015). Role of Phenol-Soluble Modulins in Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilms in Synovial Fluid. *Infect Immun*, 83(7), 2966-2975
24. Denamur E, Matic I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol Microbiol*.2006;60:820–7
25. Foster, T. J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*, 3(12), 948-958
26. Fridman, O., Goldberg, A., Ronin, I., Shores, N., & Balaban, N. Q. (2014). Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*, 513(7518), 418-421
27. García-Betancur, J. C., Goñi-Moreno, A., Horger, T., Schott, M., Sharan, M., Eikmeier, J., Lopez, D. (2017). Cell differentiation defines acute and chronic infection cell types in. *Elife*, 6
28. 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. *Infect Immun*, 68(3), 1304-1311
29. Goerke, C., Kümmel, M., Dietz, K., & Wolz, C. (2003). Evaluation of intraspecies interference due to agr polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. *J Infect Dis*, 188(2), 250-256
30. Goldman, E., & Jakubowski, H. (1990). Uncharged tRNA, protein synthesis, and the bacterial stringent response. *Mol Microbiol*, 4(12), 2035-2040
31. Gray, R. D., Hardisty, G., Regan, K. H., Smith, M., Robb, C. T., Duffin, R., Davidson, D. J. (2018). Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax*, 73(2), 134-144
32. Guillier, L., Pardon, P., & Augustin, J. C. (2005). Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 71(6), 2940-2948
33. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 95-108

34. Halsey, C. R., Lei, S., Wax, J. K., Lehman, M. K., Nuxoll, A. S., Steinke, L., Fey, P. D. (2017). Amino Acid Catabolism in. *mBio*, 8(1)
35. Haven, B., Heilig, E., Donham, C., Settles, M., Vasilevsky, N., Owen, K., Biology, R. P. C. (2016). Registered report: A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Elife*, 5
36. Henry, T. C., & Brynildsen, M. P. (2016). Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci Rep*, 6, 25100
37. Herzog, S., Dach, F., de Buhr, N., Niemann, S., Schlagowski, J., Chaves-Moreno, D., Kahl, B. C. (2019). High Nuclease Activity of Long Persisting. *Front Immunol*, 10, 2552
38. Hirschhausen, N., Block, D., Bianconi, I., Bragonzi, A., Birtel, J., Lee, J. C., Kahl, B. C. (2013). Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int J Med Microbiol*, 303(8), 685-692
39. Hofsteenge, N., van Nimwegen, E., & Silander, O. K. (2013). Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC Microbiol*, 13, 25
40. Kahl, B. C., Belling, G., Becker, P., Chatterjee, I., Wardecki, K., Hilgert, K., Herrmann, M. (2005). Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun*, 73(7), 4119-4126
41. Kim, J. S., & Wood, T. K. (2016). Persistent Persister Misperceptions. *Front Microbiol*, 7, 2134
42. Kim, J. S., & Wood, T. K. (2017). Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. *MBio*, 8(2).
43. Kim, J. S., Yamasaki, R., Song, S., Zhang, W., & Wood, T. K. (2018). Single cell observations show persister cells wake based on ribosome content. *Environ Microbiol*, 20(6), 2085-2098
44. Koenig, R. L., Ray, J. L., Maleki, S. J., Smeltzer, M. S., & Hurlburt, B. K. (2004). *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAPIII-agr regulatory region. *J Bacteriol*, 186(22), 7549-7555
45. Kohler, C., von Eiff, C., Peters, G., Proctor, R. A., Hecker, M., & Engelmann, S. (2003). Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. *J Bacteriol*, 185(23), 6928-6937
46. Korch, S. B., & Hill, T. M. (2006). Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J Bacteriol*, 188(11), 3826-3836
47. Kubistova, L., Dvoracek, L., Tkadlec, J., Melter, O., & Licha, I. (2018). Environmental Stress Affects the Formation of *Staphylococcus aureus* Persisters Tolerant to Antibiotics. *Microb Drug Resist*, 24(5), 547-555
48. Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q., & Leibler, S. (2005). Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*, 169(4), 1807-1814
49. Kushwaha, G. S., Oyeyemi, B. F., & Bhavesh, N. S. (2019). Stringent response protein as a potential target to intervene persistent bacterial infection. *Biochimie*, 165, 67-75

50. Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J., & Wood, T. K. (2013). Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob Agents Chemother*, *57*(3), 1468-1473
51. Laabei, M., Recker, M., Rudkin, J. K., Aldeljawi, M., Gulay, Z., Sloan, T. J., Massey, R. C. (2014). Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. *Genome Res*, *24*(5), 839-849
52. LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A., & Lewis, K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(11), 3839-3846
53. 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 Microbiol*, *18*(1), 152
54. Lattar, S. M., Tuchscher, L. P., Caccuri, R. L., Centrón, D., Becker, K., Alonso, C. A., & Sordelli, D. O. (2009). Capsule expression and genotypic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic or acute osteomyelitis. *Infection and immunity*, *77*(5), 1968-1975.
55. Lauderdale, K. J., Boles, B. R., Cheung, A. L., & Horswill, A. R. (2009). Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun*, *77*(4), 1623-1635
56. Lechner, S., Lewis, K., & Bertram, R. (2012). *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol*, *22*(4), 235-244
57. Leszczynska, D., Matuszewska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Furmanek-Blaszczak, B., & Laskowska, E. (2013). The formation of persister cells in stationary-phase cultures of *Escherichia coli* is associated with the aggregation of endogenous proteins. *PLoS One*, *8*(1), e54737
58. Levin, B. R., & Rozen, D. E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, *4*(7), 556-562
59. Levin-Reisman, I., Fridman, O., & Balaban, N. Q. (2014). ScanLag: high-throughput quantification of colony growth and lag time. *J Vis Exp*(89)
60. Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N., & Balaban, N. Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, *355*(6327), 826-830
61. Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*, *70*(2), 267-274
62. Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu Rev Microbiol*, *64*, 357-372
63. Liu, H. H., & Tomasz, A. (1985). Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, *152*(2), 365-372
64. Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, *339*(8), 520-532
65. Luidalepp, H., Jöers, A., Kaldalu, N., & Tenson, T. (2011). Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. *J Bacteriol*, *193*(14), 3598-3605
66. MacKenzie, F. M., & Gould, I. M. (1993). The post-antibiotic effect. *J Antimicrob Chemother*, *32*(4), 519-537

67. Marbach, H., Mayer, K., Vogl, C., Lee, J. Y. H., Monk, I. R., Sordelli, D. O., Grunert, T. (2019). Within-host evolution of bovine *Staphylococcus aureus* selects for a SigB-deficient pathotype characterized by reduced virulence but enhanced proteolytic activity and biofilm formation. *Sci Rep*, 9(1), 13479
68. 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. *J Bacteriol*, 180(10), 2609-2615
69. Mohiuddin, S. G., Kavousi, P., & Orman, M. A. (2020). Flow-cytometry analysis reveals persister resuscitation characteristics. *BMC Microbiol*, 20(1), 202
70. 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. *J Bacteriol*, 188(1), 64-76
71. Molina-Quiroz, R. C., Silva-Valenzuela, C., Brewster, J., Castro-Nallar, E., Levy, S. B., & Camilli, A. (2018a). Cyclic AMP Regulates Bacterial Persistence through Repression of the Oxidative Stress Response and SOS-Dependent DNA Repair in Uropathogenic. *mBio*, 9(1)
72. 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. *J Bacteriol*, 155(2), 768-775
73. Möker, N., Dean, C. R., & Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol*, 192(7), 1946-1955
74. Novick, R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., Moghazeh, S. (1995). The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*, 248(4), 446-458
75. 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(4), 827-834.
76. Nyström, T. (2007). A bacterial kind of aging. *PLoS Genet*, 3(12), e224
77. Orman, M. A., Henry, T. C., DeCoste, C. J., & Brynildsen, M. P. (2016). Analyzing Persister Physiology with Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Methods Mol Biol*, 1333, 83-100
78. Palma Medina, L. M., Becker, A. K., Michalik, S., Yedavally, H., Raineri, E. J. M., Hildebrandt, P., Völker, U. (2019). Metabolic Cross-talk Between Human Bronchial Epithelial Cells and Internalized. *Mol Cell Proteomics*, 18(5), 892-908
79. Pandey, S., Sahukhal, G. S., & Elasmri, M. O. (2019). The. *J Bacteriol*, 201(21)
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(2), e85998

81. Pasquaroli, S., Zandri, G., Vignaroli, C., Vuotto, C., Donelli, G., & Biavasco, F. (2013). Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 68(8), 1812-1817
82. Patton, T., Jiang, J. H., Lundie, R. J., Bafit, M., Gao, W., Peleg, A. Y., & O'Keeffe, M. (2020). Daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates are poorly sensed by dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 98(1), 42-53
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*. *J Bacteriol*, 170(9), 4365-4372
84. Peschel, A., & Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol*, 11(10), 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. Philippi, T., & Seger, J. (1989). Hedging one's evolutionary bets, revisited. *Trends Ecol Evol*, 4(2), 41-44
87. Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol*, 62, 35-51
88. Proctor, R. (2019). Respiration and Small Colony Variants of. *Microbiol Spectr*, 7(3)
89. Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*, 4(4), 295-305
90. Prossliner, T., Skovbo Winther, K., Sørensen, M. A., & Gerdes, K. (2018). Ribosome Hibernation. *Annu Rev Genet*, 52, 321-348
91. Pu, Y., Li, Y., Jin, X., Tian, T., Ma, Q., Zhao, Z., Bai, F. (2019). ATP-Dependent Dynamic Protein Aggregation Regulates Bacterial Dormancy Depth Critical for Antibiotic Tolerance. *Mol Cell*, 73(1), 143-156.e144
92. Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Bai, F. (2016). Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Mol Cell*, 62(2), 284-294
93. Queck, S. Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A. E., Bach, T. H., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., Otto, M. (2008). RNAPIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell*, 32(1), 150-158
94. Radzikowski, J. L., Vedelaar, S., Siegel, D., Ortega, A. D., Schmidt, A., & Heinemann, M. (2016). Bacterial persistence is an active σ S stress response to metabolic flux limitation. *Molecular systems biology*, 12(9), 882.
95. Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A., & Novick, R. P. (1986). Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet*, 202(1), 58-61
96. Riquelme, S. A., Wong Fok Lung, T., & Prince, A. (2020). Pulmonary Pathogens Adapt to Immune Signaling Metabolites in the Airway. *Front Immunol*, 11, 385
97. Rowe, S. E., Conlon, B. P., Keren, I., & Lewis, K. (2016). Persisters: Methods for Isolation and Identifying Contributing Factors--A Review. *Methods Mol Biol*, 1333, 17-28

98. Schwerdt, M., Neumann, C., Schwartbeck, B., Kampmeier, S., Herzog, S., Görlich, D., Kahl, B. C. (2018). *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients - A retrospective long-term study. *Int J Med Microbiol*, 308(6), 631-639
99. Sebastian, J., Swaminath, S., Nair, R. R., Jakkala, K., Pradhan, A., & Ajitkumar, P. (2017). De Novo Emergence of Genetically Resistant Mutants of Mycobacterium tuberculosis from the Persistence Phase Cells Formed against Antituberculosis Drugs In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(2)
100. Sendi, P., & Proctor, R. A. (2009). *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*, 17(2), 54-58
101. Shambat, S. M., Siemens, N., Monk, I. R., Mohan, D. B., Mukundan, S., Krishnan, K. C., & Svensson, M. (2016). A point mutation in AgrC determines cytotoxic or colonizing properties associated with phenotypic variants of ST22 MRSA strains. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
102. Shan, Y., Brown Gandt, A., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P., & Lewis, K. (2017). ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia coli*. *mBio*, 8(1)
103. Shapiro, H. M., & Nebe-von-Caron, G. (2004). Multiparameter flow cytometry of bacteria. In *Flow Cytometry Protocols* (pp. 33-43). Humana Press.
104. Shi, L., Wu, Y., Yang, C., Ma, Y., Zhang, Q. Z., Huang, W., Zhao, K. Q. (2019). Effect of nicotine on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence factors. *Sci Rep*, 9(1), 20243
105. Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 18, 96-104
106. 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. *J Bacteriol*, 184(5), 1430-1437
107. Somerville, G. A., & Proctor, R. A. (2009). At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(2), 233-248
108. Song, S., & Wood, T. K. (2020). ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochem Biophys Res Commun*, 523(2), 281-286
109. Spoering, A. L., & Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*, 183(23), 6746-6751
110. Sulaiman, J. E., & Lam, H. (2019). Application of proteomics in studying bacterial persistence. *Expert Rev Proteomics*, 16(3), 227-239
111. Sulaiman, J. E., & Lam, H. (2020). Proteomic Study of the Survival and Resuscitation Mechanisms of Filamentous Persisters in an Evolved *Escherichia coli* Population from Cyclic Ampicillin Treatment. *mSystems*, 5(4)
112. Suligoy, C. M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., González, C. D., Alvarez, L. P., Robinson, D. A., Sordelli, D. O. (2018). Mutation of Agr Is Associated with the Adaptation of. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 18
113. Tan, X., Coureuil, M., Ramond, E., Euphrasie, D., Dupuis, M., Tros, F., Jamet, A. (2019). Chronic *Staphylococcus aureus* Lung Infection Correlates With Proteogenomic and Metabolic Adaptations Leading to an Increased Intracellular Persistence. *Clin Infect Dis*, 69(11), 1937-1945

114. Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol*, *13*(9), 529-543
115. Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., Löffler, B. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog*, *11*(4), e1004870
116. 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*(3)
117. Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., & Wada, A. (2005). Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, *10*(12), 1103-1112
118. Van den Bergh, B., Michiels, J. E., Wenseleers, T., Windels, E. M., Boer, P. V., Kestemont, D., Michiels, J. (2016). Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nat Microbiol*, *1*, 16020
119. Vaudaux, P., Francois, P., Bisognano, C., Kelley, W. L., Lew, D. P., Schrenzel, J., Von Eiff, C. (2002). Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect Immun*, *70*(10), 5428-5437
120. Verstraeten, N., Knapen, W., Fauvart, M., & Michiels, J. (2016). A Historical Perspective on Bacterial Persistence. *Methods Mol Biol*, *1333*, 3-13
121. Vestergaard, M., Paulander, W., & Ingmer, H. (2015). Activation of the SOS response increases the frequency of small colony variants. *BMC Res Notes*, *8*, 749
122. Vogwill, T., Kojadinovic, M., & MacLean, R. C. (2016). Epistasis between antibiotic resistance mutations and genetic background shape the fitness effect of resistance across species of *Pseudomonas*. *Proc Biol Sci*, *283*(1830)
123. Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*(1), 317-323
124. Wang, Y., Bojer, M. S., George, S. E., Wang, Z., Jensen, P. R., Wolz, C., & Ingmer, H. (2018). Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Sci Rep*, *8*(1), 10849
125. Waters, E. M., Rowe, S. E., O'Gara, J. P., & Conlon, B. P. (2016). Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLoS Pathog*, *12*(12)
126. Wilmaerts, D., Windels, E. M., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2019). General Mechanisms Leading to Persister Formation and Awakening. *Trends Genet*, *35*(6), 401-411

127. Windels, E. M., Michiels, J. E., Fauvart, M., Wenseleers, T., Van den Bergh, B., & Michiels, J. (2019). Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *ISME J*, *13*(5), 1239-1251
128. Windmüller, N., Witten, A., Block, D., Bunk, B., Spröer, C., Kahl, B. C., & Mellmann, A. (2015). Transcriptional adaptations during long-term persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of a cystic fibrosis patient. *Int J Med Microbiol*, *305*(1), 38-46
129. Yaakov, G., Lerner, D., Bentele, K., Steinberger, J., & Barkai, N. (2017). Coupling phenotypic persistence to DNA damage increases genetic diversity in severe stress. *Nat Ecol Evol*, *1*(1), 16
130. Yoshida, H., Shimada, T., & Ishihama, A. (2018). Coordinated Hibernation of Transcriptional and Translational Apparatus during Growth Transition of *Escherichia coli* to Stationary Phase. *mSystems*, *3*(5)
131. Zalis, E. A., Nuxoll, A. S., Manuse, S., Clair, G., Radlinski, L. C., Conlon, B. P., Lewis, K. (2019). Stochastic Variation in Expression of the Tricarboxylic Acid Cycle Produces Persister Cells. *mBio*, *10*(5)
132. Zapotoczna, M., O'Neill, E., & O'Gara, J. P. (2016). Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS Pathog*, *12*(7)