

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 třičtvrtě 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 kultivaci 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*