

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína



Mgr. Lucie Kalferstová

Studium patogeneze infekce, kterou způsobují bakterie
komplexu *Burkholderia cepacia* u nemocných cystickou fibrózou

The study of the pathogenesis of infection caused
by bacteria from *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Dřevínek, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 18.03.2016

Lucie Kalferstová

Podpis

Identifikační záznam:

KALFERSTOVÁ, Lucie. *Studium patogeneze infekce, kterou způsobují bakterie komplexu Burkholderia cenocepacia u nemocných cystickou fibrózou. [The study of the pathogenesis of infection caused by bacteria from Burkholderia cepacia complex in patients with cystic fibrosis]*. Praha, 2016, 111 stran, 9 příloh, dizertační práce (PhD.), Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie. Vedoucí práce doc. MUDr. Pavel Dřevínek, PhD.

Klíčová slova:

cystická fibróza, bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*, epidemický kmen, microarray analýza, faktory virulenc, mutageneze, T3SS, virulence, genotypizace, *P. aeruginosa*

Keywords:

cystic fibrosis, *Burkholderia cepacia* complex, epidemic strain, microarray analysis, virulence factors, mutagenesis, T3SS, virulence, genotyping, *P. aeruginosa*

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Pavlu Dřevínkovi, PhD za skvělé vedení, velké množství cenných rad a obrovskou trpělivost po celou dobu vypracovávání této dizertační práce.

Dále bych ráda poděkovala doc. MUDr. Ondřeji Cinkovi, PhD, Mgr. Kláře Vilimovské Dědečkové, PhD, Mgr. Jolaně Vavrové a celému kolektivu laboratoře molekulární genetiky Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF a FN Motol v Praze za umožnění provedení této práce, a také za jejich rady, ochotu a vstřícnost.

Mé velké díky patří i všem blízkým přátelům, zvláště potom mé rodině, za jejich podporu a zázemí vždy, když jsem potřebovala.

Obsah

Obsah.....	4
I. OBECNÁ ČÁST	10
1. CYSTICKÁ FIBRÓZA.....	11
2. BAKTERIE KOMPLEXU <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i>	15
2.1. Charakteristika a taxonomie.....	15
2.2. Bcc u pacientů s cystickou fibrózou.....	17
2.2.1. <i>B. cenocepacia</i>	18
2.3. Epidemické kmeny Bcc.....	19
2.4. Faktory virulence.....	20
2.4.1. Popis nejčastěji studovaných faktorů virulence	21
2.4.2. Vybrané metody studia faktorů virulence	29
2.5. Transkriptomové studie.....	32
2.5.1. Microarray metoda	32
2.5.2. RNA sekvenování	34
II. SPECIÁLNÍ ČÁST	36
3. STUDIUM ZMĚN GENOVÉ EXPRESE U BAKTERIÍ <i>BURKHOLDERIA CENOCEPACIA</i> ST32 NA ZÁKLADĚ MICROARRAY ČIPŮ.....	37
3.1. Metodika	38
3.1.1. Sběr klinického materiálu.....	38
3.1.2. Kultivace bakterií	39
3.1.3. Extrakce a zpracování bakteriální RNA	39
3.1.4. Extrakce a zpracování bakteriální DNA (J2315).....	41
3.1.5. Microarray čipy	41
3.1.6. Analýza výsledků	42
3.1.7. Real time PCR.....	42
3.1.8. Elektronová mikroskopie	43
3.1.9. Funkční test pro měření schopnosti motility bakterií	43
3.2. Výsledky	44
3.2.1. Microarray experiment.....	44
3.2.2. Kvantitativní PCR u vybraných genů po kultivaci izolátů v BSM.....	48
3.2.3. Kvantitativní PCR přímo z klinického materiálu	52
3.2.4. Elektronová mikroskopie	54
3.2.5. Měření schopnosti motility bakterií	55
3.3. Diskuze.....	57
4. STUDIUM SEKREČNÍHO SYSTÉMU TYPU III U BAKTERIE <i>BURKHOLDERIA CENOCEPACIA</i> ST32.....	60

4.1.	Metodika	60
4.1.1.	Získání tetracyklin senzitivních izolátů.....	60
4.1.2.	Tvorba mutantních izolátů pro T3SS a gentamicin („Triparental mating assay“)	61
4.1.3.	Měření schopnosti tvorby biofilmu	64
4.1.4.	Růstové křivky	64
4.1.5.	Testování izolátů na makrofázích.....	65
4.2.	Výsledky	67
4.2.1.	Získání tetracyklin senzitivních izolátů.....	67
4.2.2.	Tvorba izolátu mutantního pro T3SS a citlivého na gentamicin.....	67
4.2.3.	Měření schopnosti tvorby biofilmu	68
4.2.4.	Růstové křivky	69
4.2.5.	Testování izolátů na makrofázích.....	71
4.3.	Diskuze.....	73
5.	SURVEILLANCE INFEKČÍ BAKTERIEMI <i>P. AERUGINOSA</i>	75
5.1.	Metodika	76
5.2.	Výsledky	76
5.2.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
5.3.	Diskuze.....	79
6.	DALŠÍ SMĚRY VÝZKUMU	81
7.	ZÁVĚR	83
8.	LITERATURA.....	84
9.	SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ	90
III.	PŘÍLOHY	92
Příloha č. 1:	Souhrn počtu genů se změněnou expresí při analýzách microarray dat zaměřených na zdroj izolátu.....	93
Příloha č. 2:	Seznam genů a na ně navržených primerů vybraných pro testování genové exprese na real time PCR.....	94
Příloha č. 3a:	Seznam genů se změněnou expresí při porovnání izolátu z krve a izolátu ze sputa od pacienta A.....	95
Příloha č. 3b:	Seznam genů se změněnou expresí při porovnání izolátu z krve a izolátu ze sputa od pacienta B.....	98
Příloha č. 4:	Výsledky kvantitativního PCR při porovnávání exprese vybraných genů po izolaci RNA přímo z klinického materiálu od pacienta P	102
Příloha č. 5a:	Seznam ST32 izolátů od pacientů s CF, kteří doposud neprodělali cepacia syndrom	103
Příloha č. 5b:	Výsledky měření schopnosti motility izolátů od pacientů, kteří neprodělali cepacia syndrom.....	104
Publikace č. 1	107
Publikace č. 2	108

Seznam zkratk:

ABC	ATP-binding cassette, ATP- vázající kazeta
AES	Australian epidemic strain, australský epidemický kmen
AFLP	amplified fragment length polymorphism, genotypizační metoda založená na délkovém polymorfismu amplifikovaných fragmentů
AHL	<i>N</i> -acyl-homoserin-lakton
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> complex, komplex bakterií <i>Burkholderia cepacia</i>
BCESM	<i>Burkholderia cepacia</i> epidemic strain marker, marker transmisivity přenosných kmenů bakterií komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> selective agar, selektivní agar ke stanovení bakterií komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
BDSF	<i>Burkholderia</i> diffused signal factor, <i>Burkholderia</i> difúzní signální faktor
BSM	basal salt medium, základní médium
cAMP	cyclic adenosine monophosphate, cyklický adenosinmonofosfát
CCF	centrum cystické fibrózy
cci	cenocepacia island, cenocepacia genomický ostrov
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CDS	coding sequence, kódující oblast sekvence
CF	cystická fibróza
CFTR	cystic fibrosis transmembrane receptor, transmembránový regulátor vodivosti iontů
CFU	colony forming unit, kolonii tvořící jednotka
CS	cepacia syndrom
CZ1	původní označení českého epidemického kmene, později potvrzen jako <i>Burkholderia cenocepacia</i> ST32
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DHFR	dihydrofolate reductase, dihydrofolát reduktáza
dNTPs	deoxynukleotid trifosfáty
ET12	elektroforetický typ 12, epidemická linie popsána na základě multilokusové enzymové elektroforézy
ETA	exotoxin A
FN	fakultní nemocnice

IBCWG	International <i>Burkholderia cepacia</i> working group, Mezinárodní pracovní skupina pro bakterie komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
LES	Liverpool epidemic strain, liverpoolský epidemický kmen
LMG	Laboratoř molekulární genetiky
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight, hmotnostní spektrometr s ionizací laserem za přítomnosti matrice a detektorem doby letu
MES	Manchester epidemic strain, epidemický kmen z Manchesteru
MFP	membránový fúzní protein
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis, multilokusová enzymová elektroforéza
MLST	multilocus sequence typing, multilokusová sekvenční typizace
MOI	multiplicity of infection, infekční dávka pro daný izolát
mRNA	mesengerová ribonukleová kyselina
PBP	penicilin binding proteins, penicilin vázající proteiny
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulsed field electrophoresis, elektroforéza v pulzním poli
PHDC	Philadelphia-DC, epidemický kmen rozšířený v centrech cystické fibrózy ve Filadelfii
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RAPD	random amplified polymorphic DNA, náhodná amplifikace polymorfních úseků DNA
RNA	ribonukleová kyselina
RNA-Seq	sekvenování nové generace ribonukleových kyselin
ROS	reactive oxygen species, reaktivní forma kyslíku
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
sRNA	small ribonucleic acid, malá ribonukleová kyselina
ST	sekvenční typ
ST32-PCR	polymerázová řetězová reakce specificky detekující epidemický kmen <i>Burkholderia cenocepacia</i> ST32
T3SS	sekreční systém typu III
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TSA	tryptone soya agar, trypton sójový agar
UK	United Kingdom, Spojené království

ÚLM Ústav lékařské mikrobiologie
USA United States of America, Spojené státy americké

Seznam publikací, které jsou součástí dizertační práce:

1. Kalferstova L, Kolar M, Fila L, Vavrova J, Drevinek P. Gene Expression Profiling of *Burkholderia cenocepacia* at the Time of Cepacia Syndrome: Loss of Motility as a Marker of Poor Prognosis? J Clin Microbiol. 2015 May;53(5):1515-22.
2. Kalferstova L, Vilimovska Dedeckova K, Antuskova M, Melter O, Drevinek P. How and why to monitor *Pseudomonas aeruginosa* infections in the long term at a cystic fibrosis centre. J Hosp Infect. 2016 Jan;92(1):54-60. doi: 10.1016/j.jhin.2015.09.010. Epub 2015 Oct 8.

Problematika této dizertační práce se stala také předmětem následujících odborných sdělení a textů:

- Tomáškovy dny v Brně, ČR, 2012. Téma prezentace: *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou – návrh postupu pro surveillance infekcí.
- Evropská konference cystické fibrózy, Lisabon, Portugalsko, 2013. Poster: Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* infections at the Prague CF centre
- Pracovní setkání Mezinárodní pracovní skupiny pro bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*, Ann Arbor, USA, 2013. Téma prezentace: Gene expression changes of *Burkholderia cenocepacia* ST32 when cultured in CF sputum and serum
- Pracovní setkání Mezinárodní pracovní skupiny pro bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*, Nimes, Francie, 2014. Téma prezentace: Changes in expression of virulence factors over the course of infection with *Burkholderia cenocepacia* ST32
- Pracovní setkání Mezinárodní pracovní skupiny pro bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*, Vancouver, Kanada. Téma prezentace: Is the type III secretion system of *Burkholderia cenocepacia* ST32 involved in cepacia syndrom?

Souhrn:

Bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (Bcc) a bakterie *Pseudomonas aeruginosa* patří mezi nejzávažnější patogeny způsobující plicní infekce u pacientů s cystickou fibrózou (CF). Tyto bakterie jsou vysoce rezistentní k téměř všem dostupným antibiotikům. Kromě problematické léčby je dalším závažným problémem riziko vzniku epidemické infekce, které je dané schopností některých kmenů šířit se mezi pacienty. Některé kmeny bakterií Bcc jsou schopny přejít do krevního řečiště a způsobit závažný septický stav zvaný cepacia syndrom. Jedním z takových kmenů je český epidemický kmen *B. cenocepacia* ST32, který se v 90. letech 20. století rozšířil mezi českými pacienty s CF.

Cílem této práce bylo porovnat transkriptomový profil izolátů získaných z krve pacientů ve fázi cepacia syndromu s profilem izolátů získaných ze sputa pacientů ve stabilní fázi infekce, případně v exacerbaci. Na základě porovnání vybrat vhodné geny s rozdílnou expresí, které by mohly být využity jako případný marker pro detekci blížícího se cepacia syndromu. Vybraný vhodný „marker“, který by měl zároveň kódovat obecně známý faktor virulence, podrobit hlubšímu studiu pro porozumění jeho funkce a vlivu na virulenci v okamžiku cepacia syndromu. Posledním cílem této práce bylo zhodnocení epidemiologické situace bakterií *P. aeruginosa* u pacientů s CF v pražském CF centru a následné sestavení nejvhodnějšího vyšetřovacího postupu pro sledování těchto bakterií.

V předkládané dizertační práci jsme:

- a) na základě porovnání transkriptomových profilů *B. cenocepacia* ST32 získaných od pacientů z krve (cepacia syndrom) a sputa (stabilní fáze/exacerbace) kultivovaných v různých podmínkách vybrali vhodné geny s rozdílnou expresí pro prospektivní sledování vývoje infekce. Zjistili jsme, že izoláty získané z krve jsou spojeny se zvýšenou expresí genů pro sekreční systém typu III a zároveň se sníženou expresí genů pro bičík.
- b) geny se změněnou expresí ověřili pomocí qRT-PCR. Sledování exprese jsme převedli na přímou detekci genové exprese z klinického materiálu (sputum) bez nutnosti *in vitro* kultivace izolátů. Vyšetření pomocí qRT-PCR jsme doplnili funkčním testem pro sledování motility bakterií.
- c) podrobili vybraný faktor virulence, sekreční systém typu III, hlubšímu studiu pomocí mutagenních technik, abychom podpořili tvrzení o jeho významu pro přežití bakterií v krvi.
- d) vyloučili šíření epidemického kmene *P. aeruginosa* mezi pacienty v pražském CF centru. Zároveň byl sestaven finančně a časově nejvhodnější postup pro vyšetřování izolátů *P. aeruginosa* od pacientů s CF.

Summary:

Bacteria from *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) and bacteria *Pseudomonas aeruginosa* belong among the most serious pathogens causing lung infections in patients with cystic fibrosis (CF). These bacteria are highly resistant to almost all of the available antibiotics. Another serious problem is the ability of certain strains to spread among the patients, which can cause an epidemic infection.

Some of the Bcc strains are capable of entering the bloodstream and causing serious septic condition called cepacia syndrome. One of these strains is the Czech epidemic strain *B. cenocepacia* ST32, which spread among Czech patients with CF in the 90s of the 20th century.

The aim of this study was to compare transcriptome profiles of isolates gained from blood of patients with cepacia syndrome with transcriptome profiles of isolates gained from sputum of patients in the stable phase eventually exacerbation, and to choose the most appropriate genes with the different expression, which could be used as a possible marker for detection of arising cepacia syndrome. Another aim of this study was to do further study of function and influence on virulence of chosen marker (which is coding generally known virulence factor) in the time of cepacia syndrome. The last aim was to assess the epidemiologic situation of bacteria from *P. aeruginosa* in patients with CF in Prague CF centre and subsequent compilation of the best investigative procedure for the monitoring of these bacteria.

In the present thesis we:

- a) based on the comparison of transcriptomic profiles of *B. cenocepacia* ST32 gained from blood (cepacia syndrome) with transcriptomic profiles of sputum (stable phase/exacerbation) cultivated in different conditions, we chose appropriate genes with different expression for prospective monitoring of infection progression. We discovered that isolates obtained from blood are connected to higher expression of the type III secretion system as well as to lower expression of genes for motility.
- b) verified genes with altered expression using qRT PCR. Monitoring of the gene expression was transferred to direct detection from the clinical material (sputum), without *in vitro* cultivation of isolates.
- c) subjected the chosen factor of virulence, the type III secretion system, to deeper study using mutagenesis techniques. We supported the claim of its importance for survival in bloodstream.
- d) excluded spreading the epidemic strain *P. aeruginosa* among patients from Prague CF centre. Furthermore, it was assembled the most appropriate procedure for monitoring the bacteria *P. aeruginosa* in a patient with cystic fibrosis.

I. OBECNÁ ČÁST

1. CYSTICKÁ FIBRÓZA

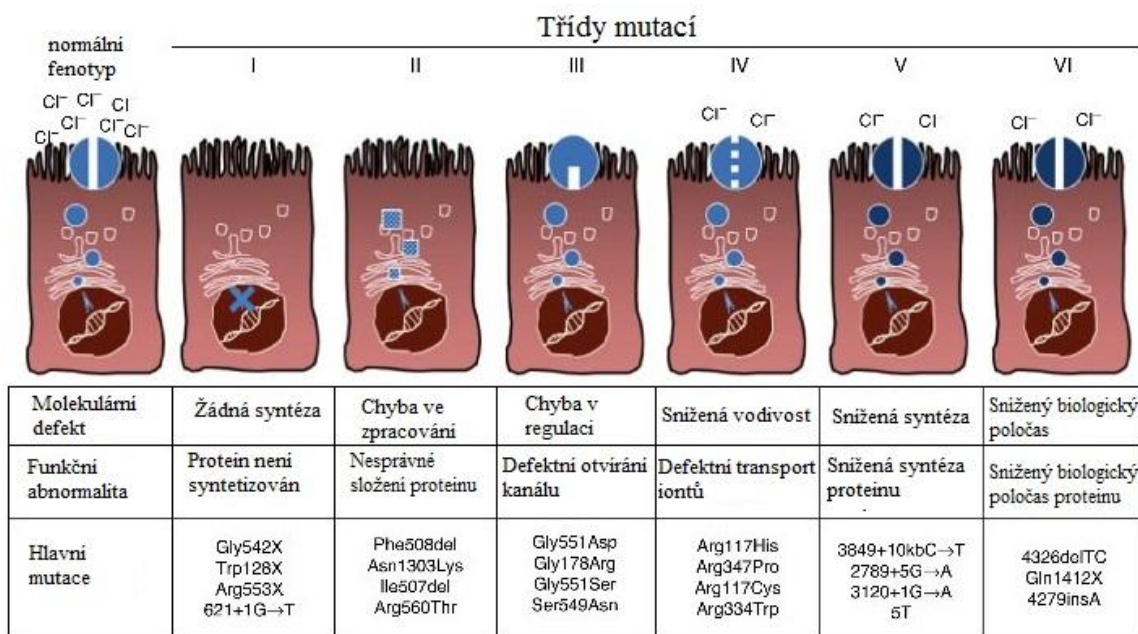
Cystická fibróza (CF) patří mezi nejčastější závažné autozomálně recesivní onemocnění predominantně přítomné u bělošské populace. Její výskyt se u jednotlivých etnik výrazně liší, u kavkazské populace se uvádí výskyt jednoho nemocného na 2 500 - 4 500 novorozenců. V České republice byla tato incidence na základě epidemiologických studií klinicky a molekulárně genetických vyšetření tradičně uváděná jako 1 : 2 700 novorozenců, ovšem po zavedení celoplošného novorozeneckého skríninku se zdá být výrazně nižší, 1 : 6 888 (kumulativní prevalence) ^{1 2 3}. Národní registr nemocných CF v České republice uvádí celkem 584 živých pacientů (údaj k 31. 1. 2014). I přes značné pokroky ve výzkumu patofyziologie tohoto onemocnění se stále jedná o nejčastější život zkracující genetické onemocnění.

Příčinou nemoci je defektní gen kódující protein CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) nacházející se na dlouhém raménku 7. chromozomu (7q31.2), identifikovaný v roce 1989 ⁴. CFTR je cAMP regulovaný chloridový kanál, který řídí další iontové kanály. Udržuje přiměřenou vazkost sekretů dýchacích cest pomocí vylučování chloridových iontů a zároveň inhibicí absorpce sodíkových iontů ⁵. Tento protein je exprimovaný na buněčné membráně většiny buněk lidského těla, a tak se jeho alterace klinicky projevuje na většině orgánových systémů, zvláště pak v dýchacím a gastrointestinálním traktu.

Mutace v genu kódujícím protein CFTR způsobí poruchu transportu iontů apikální membránou buněk. Mezi projevy tohoto defektu patří patologicky zvýšená vazkost hlenu v bronchiálním stromu, trávicím ústrojí i jiných systémech způsobená excesivní resorpcí sodíku, který je pasivně následován vodou, čímž dochází k dehydrataci hlenu. Složení hlenu a nedostatečná mukociliární clearance predisponuje pacienty s CF k recidivujícím infekcím plic, které přispívají ke zhoršování plicní funkce. Dalším projevem CF může být postnatální obstrukce distálního úseku střeva, tzv. mekoniový ileus, který se objevuje u 10 - 20 % pacientů. U mužů bylo popsáno postižení genitálního traktu, kdy se jedná o obstruktivní azoospermii vedoucí až k 95 % infertilních jedinců.

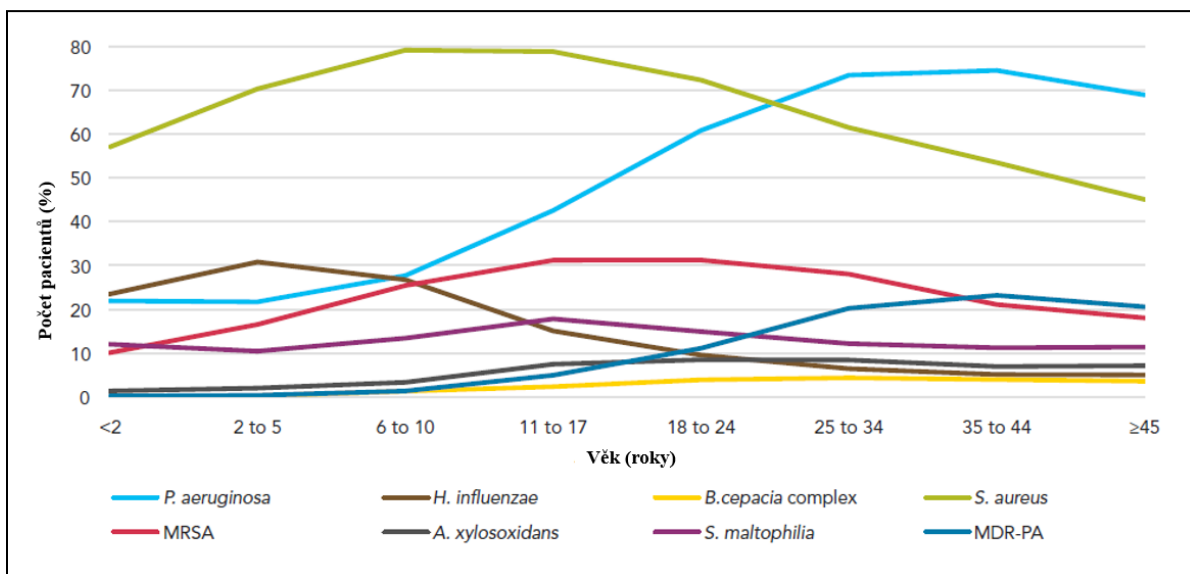
Bylo popsáno velké množství mutací asociovaných s CF (přes 1 700, www.cftr2.org), které se oficiálně podle mechanismu způsobujícím onemocnění dělí do šesti tříd, I – VI (Obrázek č. 1) ⁶. Třída I vykazuje přítomnost předčasného stop kodonu v mRNA, což má za následek translaci nekompletního proteinu. Ve druhé třídě mutací dochází k tvorbě strukturně abnormálního proteinu, který je endoplazmatickým retikulem degradován ještě před dosažením povrchu buňky. Do této třídy se řadí první popsaná a nejčastěji se vyskytující mutace, delece tří bazí kódujících fenylalanin na pozici 508 CFTR proteinu ($\Delta F508$). U mutací typu III – VI protein sice dosáhne

povrchu buňky, ale je omezena jeho funkce. U třídy III se jedná o sníženou aktivitu kanálu, který zůstává zavřený. U třídy IV dochází k poklesu přenosu iontů kanálem. V případě třídy mutací V dochází k tvorbě malého množství proteinu, který se objeví na povrchu buňky, ale ve velmi omezeném počtu. Třída VI způsobuje zkrácenou dobu funkce proteinu, která může na povrchu buňky ohrozit i okolní kanály ⁶. Nicméně pouze 22 mutací bylo identifikováno s frekvencí výskytu větší než 0.1 %



Obrázek č. 1. Třídy mutací CFTR proteinu, převzato a upraveno z publikace ⁶. Všechny popsané mutace CFTR proteinu, včetně informace zda vedou ke vzniku CF, jsou zaznamenávány v databázi (www.cftr2.org).

Mezi hlavní příčiny zvýšené úmrtnosti pacientů s CF stále patří chronické a recidivující infekce dýchacích cest. Tyto opakované bakteriální infekce způsobují poškození plicního parenchymu, které postupně vede k respirační insuficienci. U pacientů s CF se jedná o poměrně specifické bakteriální spektrum (Obrázek č. 2). Mezi nejčastější patogeny způsobující plicní infekce patří *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter xylosoxidans* a v neposlední řadě bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*. Ovšem pomocí mikrobiomových studií bylo odhaleno mnohem větší množství bakterií nacházejících se v plicích pacientů s CF (přibližně 37 viditelných fylogenetických typů u jednoho pacienta), v porovnání s množstvím získaným pomocí kultivačních technik (typicky 1 - 2 druhy bakterií) ^{7 8}.



Obrázek č. 2. Výskyt nejčastějších patogenů v jednotlivých věkových kategoriích pacientů s CF (2013). Převzato a upraveno z publikace ⁹.

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa, oportunní patogen, je popisována jako ubikviterní, gram negativní, aerobní, nefermentující pohyblivá tyčinka. Často je u ní pozorována produkce pigmentu pyocianinu a pyoverdinu, které způsobují nazelenalou barvu kolonií. Popisována je také její schopnost tvořit vyšší stupeň bakteriálního společenství, tzv. biofilm. Tato forma soužití umožňuje účinnější vazbu k epitelovým buňkám, chrání bakterie proti fagocytóze a poskytuje bakteriím vhodnější podmínky pro růst v mikroprostředí a vyšší rezistenci k antibiotické léčbě i imunitnímu systému hostitele ².

Nejčastěji se vyskytuje ve vodním prostředí (i odpadní vody), v půdě i na rostlinách. *P. aeruginosa* patří mezi původce nosokomiálních infekcí (může kontaminovat ventilátory, nebulizátory či cévní i močové katetry). Touto bakterií je kolonizována velká část pacientů s CF, nebo pacientů s neutropenií či popáleninami, kteří ji nejčastěji získávají právě z prostředí. Chronickou infekcí *P. aeruginosa* je na základě tzv. kritérií z Leedsu ¹⁰ označována infekce, kdy je *P. aeruginosa* kultivačně pozitivní během 12 měsíců ve více než 50 % testovaných vzorků. Pokud je kultivační pozitivita bakterií *P. aeruginosa* v ≤ 50 % testovaných vzorků, je infekce považována za intermitentní. V případě, že se kultivační pozitivita bakterií *P. aeruginosa* neobjevila i přes předchozí pozitivitu po dobu posledních 12 měsíců, nazýváme tuto infekci infekcí z minulosti ¹⁰. Prevalence infekce stoupá s věkem, kdy se u dětí jedná o 30 – 40 % a u dospělých jedinců až o 80 % chronicky infikovaných jedinců (USA) ¹¹. V pražském CF centru se jedná průměrně o 48 % infikovaných pacientů s CF.

Schopnost této bakterie působit jako oportunní patogen vyplývá z několika následujících faktů. *P. aeruginosa* má několik virulentních determinant, které jí pomáhají proniknout anatomickou bariérou. Po invazi dokáže produkovat další virulentní faktory, které jí pomáhají kolonizovat pacienta. Tento druh je známý svou rezistencí k velkému spektru antibiotik a dezinfekčních prostředků. *P. aeruginosa* má také schopnost produkovat exotoxin A (ETA) ¹².

Průběh infekce může být zpočátku asymptomatický, intermitentního charakteru, pokud však tato včasná infekce není léčena, *P. aeruginosa* začne masivně produkovat exopolysacharid alginát a vstupuje do mukoidní formy, která se často uvádí ve spojitosti s přechodem infekce do chronicity. V tomto případě je zodpovědná za zhoršování funkce plic, klinického stavu a prognózy pacientů ¹³. Během trvání infekce dochází k přeměně motilních bakterií na nemotilní ¹⁴, vysoce toxigenních na méně toxigenní ¹² a mimo jiné také ze sérum rezistentních na sérum sensitivní ^{15 16}.

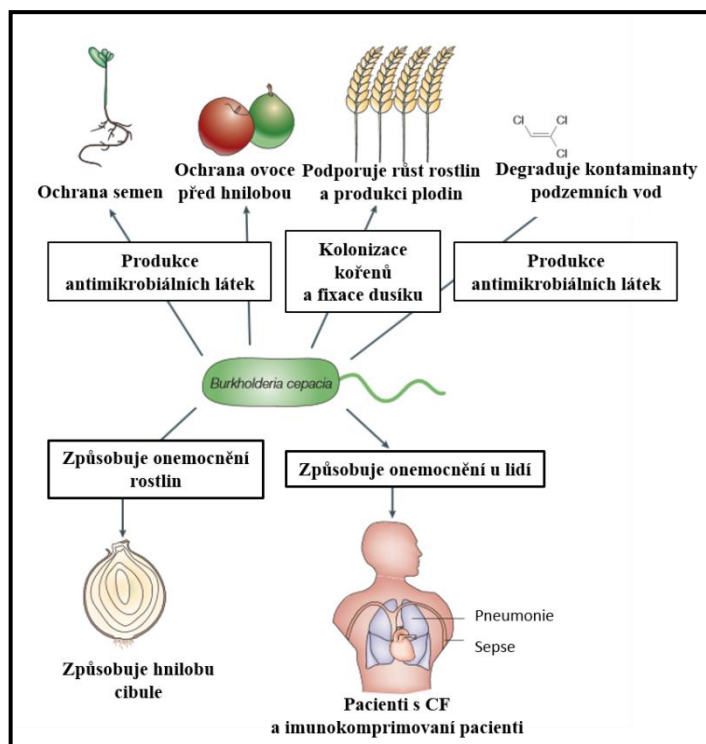
K většině infekcí dochází vystavením pacienta běžnému zdroji, ovšem u některých kmenů *P. aeruginosa* byla prokázána schopnost šířit se z pacienta na pacienta a způsobit tím epidemické rozšíření infekce. První zmínka o možnosti existence epidemického kmenu *P. aeruginosa* se datuje k roku 1986. Tento epidemický kmen byl identifikován na základě antibiogramu kmenů od dánských pacientů s CF ¹⁷. V polovině devadesátých let se v Liverpoolu objevil první důkaz o rozšíření kmene *P. aeruginosa*, podložený molekulární analýzou ¹⁸. Bylo potvrzeno, že 55 pacientů bylo infikováno stejným kmenem, označovaným jako liverpolský epidemický kmen (LES). V průběhu let se začaly objevovat další kmeny *P. aeruginosa*, které měly schopnost šířit se mezi pacienty. Mimo jiné do této skupiny patří epidemický kmen z Manchesteru (MES) ¹⁹, australský epidemický kmen (AES) ²⁰, nebo skupina rozsáhle se vyskytujících kmenů patřící do tzv. klonu C, identifikovaných jak u pacientů s CF z několika zemí, tak také ze vzorků půdy a vody ²¹.

Rezistence k antibiotikům patří mezi znak spojující všechny kmeny *P. aeruginosa*. Tato rezistence je jak přirozená, tak získaná. Rozvinutí rezistence na léky během infekce, je problém u pacientů s CF, kteří často trpí chronickými či vracejícími se infekcemi s opakovanou antibiotickou léčbou ¹⁶.

2. BAKTERIE KOMPLEXU *BURKHOLDERIA CEPACIA*

2.1. Charakteristika a taxonomie

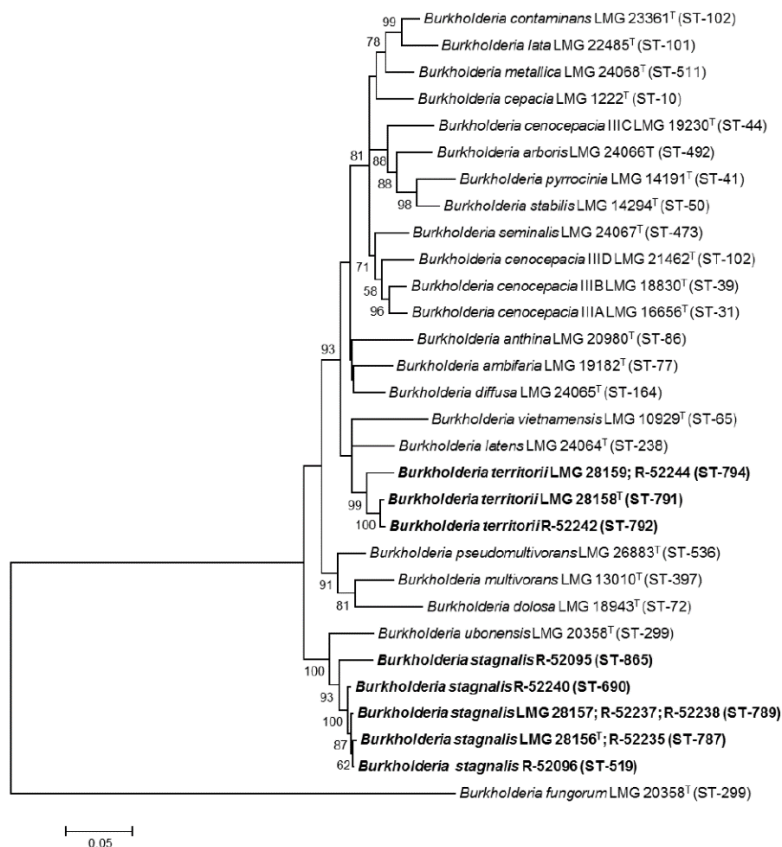
Burkholderia cepacia komplex (Bcc) patřící do rodu *Burkholderia* (rod *Burkholderia* zahrnuje >70 různých druhů) se skládá z úzce příbuzných bakteriálních druhů sdílejících vysokou hladinu podobnosti 16S rRNA genové sekvence (>97,5 %), vysokou hladinu podobnosti genové sekvence pro *recA* (94 – 95 %) a hladinu DNA-DNA hybridizace (30 – 50 %) ²². Jedná se o gram negativní pohyblivé aerobní tyčinky mající neobvykle velký genom (7.5 – 8.5 Mb), skládající se ze 3 chromozomů, případně u některých druhů i plazmidu. Genom je charakteristický vysokým obsahem CG bází (> 60 %) a obsahuje mnoho mobilních elementů, počínaje inzerčními sekvencemi až po početné genomické ostrovy. Přírodním rezervoárem bakterií z tohoto komplexu jsou nejrůznější přírodní niky. Nejčastěji se vyskytují v půdě, stojatých vodách ale i řekách. Detekovány však byly i v různých kosmetických přípravcích, inhalátorech, dezinfekčních roztocích či nepasterizovaném kravském mléku ²³. Mohou se chovat jako symbionty kořenového systému rostlin i jako rostlinný patogen způsobující hnilobu. Tvoří rostlinné hormony a množství antibiotik včetně látek s antifungálním efektem. Bakterie z tohoto komplexu jsou schopné metabolizovat organické odpadní látky (ftaláty, chlorované uhlovodíky) a těžké kovy (chrom, olovo, rtuť) ²⁴. V 90. letech minulého století se tyto schopnosti začaly využívat v průmyslovém odvětví a zemědělství (Obrázek č. 3). Ovšem prokázání patogenního potenciálu těchto bakterií (u pacientů s CF nebo chronickou granulomatózou) vyvolalo zákaz jejich používání ².



Obrázek č. 3. Prospěšné a škodlivé působení bakterií Bcc. Převzato a upraveno z publikace [5].

Poprvé byla tato bakterie (později zařazena a právě na počest svého objevitele pojmenována *Burkholderia*) izolována a popsána ve 40. letech minulého století Walterem Burkholderem jako agens způsobující hnilobu cibule²⁶. Tento nový druh dostal název *Pseudomonas cepacia* (*cepacia* = lat. cibule). V roce 1992 *Pseudomonas cepacia* a dalších 6 druhů, do té doby takzvaná rRNA pseudomonádová skupina II, byly přesunuty do nového rodu *Burkholderia*²⁷. Dva z těchto původních 7 druhů byly později překlasifikovány jako *Ralstonia* spp. V současné době je v rodu *Burkholderia* zařazeno více než 70 druhů.

Pro jednotlivé členy Bcc byla zavedená taxonomická jednotka genomvar odpovídající bakteriálnímu druhu charakterizovanému na základě molekulárně genetických metod. V současnosti do skupiny Bcc patří 20 bakteriálních druhů (v závorce dříve určované skupiny): *B. contaminans* (skupina K), *B. lata* (skupina K), *B. metallica* (BCC8), *B. cepacia* (genomvar I), *B. seminalis* (BCC7), *B. cenocepacia* (genomvar III), *B. arboris* (BCC3), *B. pyrrocinia* (genomvar IX), *B. stabilis* (genomvar IV), *B. ambifaria* (genomvar VII), *B. diffusa* (BCC2), *B. anthina* (genomvar VIII), *B. latens* (BCC1), *B. vietnamiensis* (genomvar V), *B. multivorans* (genomvar III), *B. dolosa* (genomvar VI), *B. pseudomultivorans*, *B. teritorii*, *B. stagnalis* a *B. ubonensis* (genomvar X) (Obrázek č. 4), které mohou být správně klasifikovány pouze užitím molekulárně genetických metod^{28 29}. Všechny tyto druhy, vyjma *B. ubonensis*, *B. teritorii* a *B. stagnalis*, byly izolovány i u pacientů s CF.



Obrázek č. 4. Fylogenetický strom *Bcc* sestavený na základě MLST analýzy (konkaténované sekvence alel použitých pro MLST), zahrnující všech 20 druhů. *B. fungorum* do komplexu bakterií *Bcc* nepatří, zařazena pro srovnání příbuznosti druhů v *Bcc*. Označení LMG/R + číslo za názvem bakterií představuje číselný kód daného izolátu zařazeného do mezinárodní referenční sbírky, označení ST představuje sekvenční typ daného izolátu určený pomocí metody MLST. Převzato a upraveno z publikace ²⁸.

2.2. Bcc u pacientů s cystickou fibrózou

Bakterie z *Bcc* mají neuvěřitelnou schopnost adaptovat se na rozsáhlé množství různých životních podmínek. V určitých situacích jsou schopné se adaptovat i na prostředí lidského těla, nejčastěji se jedná o dva typy genetických onemocnění - cystickou fibrózou a granulomatózní onemocnění (CGD). Infikováním bakterií z *Bcc* se může doba přežití pacienta snížit až o 12 - 25 let ³⁰. Většina pacientů infikovaných bakteriemi z *Bcc* se vykazuje chronickou infekcí se zhoršováním plicní funkce, nestabilitou a častými plicními exacerbacemi. V některých případech se u takto infikovaných pacientů může rozvinout klinický stav známý jako cepacia syndrom. Jedná se ve většině případů o smrtelnou rychle progredující komplikaci, která je charakterizována vysokou horečkou, akutní nekrotizující pneumonií a sepsí. Tento stav byl poprvé popsán v souvislosti s epidemickou linií ET12 viz kapitola 2.3. ³¹.

Pro detekci *Bcc* infekce u pacientů je často využívána metoda PCR pro gen *recA*, vykazující ve většině případů schopnost identifikace *Bcc* druhu. Dále je tento gen spolu s dalšími šesti geny

využíván v metodě MLST (multilocus sequence typing) pro identifikaci i klasifikaci bakterií z Bcc.

MLST je založeno na sekvenčním polymorfizmu 7 „housekeepingových“ genů (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* a *trpB*), kdy sekvenací získáme alelické profily genů, které dohromady určují sekvenční typ bakterie (ST) ³². MLST je nástupcem multilokusové enzymové elektroforézy (MLEE), rozděluje bakterie Bcc na elektroforetické typy (ET), které jsou v porovnání s metodou MLST nedostačující ³².

Přítomnost Bcc je metodou PCR možné určit i přímo z klinického materiálu, což je velmi přínosné, a to i pro pacienty s dosud negativními vzorky. Včasná detekce Bcc přináší větší úspěch v eradikační léčbě. Zároveň dochází k zařazení pacienta do odpovídající izolační skupiny, což má za následek lepší ochranu před infekcí ostatních pacientů. Během období 2001 – 2010 se v pražském CF centru vyskytlo 12 případů, kdy přítomnost Bcc byla určena mnohem dříve metodou PCR (při současné kultivační negativitě trvající od prvního záchytu PCR od 1 až do 22 měsíců) ³³. V současné době v pražském CF centru využíváme pro diagnostiku a monitoring epidemiologické situace Bcc infekcí kombinaci metod nested PCR pro gen *recA*, specifického PCR pro určení epidemického kmene ST32 (viz kapitola epidemické kmeny Bcc) s genotypizačními metodami RAPD (fingerprintová metoda genotypizace náhodné amplifikaci polymorfních úseků DNA) a MLST. Kombinace těchto metod zajišťuje rychlou a finančně nezatěžující kontrolu epidemické situace Bcc mezi pacienty ³⁴.

Rezistence bakterií Bcc k téměř všem známým antibiotikům velmi komplikuje léčbu jimi způsobených infekcí. Nejčastěji se vyskytující druhy u pacientů s CF jsou *B. cenocepacia* a *B. multivorans*. V České republice jsou detekovány navíc také *B. stabilis* a *B. contaminans* ³⁵.

2.2.1. *B. cenocepacia*

B. cenocepacia („nová *cepacia*“) je klinicky důležitý a vysoce přenosný druh, do kterého patří většina dosud popsaných epidemických kmenů Bcc (ET12, PHDC a český epidemický kmen ST32 viz níže). Velikost bakterie se pohybuje v rozsahu délky od 1,0 do 2,0 μm a šířky od 0,6 do 0,9 μm. *B. cenocepacia* je metabolicky velmi variabilní druh, většina funkcí, stejně jako například produkce pigmentu ³⁶ a antigenu typu O ³⁷ je kmenově specifická. Na základě fylogenetického klastru založeného na sekvenci genu *recA*, můžeme bakterie tohoto druhu rozdělit do 4 skupin IIIA – IIID. Skupina IIIA a IIIB reprezentuje klinicky nejzávažnější kmeny *B. cenocepacia* ³⁸. Infekce způsobené některými kmeny tohoto druhu jsou spojovány s daleko vážnějším průběhem a zkrácenou dobou přežití pacienta ^{24 39 40}. *B. cenocepacia* je také známá

schopností vytěsnit z plic ostatní druhy Bcc, pokud byly u pacienta před akvizicí *B. cenocepacia* přítomny⁴¹.

V roce 2001 bylo v pražském CF centru 194 pacientů, z nichž 56 (29 %) bylo Bcc pozitivní a 52 (93 % Bcc pozitivních pacientů) z těchto pozitivních pacientů neslo právě epidemický kmen ST32. V porovnání s rokem 2014, kdy v pražském CF centru bylo 330 pacientů, z nichž 40 (12 %) bylo potvrzeno jako Bcc pozitivních a 21 (53 % Bcc pozitivních pacientů) neslo epidemický kmen ST32. Tento pokles výskytu pacientů s epidemickým kmenem ST32 je výsledkem dobře postaveného protiepidemického opatření, ale bohužel i faktem, že ST32 kmen snižuje dobu přežívání pacienta a to právě i schopností způsobit cepacia syndrom.

2.3. Epidemické kmeny Bcc

Některé kmeny bakterií Bcc mají schopnost epidemického šíření z pacienta na pacienta, což pro pacienty s CF představuje velikou hrozbu⁴². Zdá se, že epidemické kmeny Bcc jsou mnohem virulentnější a způsobují mnohem závažnější infekce, než Bcc kmeny, které se mezi pacienty nešíří. Doposud byl popsán pouze jeden obecnější marker přenosnosti (BCESM- *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain marker), který se ovšem nevyskytuje u všech epidemických kmenů⁴³. Tudíž určení, zda se u nového kmene jedná o epidemický kmen či nikoli, je stále nejasné. Obecně je doporučováno s každou infekcí způsobenou novým kmenem zacházet jako s potenciálním epidemickým kmenem. Vlastní identifikace kmene velmi pomáhá při určování nebezpečí epidemie. Pokud je daný izolát identifikován například jako ST32, tak víme, že se jedná o vysoce přenosný kmen.

V 90. letech 20. století byl na základě MLEE detekován první epidemický kmen *B. cenocepacia* IIIA označovaný jako ET12 linie (elektroforetický typ 12). Tento kmen se epidemicky rozšířil v CF centrech v Kanadě a následně i ve Velké Británii^{44 45}. Pomocí metody MLST byly v rámci této linie odhaleny 4 sekvenční typy. Patří sem kmen ST28 (UK) a kmeny ST29, ST30 a ST31 (Kanada)⁴⁶. Reprezentativním vzorkem této linie se stal klinický izolát J2315, který byl také jako první *B. cenocepacia* v Sangerově institutu kompletně osekvenován⁴⁷.

Ze skupiny *B. cenocepacia* IIIB došlo na východě USA k epidemickému rozšíření kmene označovaného PHDC (označení izolátu AU1054)⁴⁸. Později byl tento kmen detekován u pacientů s CF i na území Evropy⁴⁹. Zanedlouho po detekci tohoto epidemického kmene PHDC byl v půdě nalezen kmen s naprosto stejným genetickým profilem.

Další epidemický kmen skupiny *B. cenocepacia* IIIB byl označen jako Midwest klon, který se rozšířil ve státech Michigan a Ontario⁵⁰. Mezi epidemické kmeny jiných druhů Bcc patří

například kmen ST16 patřící do skupiny *B. multivorans*⁴⁶, identifikovaný ve Francii⁵¹, či kmen ST71 (SLC6), patřící do skupiny *B. dolosa*, který způsobil lokální epidemii v Bostonu. Mezi epidemické kmene patří také ST96, *B. contaminans*, který byl izolován u pacientů s CF v Portugalsku⁵².

Pro nás nejdůležitějším se stal epidemický kmen ST32, patřící do skupiny *B. cenocepacia* IIIA. Tento kmen, blízce příbuzný epidemické linii ET12, původně nesl označení CZ1 a RAPD01, ale dodatečná analýza pomocí MLST potvrdila shodu mezi těmito izoláty a zařadila je do sekvenčního typu ST32. Pod označení RAPD01 byl zahrnut také kmen později určený jako ST33. Výskyt ST32 byl potvrzen celosvětově a to, mimo Českou republiku, také v Kanadě, Francii, Itálii, Belgii a Velké Británii³⁸. Kmen ST32 je linii ET12 podobný nejen z hlediska genetického, ale také klinickým průběhem infekce. Tyto kmene způsobují závažné chronické infekce, které ve většině případů přejdou až v obávaný cepacia syndrom.

V předchozí kapitole bylo již zmíněno, že v České republice se mezi pacienty s CF závažně rozšířil epidemický kmen ST32. V roce 2001 byl v pražském CF centru jeho výskyt potvrzen u 93 % pacientů infikovaných Bcc (52 z 56 pacientů), celkově se jednalo o 30 % infikovaných pacientů³³.

Byl zaveden protiepidemický program, který zahrnoval ukončení veškerých společenských akcí pro pacienty s CF. Dále pro pacienty nesoucí infekci Bcc byl zařízen speciální režim ambulance. Jak již bylo zmíněno, v laboratoři molekulární genetiky byly zavedeny nové laboratorní techniky, které umožnily rychlou a účinnou detekci přítomnosti Bcc, a později genotypizační metody k dourčení ST typu daného izolátu. V současné době bylo pro přímé a rychlé potvrzení kmene ST32 zavedeno již zmíněné specifické PCR³⁴.

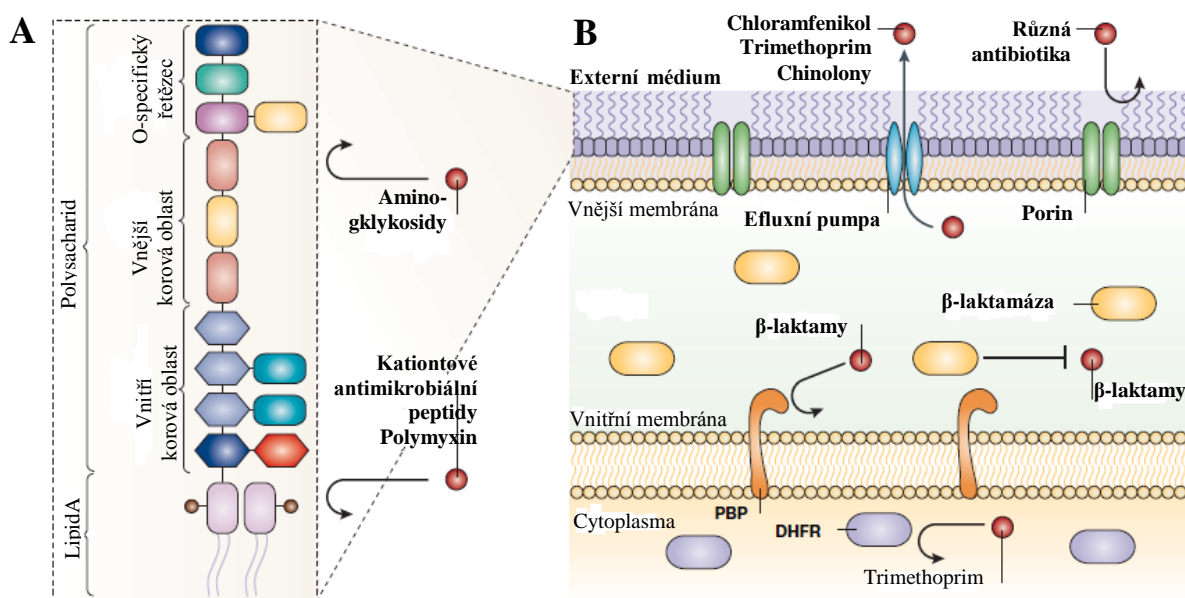
2.4. Faktory virulence

Bakterie z Bcc jsou známé produkcí velkého množství virulentních faktorů, které se podílejí na schopnosti těchto bakterií vyvolat infekci. U některých ještě stále není známa jejich přesná role v mechanismu patogeneze. Pro identifikaci faktorů virulence byly zvoleny například metody využívající náhodné mutagenese či celogenomová komparativní transkriptomika, pomocí které lze porovnat chování klinických *B. cenocepacia* izolátů a izolátů z prostředí, při kultivaci například v syntetickém sputu. Bezpočet faktorů virulence je v současné době podrobena hlubšímu studiu pomocí technik cílené mutagenese.

2.4.1. Popis nejčastěji studovaných faktorů virulence

Antimikrobiální rezistence

Kmeny Bcc jsou známé svojí přirozenou rezistencí k mnoha klinicky významným skupinám antibiotik (např. aminoglykosidy či polymyxiny). Pokud je infekce předmětem léčby, nezbyvá než použít kombinaci několika antibiotik dohromady⁵³. Je známo, že izoláty získané od pacienta prodávajícího plicní exacerbaci vykazují ve většině případů daleko větší rezistenci k antibiotikům než izoláty získané od chronicky infikovaných pacientů ve stabilním stavu⁵⁴. Příčina rezistence je považována za multifaktoriální, při které bakterie využívají změnu permeability buněčné stěny, změnu cílových míst pro léky, enzymatickou inaktivaci léků, či aktivní efluxní pumpy. Významnou roli mají také lipopolysacharidy, které ovlivňují rezistenci vůči antimikrobiálním peptidům (Obrázek č. 5)²⁴.



Obrázek č. 5. Struktura a mechanismus antibiotické rezistence u bakterií Bcc. Převzato a upraveno z publikace²⁴.

- Lipopolysacharidy (LPS) tvoří větvení vnější membrány gram-negativních bakterií a jsou zodpovědné za rezistenci k některým typům antibiotik. Lipid A obsahuje Ara4N (hnědá kolečka) a vnitřní korová oblast zahrnuje α -D-Ko (červený šestiúhelník) připojenou na 2-keto-3-deoxyacetát (tmavě modrý šestiúhelník), které se podílejí na rezistenci ke kationovým antimikrobiálním peptidům a polymyxinu. Rezistence k aminoglykosidům je přiřazena neschopnosti antibiotik tohoto typu navázat se na LPS.
- Mechanismy antibiotické rezistence můžeme najít ve všech částech bakterií Bcc. Ve vnější membráně se vyskytují efluxní pumpy, které aktivně odstraňují z buňky chloramfenikol, trimethoprim a chinolony. U některých Bcc bakterií byl také detekován enzym trimethoprim-rezistence dihydrofolát reduktáza (DHFR). Poriny ve vnější membráně také zabraňují některým antibiotikům vniknout do buňky. U Bcc bakterií existují dva odlišné mechanismy pro rezistenci k β -laktamům. Jedním z nich jsou periplazmatické β -laktamázy, které jsou schopné degradovat tyto antibiotika, druhým systémem jsou penicilin vázající proteiny (PBP), které jsou méně citlivé na jejich působení. A nakonec schopnost tvorby biofilmu zvyšuje rezistenci Bcc bakterií k ceftazidimu a ciprofloxacinu.

Quorum sensing

Quorum sensing je označované jako forma mezibakteriální komunikace regulující genovou expresi a to relativně k hustotě buněk (jak mezi jedním, tak mezi více druhy bakterií). Pro tuto komunikaci jsou užívané signální molekuly (u Bcc se jedná minimálně o tři typy signálních molekul), nejčastěji se vyskytuje *N*-acyl-homoserine-lacton (AHL), který je produkovaný syntázou a detekovaný transkripčním regulátorem. U epidemických kmenů *B. cenocepacia* můžeme pozorovat dva různé typy AHL zprostředkované quorum sensingem. První typ, který je složen z AHL - syntázy CepI a regulátoru CepR (geny BCAM1870 a BCAM1868), se vyskytuje u téměř všech kmenů *B. cenocepacia* ⁵⁵. Druhý typ je označovaný jako CciIR (geny BCAM0239A a BCAM0240), který je lokalizovaný v rámci *cenocepacia* genomického ostrova (*cci*) ⁵⁶. Nedávno objevenou signální molekulou, vyskytující se u všech Bcc druhů je *Burkholderia* difúzní signální faktor (BDSF) ⁵⁷. CepR a CcpiR se podílejí na reciproční regulaci mnoha genů, mezi které patří například geny pro motilitu, transport železa, syntézu různých exoenzymů i nematodiální protein Aida ⁵⁶.

Získávání železa

Železo patří mezi nezbytné složky pro bakteriální růst a další důležité biologické procesy se v hostitelském prostředí ve volném stavu nachází ve velmi omezeném množství. Extracelulární železo se vyskytuje při transportu navázané na transportní proteiny, jako například transferin či laktoferin, zatímco intracelulární železo se vyskytuje ve složitých komplexech. Mechanismus vstřebávání železa zahrnuje produkci ornibactinu (asociované geny *pvdA*, *orbA*, *orbF*) či pyochelinu (asociované geny *pchD*, *ftpA*), cepabactin a cepaciachelin ⁵⁸. Tyto siderofory mají schopnost vázat ionty železa a transportovat je zpátky do buňky pomocí specifického mechanismu, založeného na membránových receptorech ⁵⁹. Predominantním sideroforem produkovaným většinou kmenů *B. cenocepacia* se zdá být ornibactin. Syntéza a mechanismus působení ornibactinu a jeho regulace byla popsána u *B. cenocepacia* ⁶⁰. Tyto bakterie k získání železa také často využívají degradaci železo-vázajícího proteinu, feritinu ⁶¹. Bylo zjištěno, že u pacientů s CF je 100x vyšší koncentrace feritinu v bronchoalveolární laváži, než bylo pozorováno u zdravých jedinců ⁶². Právě proto se předpokládá, že feritin slouží pro bakterie jako hlavní zdroj železa.

Exoenzymy

Pomocí funkčních studií bylo zjištěno, že *B. cenocepacia* produkuje velké množství různých exoenzymů, které mohou hrát roli v interakcích mezi hostitelem a patogenem. Řadíme sem například fosfolipázu C, u které byla potvrzena spoluúčast na virulenci gram-pozitivních bakterií⁶³. Dalším exoenzymem je hemolytický protein, který je schopný u fagocytárních buněk spustit apoptózu a degranulaci⁶⁴. Mezi nejlépe prostudované exoenzymy produkované *B. cenocepacia* řadíme ZmpA a ZmpB, zinkové metaloproteázy, které jsou regulované quorum sensingem^{65 66}. Obě tyto proteázy mají schopnost degradovat kasein, gelatin, kolagen typu IV, proteázové inhibitory jako α_2 -mikroglobulin a α -1 proteinázový inhibitor a dále také mnoho různých antimikrobiálních peptidů^{66 67}. Oba enzymy přispívají k onemocnění plic, ZmpA navíc přispívá i k perzistenci bakterií v plicích⁶⁵.

Lipopolysacharid

Lipopolysacharid (LPS) je komplexní glykolipid, který je součástí vnější membrány gram negativních bakterií. LPS má velmi významnou roli v bakteriální patogenezi⁶⁸. O-antigen, který je součástí molekuly LPS, je velice důležitý pro rezistenci vůči séru³⁷. Zároveň také pomáhá předcházet jak vazbě bakterií na epiteliální buňky, tak makrofágy zprostředkované fagocytóze⁶⁹. Ovšem ne všechny kmeny *B. cenocepacia* mají schopnost syntézy O-antigenů. Například u epidemického kmene J2315 nebyla produkce O-antigenů prokázána, tudíž tento LPS není pro vlastní virulenci nezbytný³⁷. Nicméně bylo pozorováno, že vlastní ztráta O-antigenů také zajišťuje určité výhody spojené se zvýšenou virulencí. Díky této ztrátě jsou bakterie hůře rozpoznatelné imunitním systémem.

Rezistence k oxidativnímu stresu

B. cenocepacia je v případě respiračních infekcí přímo vystavena toxickým reaktivním formám kyslíku (ROS). Zatímco intracelulární bakterie jsou vystaveny ROS produkovanými fagocytujícími buňkami⁷⁰, extracelulární bakterie jsou vystaveny vysoce oxidačnímu prostředí, které se vyskytuje v plicích pacientů s CF a které je charakterizováno persistentní infiltrací neutrofilů a tím i prozánětlivou odpovědí. Můžeme najít několik systémů, kterými se *B. cenocepacia* snaží bránit poničení v důsledku ROS. Patří sem například přítomnost kataláz, peroxidáz a superoxid dismutázových aktivit⁷¹. U *B. cenocepacia* byly popsány dvě katalázy/peroxidázy s odlišnými funkcemi. KatB, které je přiřazena funkce hlavní katalázy/peroxidázy a KatA, která je popisována jako sekundární kataláza/peroxidáza. KatA

zajišťuje rezistenci k peroxidu vodíku v prostředí chudém na železo a v přítomnosti uhlíku metabolizovaného pouze Krebsovým cyklem ⁷². Dále sem patří periplazmatická superoxid dismutáza SodC, jež je nezbytná pro rezistenci k extracelulárnímu superoxidu ⁷³. Stejně působí také pigment podobný melaninu produkovaný *B. cenocepacia* genomovaru IIIA. Narušení genu *hppD*, který kóduje enzym nezbytný pro tvorbu pigmentu, vede ke vzniku kmene bez pigmentu. U tohoto kmene byla pozorována mnohem větší citlivost k extracelulárnímu peroxidu vodíku a superoxidu a také snížená schopnost přežití v makrofázích ⁷⁴.

Alternativní sigma faktory

Jako alternativní sigma faktory označujeme regulační proteiny, které aktivují transkripci určitých genových skupin. Aktivace probíhá navázáním těchto regulačních proteinů do oblasti promotoru a interakcí s RNA polymerázovým komplexem, čímž umožní započítí vlastní transkripce ⁷⁵. Alternativní sigma faktor RpoE zajišťuje schopnost *B. cenocepacia* růst při nevhodných podmínkách jako je vysoká osmolarita či teplota ⁷⁶. Alternativní sigma faktor RpoN je naproti tomu u *B. cenocepacia* potřebný pro motilitu a tvorbu biofilmu ⁷⁷.

Exopolysacharid

Exopolysacharidy jsou popisované jako větvené, opakující se polysacharidové podjednotky, které jsou bakteriemi sekretované do extracelulárního prostředí ⁷⁸. Syntéza exopolysacharidu probíhá nejčastěji ve spojení s infekcí pacientů s CF bakteriemi Bcc. Nicméně, nevyskytuje se běžně u všech kmenů, například J2315 a K56-2 produkují velmi málo až vůbec žádný exopolysacharid ⁷⁹. Produkce exopolysacharidu je velmi spojována s bakteriemi *P. aeruginosa* ⁸⁰. Přejít této bakterie do mukoidního fenotypu je klinicky velmi významná změna, která se vyskytuje v průběhu chronické infekce plic pacientů s CF a často bývá spojována se zhoršením klinického stavu pacienta ⁸¹.

Bičík

B. cenocepacia, vlastnící jeden nebo více bičíků, je řazena mezi pohyblivé bakterie. Bičík patří mezi významné faktory virulence, a to nejen díky své funkci pohybu, ale také díky své schopnosti proniknout do hostitelských buněk. Studium kmenů mutantních pro bičík prokázalo, že je nezbytný pro invazi, ale neovlivňuje adhezenci k respiračním epitelovým buňkám ⁸². V porovnání s divokým typem *B. cenocepacia* při infekcích myšího modelu, kmeny mutantní pro

bičiek nevyvolaly tak silnou imunitní odpověď. Zároveň zde bylo patrné viditelně lepší přežívání myši infikovaných kmeny mutantními pro bičiek⁸³.

Přes 40 genů pro tvorbu bičieků je u *B. cenocepacia* J2315 rozděleno do pěti klastrů na chromozomu 1 a dva dodatečné geny se nacházejí na chromozomech 2 a 3⁶³. Kultivace bakterií ve sputu zvýšila expresi genů pro bičiek a stejně tak i regulačního genu⁸⁴. Transkripce genů pro bičiek také spadá pod regulační systém quorum sensingu⁵⁶.

Biofilm

Jako biofilm je označováno mikrobiální společenství, jehož funkcí je chránit bakterie před antibiotiky a imunitním systémem hostitele⁸⁵. Bakterie Bcc se mohou v plicích pacientů s CF vyskytovat ve formě biofilmu⁸⁶. Předpokládá se, že mohou tvořit biofilm společně s bakteriemi *P. aeruginosa*. V této formě spolu pravděpodobně dokážou komunikovat využitím quorum sensingu^{87 88}. Bakterie spojované s tvorbou biofilmu mají schopnost degradovat svou vlastní glykokalyxovou bariéru, změnit aktinový cytoskelet nejbližších epiteliálních buněk a indukovat nekrózu u lamelových buněk⁸⁹. Tvorba biofilmu spadá pod regulační systém, který ovlivňuje aktivitu velkého množství genů⁹⁰. Do této skupiny patří například všechny tři skupiny quorum sensingu⁸⁸, alternativní sigma faktor RpoN⁷⁷, ShvR, LysR regulator⁹¹ a AtsR, který je znám svou rolí jako negativní regulátor několika virulentních faktorů⁹². Jako další faktory, které ovlivňují tvorbu biofilmu, jsou uváděny syntéza exopolysacharidu⁹³ či schopnost motility⁹⁴. Biofilm je také spojován se zvýšenou rezistencí bakterií k antibiotikům. Nicméně experimentální léčba zaměřená na narušení biofilmu kombinací antibiotik a inhibitorů quorum sensingu prokázala schopnost zabít *B. cenocepacia* formující biofilm (v porovnání s léčbou užitím antibiotik samotných)⁹⁵.

Sekreční systémy

Sekreční systémy jsou využívány mnoha patogeny k interakci s eukaryotickými hostitelskými buňkami. Jedná se o složitý systém, který pomáhá vpravit do hostitelských buněk efektorové molekuly. U gram negativních bakterií bylo popsáno celkem šest multigenových sekrečních systémů označovaných jako typ I – VI (Obrázek č. 6). Mezi tyto sekreční systémy se řadí jak jednokrokové tunely, tak dvoukrokové sekreční procesy⁹⁶. Sekreční systémy se částečně podílejí i při mezibuněčné signalizaci, a to jak při kooperaci, tak i při kompetici mezi buňkami.

Typ III

Sekreční systém typu III (T3SS) patří mezi kontakt-dependentní systémy, které se nacházejí u patogenních bakterií. Tento systém pomáhá doručit efektorové molekuly do cytosolu eukaryotických buněk. T3SS je homologní k flagelárnímu exportnímu systému. Skládá se z přibližně 30 různých proteinů, které tvoří základní tělo ukotvené v bakteriální membráně, dále z externí jehly, translokátoru (sestavujícího se ze dvou hydrofobních a jedné hydrofilní domény) a nakonec také z efektorových molekul a toxinů¹⁰⁰. Kromě translokace bakteriálních proteinů přímo do eukaryotické buňky má T3SS schopnost vyvolat u hostitelské buňky apoptózu.

Předpokládá se, že T3SS je zahrnut v první fázi tvorby biofilmu, kde zajišťuje vlastní přichycení bakterie k povrchu¹⁰¹. Proteomická studie buněk rostoucích v biofilmu prokázala, že nedostatek T3SS způsobuje změny v expresi proteinů zahrnutých v metabolických procesech, výrobě energie, produkci exopolysacharidu, motilitě bakterií a také vnějších membránových proteinů. Také produkce exopolysacharidu a motilita byly významně změněny u T3SS mutantních izolátů. Tyto změny byly pozorovány například u *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* O175, *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium a *Xanthomonas citri*¹⁰¹.

T3SS se pravděpodobně také významně podílí na vlastním přežívání bakterií v makrofázích. U *B. mallei* byl prokázán podíl T3SS na úniku z fagosomů. Izolát mutantní pro T3SS nedokázal na rozdíl od divokého kmene opustit fagosom a dál se množit v makrofázích¹⁰².

Stejně tak u bakterie *Shigella flexneri* byl prokázán velký význam T3SS (gen *ipaB*) nejen na útěk bakterií z fagosomů, ale také na vlastní invazi bakterií do buněk^{103 104}.

U *P. aeruginosa* PA103 byl T3SS také podroben hlubší studii. Bylo zjištěno, že toxin (ExoU) produkovaný T3SS patří mezi potencionální cytotoxiny, které mohou způsobit nekrotickou buněčnou smrt, pozorovanou u makrofágů a HeLa buněk¹⁰⁵.

Typ IV

Sekreční systém typu IV (T4SS) také patří mezi převážně kontakt dependentní a umožňuje transportovat substráty přímo do prokaryotických i eukaryotických buněk. Svou strukturou je velmi podobný bakteriálnímu konjugačnímu systému. T4SS je schopen přenášet do jiné buňky jak DNA, tak i proteinové substráty¹⁰⁶. Hlavní struktura T4SS se skládá z adhezinu na buněčném povrchu, pilu pro mezibuněčný kontakt, kanálu vedoucího skrz buněčný obal a spojovacího proteinu typu 4, který vede substrát do samotného kanálu.

Typ V

Sekreční systém typu V (T5SS) je označován jako nejjednodušší systém. Jeho mechanismus je dvoukrokový a slouží pro přenos větších proteinů. Rozložené proteiny jsou transportovány do periplazmatického prostoru pomocí Sec systému¹⁰⁷. T5SS se dělí na autotransportéry (zajišťující adhezi, agregaci, tvorbu biofilmu, invazi buněk a toxicitu) a dvousložkové sekreční systémy.

Typ VI

Sekreční systém typu VI (T6SS) patří mezi velké multigenové sekreční systémy, které doposud nebyly zcela popsány. Některé proteiny se zdají být homologní k bakteriofágovým proteinům. T6SS se podílí na doručení efektorových molekul kontakt dependentním mechanismem¹⁰⁸.

Genomické ostrovy

Genomy některých bakterií obsahují takzvané mobilní elementy, což jsou sekvence DNA, které byly fyzicky přeneseny buď v rámci jednoho, nebo více organismů. Mezi tyto mobilní elementy jsou řazeny i genomické ostrovy. Název genomické ostrovy se nyní používá obecně pro klastry genů (10 – 200kb), které jsou předávány horizontálním přenosem¹⁰⁹.

Genomické ostrovy jsou často spojovány s adaptací bakterií na nové prostředí či léčbu a mají velký dopad na jejich evoluci¹⁰⁹. Jedním z takových ostrovů je takzvaný ostrov patogenity, který byl poprvé identifikován u bakterií *E. coli*, a který je popisován jako podmnžina genomických ostrovů podílejících se na patogenitě dané bakterie. Dalšími popsányými typy ostrovů jsou mimo jiné ostrovy antimikrobiální rezistence a metabolické ostrovy.

Například genom *B. cenocepacia* J2315 (IIIA genomvar, klinický izolát) obsahuje čtrnáct genomických ostrovů, které zabírají přibližně 9,3 % celého genomu. Tyto genomické ostrovy nebyly nalezeny u IIIB genomvaru (izoláty z prostředí), což podporuje domněnku, že obsahují geny, které napomáhají adaptaci na prostředí plic pacientů s CF⁶³. Velká část genomických ostrovů patří mezi profágy, nebo mají fágový či plazmidový původ. Nejpodrobněji popsán genomický ostrov *B. cenocepacia* (*cci*) kóduje 43 CDS (kódující sekvence), zahrnujících široké spektrum genů nejrůznějších funkcí, jako například quorum sensing, odpověď na stres, geny pro antibiotickou rezistenci, nebo třeba transport iontů a aminokyselin. Genomický ostrov *cci* obsahuje také takzvaný marker epidemického kmene *B. cepacia* (BCESM), který je unikátní pro kmeny mající schopnost epidemického se šíření mezi pacienty¹¹⁰.

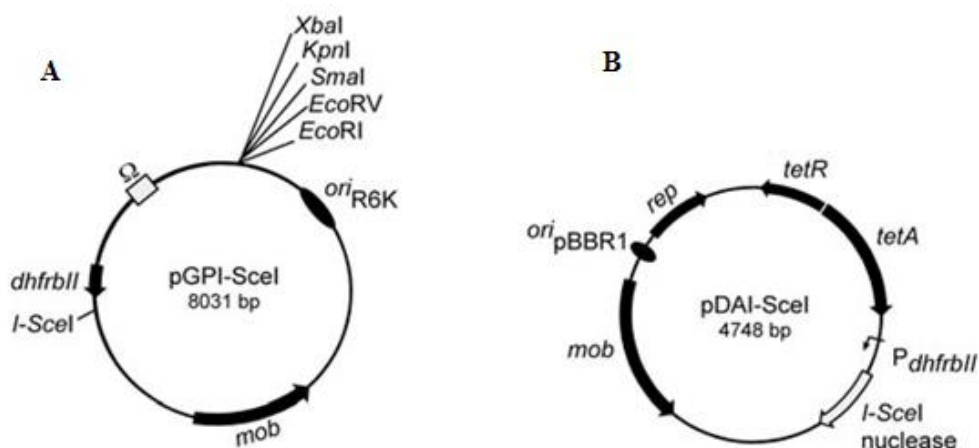
2.4.2. Vybrané metody studia faktorů virulence

Genetická manipulace s bakteriemi komplexu *B. cepacia*

Pro studium faktorů virulence je nejčastěji užíván postup, kdy dochází k deleci daného faktoru virulence a následnému studiu mutantního izolátu v porovnání s divokým typem. Pro tvorbu mutací bylo zavedeno několik postupů, které jsou ovšem limitovány selekčními markery, mezi které nejčastěji patří rezistence k trimetoprimu či tetracyklinu.

System založený na endonukleáze pGPI-SceI umožňuje nepolární deleci neoznačených genů u *B. cenocepacia*¹¹¹. Tento systém je založen na dvou plazmidech, sebevražedném plazmidu pGPI-SceI a replikačním, ale nestabilním plazmidu pDAI-SceI (Obrázek č. 7). Plazmidy jsou do bakterií vloženy postupně, a to pomocí metody „Triparental mating assay“.

Samotná delece probíhá následovně: do mutačního plazmidu pGPI-SceI jsou vklonovány dvě krátké (nejlépe 200bp) oblasti DNA, obklopující vybraný úsek pro deleci. Plazmid pGPI-SceI obsahuje ve své sekvenci unikátní oblast, která je rozpoznávána endonukleázou I-SceI. Tento plazmid je do genomu inkorporován pomocí homologní rekombinace. Následně je inkorporován druhý plazmid, pDAI-SceI, který má schopnost exprimovat I-SceI nukleázu. Působením této nukleázy dochází ke zlomu v obou řetězcích DNA plazmidu inkorporovaného do bakteriálního genomu. Pro přežití bakterie musí být tento zlom urychleně opraven. V průběhu opravného procesu může dojít ke dvěma typům rekombinace. V prvním případě dochází k rekombinaci v prvním regionu, což má za následek obnovení divokého typu chromozomu. V případě druhém dojde k rekombinaci v oblasti druhé homologní oblasti, která vede k vyštěpení celé oblasti chromozomální DNA mezi těmito homologními oblastmi¹¹¹. Tato delece musí být potvrzena polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), s použitím primerů na vnější oblasti vyštěpeného chromosomu, a následně také sekvenací. Druhý plazmid, exprimující I-SceI nukleázu také obsahuje *sacB* gen, díky kterému ho lze z chromosomu odstranit kultivací na agaru obsahujícím sacharózu¹¹². Použití tohoto systému skýtá velkou výhodu v tom, že v mutantním izolátu nezůstává žádná oblast s rezistencí k selekčnímu antibiotiku, tudíž lze vytvořit novou deleci pro vybranou oblast v již mutovaném izolátu.



Obrázek č. 7A, B. Mapy plazmidů pGPI-SceI (A) a pDAI-SceI (B). (A) Sebevražedný plazmid, který není schopen replikovat se bez Pir proteinu. Plazmid nese gen dhfrbII zajišťující rezistenci k trimethoprimu, rozeznávající místo pro I-SceI a mob oblast pro konjugaci. (B) Plazmid využitelný pro velkou škálu hostitelů. Nese gen kódující I-SceI nukleázu. Dále obsahuje oblasti zajišťující tetracyklinovou rezistenci a oblast mob pro usnadnění konjugace. Převzato a upraveno z publikace ¹¹¹.

Modelové systémy pro studium patogeneze bakterií komplexu *B. cepacia*

Pro studium patogeneze bakterií bylo vyvinuto mnoho různých *in vivo* a *in vitro* systémů. Je zde snaha nalézt jednodušší, rychlejší a ekonomičtější model, který bude snadno přístupný pro genetickou manipulaci ¹¹³. V současné době je využíváno několik různých druhů modelů zahrnujících jak rostliny, tak i zvířata a *in vitro* buněčné kultury, které poskytují vhodné prostředí pro studium nejen faktorů virulence, ale i odpovědi hostitele či průběhu léčby.

Infekce bakteriemi z Bcc může u pacientů s CF vyvolat tři různé typy průběhu. Patří sem asymptomatická kolonizace, chronická infekce s pomalým zhoršováním funkce plic a nejzávažnější typ infekce, který vede k bakteriémii a následné smrti. Poslední dva typy infekcí mohou být studovány na myším modelu. Chronická plicní infekce způsobená bakteriemi Bcc je studovaná například u potkanů ¹¹⁴.

Mezi jednodušší a finančně výhodnější modely pro studium bakterií Bcc patří modely: Danio pruhované (zebrička) *Danio reiro* ¹¹⁵, háďátko obecné *Caenorhabditis elegans* ¹¹⁶, octomilka obecná *Drosophila melanogaster* ¹¹⁷ a nakonec také larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* ¹¹⁸. Všechny tyto modely jsou vhodné pro všechny kmeny Bcc, ovšem bylo zjištěno, že ne vždycky se výsledky z jednotlivých modelů shodují ¹¹⁹.

C. elegans je velmi jednoduchý a geneticky velmi přístupný model. Výsledky ze studia bakteriální virulence se velmi často shodují s klinickými daty. *B. cenocepacia* má schopnost zabít *C. elegans* dvěma různými cestami. První je rychlá cesta, kdy bakterie produkují extracelulární toxin, který *C. elegans* paralyzuje a poté zabije během 24 hodin ¹¹⁶. Druhá cesta je

pomalejší, trvá 2 - 3 dny a závisí na typu bakterie. Čím víc je bakterie patogenní, tím rychlejší je zabití *C. elegans* ¹¹⁶.

Vrozený imunitní systém *D. melanogaster* je velmi podobný vrozenému imunitnímu systému u savců ¹²⁰. Další výhodou tohoto modelu je jeho známý, zcela osekvenovaný genom ¹²¹.

Pro studium virulence je velmi vhodný model *D. rerio*, a to v různých fázích jeho životního cyklu. Nejčastěji se užívá embryo (28 – 32 hodin po fertilizaci), jelikož u *D. rerio* je již v tomto stadiu vyvinutý vrozený imunitní systém, který je ekvivalentní k savčímu ¹¹⁵. Jeho velkou výhodou je možnost přímého sledování infekce v čase. Limitací je jeho citlivost na teplotu (stejně jako u modelu *D. melanogaster* a *C. elegans*), kdy teplota ideální pro růst bakterií je pro ně velmi nevhodná ¹¹⁵.

Také model *G. mellonella* vlastní vrozený imunitní systém. Tento model má velikou výhodu, jelikož dokáže přežít i ve 30°C, což je teplota vhodná pro růst bakterií. Nevýhodou je jeho doposud neznámý genom ¹¹⁷. Výsledky z tohoto modelu se shodují s výsledky z myšího modelu. Práce s *G. mellonella* je velmi jednoduchá a efektivní. Po 72 hodinách po infikování *G. mellonella* se odečítá počet živých a mrtvých larev, kdy mrtvé larvy zčernají v důsledku melanizace ¹¹⁸.

Studium *in vitro* na buněčných kulturách

Pro studium funkce virulentních faktorů či jiných bakteriálních genů se často využívají buněčné či tkáňové kultury. *In vitro* bylo pozorováno, že *B. cenocepacia* je schopna invaze, ale minimální či žádné replikace v respiračních buňkách a makrofázích ¹²². Právě respirační buňky a makrofágy se často využívají pro studium interakce mezi bakteriemi a hostitelskými buňkami ¹²³. Zatím není moc známo, zda invaze makrofágů *B. cenocepacia* probíhá aktivně a cíleně, či se jedná pouze o fagocytózu. Bakterie vyvinuly nejrůznější strategie pro intracelulární přežití ve fagocytárních buňkách.

Pohlčené bakterie přezívají v prostorných vakuolách, které bývají nazývány Bcc- obsahující vakuoly (BcCVs). U tohoto typu vakuol byla prokázána opožděná fúze s lyzozomy, což je pro přežití *B. cenocepacia* v makrofázích nezbytné ¹²². Opožděné dozrávání makrofágů umožňuje bakteriím aktivovat geny pro rezistenci vůči prostředí lyzozomů, která jim přináší další výhodu pro intracelulární přežívání ¹²³.

Mechanismus intracelulárního přežití bakterií Bcc ještě stále není zcela prozkoumán. Schopnost rychle reagovat na změny v prostředí pomocí regulace genové exprese často podléhají alternativním sigma faktorům ¹²⁴. Další výhodou pro intracelulární přežití je schopnost bakterií

Bcc předejít oxidačnímu poškození, jelikož v makrofázích jsou vystaveny procesu oxidačního spalování¹²⁵. Proti takovému typu poškození je potřebná produkce periplazmatické superoxid dismutázy⁷³ a melaninu podobnému pigmentu⁷⁴, které hrají velikou roli v protekci bakterií před tímto typem poničení. Na vlivu přežívání bakterií v hostitelských buňkách se podílejí i sekreční systémy (T3SS a T4SS).

2.5. Transkriptomové studie

Změna hladin transkripce patří mezi primární mechanismy iniciující vlastní adaptativní proces v buňkách. Ve spojení s translací vede k produkci nových proteinů, změnám v uspořádání membrán a mnoha dalším změnám v buněčném mechanismu¹²⁶.

Studium genové exprese můžeme rozdělit na dva hlavní způsoby, které mohou být použity jako komparativní metody pro porovnání relativního množství transkriptu v testovaném a kontrolním vzorku. První metoda je založená na hybridizaci použitím oligonukleotidových microarray čipů. Druhou, novější variantou je využití technik založených na sekvenování RNA nové generace (RNA-seq)¹²⁷.

Výsledkem každého transkriptomového experimentu je seznam genů se změněnou expresí, kdy zvýšená hladina mRNA určitého genu odpovídá zvýšenému množství (aktivitě) daného proteinu. Nicméně, tento přístup nepočítá s post-translačními úpravami a regulací, které mohou velmi ovlivnit stabilitu proteinu, jeho výskyt a funkci. Z tohoto důvodu se doporučuje kombinovat transkriptomový přístup společně s proteomickou studií, která vypovídá o tom, jaký vliv má daný transkriptom na výsledný proteom¹²⁸.

Pro vyhodnocení výsledků transkriptomových studií je nejčastěji využívána tzv. „fold change value“, která vypovídá o násobné změně exprese v porovnání ke kontrolní podmínce.

V případě transkriptomových experimentů existují velmi přísná pravidla ohledně statistické významnosti získaných výsledků. Pro shromáždění solidního množství dat jsou vždy požadovány minimálně tři biologické replikáty. Nicméně i tak nelze zaručit, že v rámci analýzy výsledků dojde k vyfiltrování všech falešně pozitivních výsledků. Z tohoto důvodu by mělo vždy dojít k potvrzení získaných výsledků další metodou, jako je např. qPCR¹²⁹.

2.5.1. Microarray metoda

Microarray metoda umožňuje vytvořit obraz genové exprese u velkého množství genů testovaného organismu v rámci jednoho experimentu. Studium transkriptomu nám umožňuje spojit si informace obsažené v DNA s vlastním fenotypem¹³⁰.

Základem této metody je set krátkých oligonukleotidových prób reprezentujících genomickou DNA daného organismu, kde lze využít i nekódující RNA a další intergenové oblasti, které nás zajímají. V případě microarray metody je nezbytná potřeba znalosti sekvence referenčního genomu, který slouží jako podklad pro navržení prób pro daný experiment. Ovšem pokud je dodržena více než 90% nukleotidová identita, mohou být pro stejný microarray design použity i blízce příbuzné kmeny ¹³¹. Próby jsou většinou natištěny na mikroskopická sklíčka, nebo v případě většího formátu na membrány ¹³².

Vlastní princip metody je v komplementární hybridizaci značené cDNA k próbám na čipu. Z toho důvodu musí být všechny navržené sekvence oligonukleotidů unikátní, aby nedocházelo k nežádoucí zkřížené hybridizaci ¹³³.

Extrahovaná RNA testovaného i referenčního vzorku se pomocí reverzní transkripce fluorescenčně značí buď Cy3, nebo Cy5 - dUTP. Vzorky jsou následně smíchány a za velmi přísných podmínek hybridizovány na microarray čip ¹³⁴.

Po naskenování čipů jsou výsledkem monochromatické obrázky, které jsou následně zpracovávány softwarem. Výsledná data jsou zobrazována jako normalizovaný poměr (Cy3/Cy5), ¹³⁴.

Pro design microarray experimentu existuje několik přístupů. Jedná se vždy o dva vzorky, které jsou značeny různými barvami a hybridizovány na jeden čip:

- Pokud se jedná o experiment, kde máme pouze dvě podmínky, můžeme porovnat transkriptom v rámci jednoho microarray čipu. V tomto případě se jedná o tři možnosti designu experimentu ¹³²:
 - Porovnání odpovědí organismu na dvě různé růstové podmínky
 - Porovnání vlivu možné terapeutické látky na organismus v porovnání s neléčenou kontrolou
 - Porovnání expresního profilu mutantního izolátu s původním divokým typem
- Jiným přístupem může být užití referenčního designu. U referenčního designu jsou dva různé vzorky, které chceme porovnat, značeny stejnou barvou a jsou hybridizovány na dva různé čipy spolu s referenčním vzorkem značeným jinou barvou. Tento typ designu je vhodný pro experimenty užívající více než dvě testované podmínky, jelikož umožňuje velké množství kombinací porovnávání transkriptomů za minimálního množství užití microarray čipů ¹²⁹.

Pro vyhodnocování se využívají statistické analýzy, které zahrnují možnost falešně pozitivních rozdílných expresí ¹³⁵. Pro potvrzení výsledků z microarray experimentu by vždy měla být použita další molekulární metoda, jako je například qPCR nebo Northern blot.

2.5.2. RNA sekvenování

Sekvenování nové generace se v posledních letech velmi rozšířilo nejen v rámci analýzy genomů, ale také v oblasti měření dynamického transkriptomu, a to metodou zvanou RNA-Seq¹³⁶. Tato metoda přináší několik výhod oproti microarray přístupu. Za prvé, v případě RNA sekvenování není potřeba znalost referenční sekvence, podle které by se navrhovaly proby. Díky tomu není nutné při vymýšlení designu experimentu brát ohled na větší rozdíly v genetické informaci, jelikož i tak můžeme expresi jednotlivých kmenů porovnávat¹³⁷. Další výhodou této metody je její větší preciznost v rámci mapování sekvence, na rozdíl od hybridizace na oligonukleotidy. Transkriptom je takto zkoumán s mnohem větším rozlišením a dovoluje nám studovat repetitivní oblasti genomu. Kvantifikace také není ovlivněna interferencí mezi geny v důsledku nespecifické hybridizace na cDNA proby¹³⁷. Během RNA sekvenování dochází k detekci množství dat, které se shodují s danou kódující sekvencí (CDS). Díky tomu má tato metoda mnohem větší dynamickou oblast pro určení variability expresních hladin.

Pomocí RNA sekvenování můžeme odhalit spoustu dalších důležitých informací, mezi které patří například dosud neanotované geny, nekódující RNA, různé druhy mutací, které pomocí microarray čipů nejsme schopni odhalit či naopak informace o nových genech.

Při extrakci RNA je nutné dávat pozor, aby nedošlo k ovlivnění transkriptomu. Zároveň je potřeba dosáhnout větší koncentrace získané RNA pro tvorbu knihovny než u microarray metody. Další nevýhodou oproti microarray metodě je snížená schopnost vyhoust se amplifikaci vysoce exprimovaných transkriptů, u kterých hrozí nebezpečí nechtěné saturace výsledného datasetu. Po extrakci RNA se doporučuje využít metodu pro odstranění ribosomální a transferové RNA pro zvýšení pokrytí mRNA při následném sekvenování¹³⁷.

Existuje mnoho platforem, které umožňují RNA sekvenování. Mezi nejznámější patří Illumina a SOLiD (Applied Biosystems). Všechny platformy vyžadují vytvoření cDNA knihovny, která je po naklonování každého fragmentu sekvenována. Zároveň nabízejí rozdílný kompromis mezi délkou čtení, která určuje, jaká část genomu bude unikátně mapována, a hloubkou pokrytí jednotlivých čtení, které určuje dynamickou oblast, podle které může být kvantifikována exprese daného genu¹³⁷.

Stejně jako při užití microarray čipů, výsledná data z RNA sekvenování by měla být potvrzena další molekulární metodou¹²⁹.

Tato metodika byla použita například v publikaci Yoder-Himes a spol.¹³⁸, kde autoři porovnávali dva kmeny *B. cenocepacia*, jeden kmen izolovaný z půdy a druhý kmen izolovaný od pacienta s CF. Pro experiment byla použita platforma Illumina, pomocí které sekvenovali cDNA knihovny. Cílem bylo definovat molekulární odpověď těchto dvou kmenů pod vlivem

podmínek přibližujících půdu a prostředí pacienta s CF. Během této studie došlo k identifikaci 13 dosud neznámých nekódujících malých RNA (sRNA). Významným zjištěním také bylo, že navzdory podobnosti genomu, tyto dva kmeny vykazovaly významné rozdíly v jejich regulačních odpovědích. Tyto změny by mohly vysvětlit jejich rozdílné patogenní schopnosti ¹³⁸. V nedávné publikaci se Andrea Sass a spol. snaží pomocí RNA sekvenování identifikovat exprimované geny v biofilmech tvořených bakteriemi *B. cenocepacia* a dále detekovat regulační elementy, které by mohly být zahrnuty v tvorbě biofilmu s cílem pro vyvinutí nových strategií pro léčbu *B. cenocepacia* infekcí. Díky mapování míst transkripčních počátků napříč *B. cenocepacia* genomu mohli přidat příslušné informace do anotace J2315. Zároveň objevili nové geny a nové regulační RNA, které jsou pravděpodobně zahrnuty v tvorbě biofilmu, což velmi přispěje k pochopení regulace tvorby biofilmu u *B. cenocepacia* ¹³⁹.

II. SPECIÁLNÍ ČÁST

3. STUDIUM ZMĚN GENOVÉ EXPRESE U BAKTERIÍ *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA* ST32 NA ZÁKLADĚ MICROARRAY ČIPŮ

Cíl: Charakterizace změn v genové expresi bakterií *Burkholderia cenocepacia* ST32 spojených s rozvojem závažného cepacia syndromu.

Hypotéza: Různá stadia infekce se vyznačují zvýšenou nebo sníženou expresí určitých bakteriálních genů. Největší rozdíl v expresi genů by měl být pozorován při porovnání izolátů ze stabilní fáze infekce s izoláty od pacienta ve fázi cepacia syndromu. Změny v expresi jsou očekávány jak u známých faktorů virulence, tak i u doposud nepopsaných genů.

Autorská publikace k tématu: Publikace č. 1

Jak již bylo popsáno výše, kmen *Burkholderia cenocepacia* ST32 způsobuje u pacientů s CF velmi závažné infekce. Jedná se o chronické infekce, které mohou vyústit až ve smrtelný cepacia syndrom. Každý rok jsou v pražském CF centru zaznamenány 1 – 2 případy úmrtí pacientů s CF z důvodu cepacia syndromu. Doposud není známá příčina přechodu chronické infekce do CS, a stejně tak není k dispozici žádný marker, který by v klinické praxi s předstihem upozorňoval na vysoké nebezpečí rozvoje CS.

Lze očekávat, že faktory zvyšující pravděpodobnost vzniku CS mohou být specifické jak pro hostitele, tak také pro patogen. V případě patogenů se může jednat o faktory spojené s regulací genové exprese faktorů virulence, které je poměrně snadné detekovat.

Během této studie jsme se zaměřili na porovnání exprese izolátů ze sputa od pacientů ve stabilní fázi infekce a krevního izolátu od pacientů s CS při kultivaci v různých podmínkách. Sekundárním cílem byla identifikace markeru se snahou odhalit marker, jehož sledováním bychom mohli s předstihem odhalit blížící se CS.

3.1. Metodika

3.1.1. Sběr klinického materiálu

U dospělých pacientů s CF je indikován průběžný sběr vzorků sputa a srážlivé krve. Před vlastním experimentem byl od pacientů získán informovaný souhlas pro odběr vzorků krve a sputa pro výzkumné účely. Sputum je ihned po odběru uloženo do -20°C . Srážlivá krev je uložena maximálně 4 dny při 4°C , než dojde k jejímu zpracování. Sérum následně uchováváme také při -20°C . Identifikace izolátů byla provedena pomocí kultivace na *B. cepacia* selektivním agaru (BCSA, Oxoid) a Bcc specifickým nested PCR jako součást rutinního mikrobiologického vyšetření. Využitím metod MLST a ST32 specifického PCR byly jednotlivé izoláty určeny až na úroveň kmene.

Během studie jsme použili 128 izolátů získaných ze sputa a 9 izolátů získaných z krve (Tabulka č. 1) od celkem 25 pacientů s CF, z nichž 8 zemřelo v důsledku cepacia syndromu.

Pro vlastní čipový experiment byly vybrány dva páry ST32 izolátu od dvou pacientů s CF. Prvním pacientem (A) byla žena, která po 16- ti leté Bcc infekci zemřela na cepacia syndrom. Druhým pacientem (B) byl muž, který také zemřel z důsledku cepacia syndromu po 12- ti leté Bcc infekci. Od každého pacienta jsme použili izolát získaný z krve v průběhu cepacia syndromu (izoláty A3 a B8 v Tabulce č. 1) a izolát ze sputa (izoláty A2 a B7 v Tabulce č. 1).

Pacient	Číslo izolátu								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	576	7272	7419						
	<i>sputum</i> 1/2002	<i>sputum</i> 1/2010	<i>krev</i> 3/2010						
B	1256	5994	6265	6914	7357	7802	8097	8210	
	<i>Sputum</i> 3/2003	<i>sputum</i> 10/2008	<i>sputum</i> 1/2009	<i>sputum</i> 10/2009	<i>sputum</i> 2/2010	<i>sputum</i> 7/2010	<i>sputum</i> 10/2010	<i>krev</i> 11/2010	
C	6183	7076	7337	8328	9594	9845			
	<i>sputum</i> 3/2002	<i>sputum</i> 1/2009	<i>sputum</i> 11/2009	<i>sputum</i> 2/2010	<i>sputum</i> 12/2011	<i>krev</i> 2/2012			
D	856	4209	4541	6206	6981	7339	7506	7507	
	<i>sputum</i> 1/2002	<i>sputum</i> 12/2006	<i>sputum</i> 04/2007	<i>Sputum</i> 1/2009	<i>sputum</i> 10/2009	<i>sputum</i> 2/2010	<i>krev</i> 4/2010	<i>krev</i> 4/2010	
E	573	9269	10074	11541	12261	12369			
	<i>sputum</i> 1/2004	<i>sputum</i> 9/2011	<i>sputum</i> 4/2012	<i>sputum</i> 4/2013	<i>sputum</i> 10/2013	<i>krev</i> 10/2013			
F	7040	8480	8540						
	<i>sputum</i> 11/2009	<i>sputum</i> 2/2011	<i>krev</i> 3/2011						
G	455	6918	7338	7888	8209				
	<i>sputum</i> 3/2002	<i>sputum</i> 10/2009	<i>sputum</i> 2/2010	<i>sputum</i> 8/2010	<i>krev</i> 11/2010				
H	3487	3633	4608	5267	6995	7574	8207	8208	8705
	<i>sputum</i> 3/2006	<i>sputum</i> 5/2006	<i>sputum</i> 5/2007	<i>sputum</i> 1/2008	<i>sputum</i> 10/2009	<i>sputum</i> 5/2010	<i>krev</i> 11/2010	<i>sputum</i> 12/2010	<i>sputum</i> 4/2011

Tabulka č. 1. Seznam vybraných izolátů od pacientů s cepacia syndromem. Izolát získaný ze sputa označen jako *sputum*, izolát získaný z krve v průběhu cepacia syndromu označen jako *krev*. U každého izolátu je také zaznamenáno jeho identifikační číslo a datum odběru. Převzato a upraveno z publikace ¹⁴⁰.

3.1.2. Kultivace bakterií

Pro transkriptomový experiment jsme vybrali dvě kultivační podmínky imitující prostředí *in vivo* a jednu kontrolní podmínku:

1. Pro imitaci *in vivo* prostředí jsme nejprve zvolili plnou krev. Ovšem tato podmínka se ukázala jako nevhodná, jelikož v průběhu experimentu došlo k inhibici fluorescenčního značení cDNA. Z toho důvodu jsme jako náhradu použili sérum od pacientů s CF. Získané sérum muselo být tepelně inaktivováno (30 min při 56°C) a to z toho důvodu, že *B. cenocepacia* ST32 patří mezi sérum senzitivní bakterie. Pro vlastní experiment byla použita směs tepelně inaktivovaných vzorků sér.
2. Jako druhou podmínku jsme zvolili 10% sputum (naředěno BSM – basal salts medium) od pacientů s CF jak již bylo popsáno⁸⁴. Pro vlastní kultivaci jednotlivých izolátů bylo vytvořené směsné sputum získané od několika pacientů ze všech fází infekce (stabilní fáze, exacerbace, cepacia syndrom).
3. Kontrolní podmínka se skládala z BSM spolu s casAA (směs aminokyselin naštěpených kaseinem) a 10% glycerolu.

Všechny izoláty byly v každé podmínce kultivovány v triplicátu (celkem 36 vzorků). Přes noc narostlá bakteriální kultura v LB médiu (Luria-Bertani, SigmaAldrich) byla naředěna na optickou denzitu OD 0,5 – 0,6. Do nové zkumavky bylo odebráno 5 ml naředěné kultury a stočeno, 8 min při 2 000 rpm. Peleta byla resuspendována v 5 ml daného média (10% sputum, tepelně inaktivované sérum, kontrolní podmínka BSM). Kultivace probíhala v inkubátoru, 270 min při 37°C a 200 rpm.

3.1.3. Extrakce a zpracování bakteriální RNA

Ihned po ukončení kultivace jsme jednotlivé vzorky zchladili ponořením do tekutého dusíku. Následovala extrakce bakteriální RNA pomocí kombinace kitů TRIzol (Ambion) a RipoPure-Bacteria kit (Ambion).

Začátek extrakce pomocí kitu TRIzol (Ambion):

- centrifugace, 5 min při 14500 rpm a 4°C, slít supernatant, zchladit v tekutém dusíku
- 1 ml TRIzol/peleta, vortexování, inkubace 5 min při pokojové teplotě
- 0,2 ml chloroformu/vzorek, 40 s třepání, 3 min inkubace při pokojové teplotě
- centrifugace 15 min, 12 000 rpm, 4°C
- vrchní fáze směsi odebraná do 500 µl vychlazeného 70% ethanolu, vortex

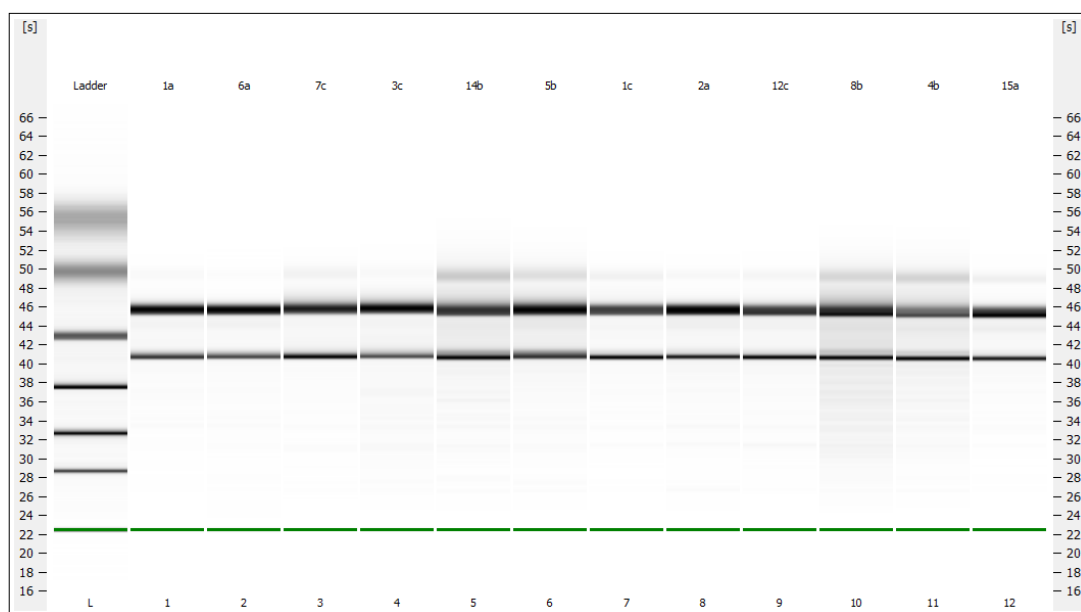
Pokračování extrakce pomocí RipoPure-Bacteria kit (Ambion):

- přenesení vzorku na kolonku, centrifugace 1 min 14 500 rpm a promytí dle manuálu od výrobce
- eluce RNA 2x 30 μ l přehřátého Elution buffer (95°C), centrifugace 1 min 14 500 rpm, přidat 11 μ l DNase I mixu (7 μ l DNase buffer, 4 μ l DNaseI), inkubace 60 min, 37°C
- 14 μ l DNase inactivation reagent, inkubace 2 min, pokojová teplota
- centrifugace 1 min 14 500 rpm, supernatant do nové zkumavky
- měření koncentrace na nanodropu, uskladnění extrahované RNA do -80°C

Pro zahuštění koncentrace RNA jsme použili 7,5M chlorid lithný (LiCl), (Ambion):

- zahuštění pomocí LiCl bylo provedeno dle manuálu od výrobce
- rozpuštění RNA v 16 μ l vody - Nuclease free water (Qiagen), změření koncentrace RNA na nanodropu

Po zahuštění jsme celkovou RNA přečistili podle pracovního manuálu pomocí MICROBEnrich kitu (Ambion). Kvalitu RNA jsme zkontrolovali využitím RNA nano čipů na Bioanalyzáru 2100 (Invitrogen), (Obrázek č. 8).



Obrázek č. 8. Obrázek gelu pro kontrolu kvality mRNA po extrakci a přečištění MICROBEnrich kitem. Kontrola byla provedena využitím nano RNA čipu a Bioanalyzáru 2100.

Přepis do cDNA a Cy5 značení jsme provedli pomocí kitu SuperScript Indirect cDNA labeling systém (Invitrogen), podle příloženého manuálu. Postup se skládá z několika kroků: cDNA syntézy (potřebné množství RNA je 5 - 20 μ g), hydrolizace a neutralizace vzorků následována

přečištěním cDNA. Přečištěnou cDNA jsme značili fluorescenční barvičkou Cy5 (GE Healthcare). Cy5 značenou cDNA jsme následně přečistili a její koncentraci a kvalitu značení (koncentrace Cy5 v pmol a absorbance) změřili na naodropu. Takto zpracované vzorky jsme uložili do -20°C, kde mohly být skladovány maximálně po dobu jednoho týdne.

3.1.4. Extrakce a zpracování bakteriální DNA (J2315)

Jako referenční DNA pro microarray čipy jsme zvolili genomovou DNA *B. cenocepacia* J2315. DNA byla extrahována metodou vysolování. Koncentrace DNA změřena na nanodropu a kvalita byla ověřena pomocí gelové elektroforézy.

Genomovou DNA jsme značili fluorescenční barvičkou Cy3 (GE Healthcare) pomocí kitu BioPrime® DNA Labeling System (Invitrogen) podle upraveného protokolu:

- reakce: 2 µg DNA doplnit do 21 µl Sigma ultra pure water, přidat 20 µl Random primers (BioPrime, Invitrogen)
- inkubace 5 min 100°C, 5 min na ledu
- na ledu přidat: 5 µl dNTP mix (1,2 mM dATP, 1,2 mM dGTP, 1,2 mM dTTP, 0,6 mM dCTP, 10 mM Tris, 1 mM EDTA), 3 µl Cy3 dCTP (GE Healthcare) a 1 µl Klenow enzym (BioPrime, Invitrogen)
- směs krátce stočit, inkubace přes noc, 37°C

Cy3 naznačenou genomovou DNA jsme přečistili pomocí kitu QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) podle doporučeného manuálu. Koncentraci a kvalitu naznačení DNA jsme změřili pomocí nanodropu. Cy3 značenou DNA jsme uložili do -20°C, po dobu maximálně 1 týdne.

3.1.5. Microarray čipy

Pro experiment jsme použili dvou-barevné custom 4x44K microarray čipy (ArrayExpress A-MEXP-1613, Agilent Technologies), navržené pro blízce příbuzný kmen *B. cenocepacia* J2315⁶³. Celkem bylo použito 36 čipů, 9 pro každý testovaný izolát (v triplicátu pro kultivaci ve třech různých podmínkách). Pro experiment jsme zvolili referenční design, kdy Cy3 barvičkou byla naznačena genomová J2315 DNA, použitá jako reference¹⁴¹ a Cy5 barvičkou cDNA testovaného izolátu.

Hybridizace vzorků na čip byla provedena dle manuálu Two-Color-Based Gene Expression Analysis (Agilent) s několika výjimkami, jak již bylo popsáno v publikaci⁸⁴. Vlastní hybridizace probíhala 17 hodin při 65°C s následným promytím čipů. Promytá a usušená microarray sklíčka jsme ihned skenovali na microarray skeneru (G2565 BA, Agilent) s využitím softwaru Scan

Control software verze A.7.0.3 Feb 2007 (Agilent). Skener byl nastaven na oblast 31 x 21,6 mm a rozlišení 5 µm. Rozšířená dynamická oblast byla nastavena na XDR Hi 100% a XDR Lo 10%. Následně byl každý čip skenován dvakrát, s vyšším a nižším rozlišením. Naskenované obrázky čipů byly zpracovány pomocí softwaru Feature Extraction software, verze 9.5.1. February 2007 (Agilent), za použití protokolu GE2_v5_95_Feb07.

3.1.6. Analýza výsledků

Celý proces experimentu a všechna získaná data použitá při analýze jsou uloženy na ArrayExpress E-MTAB-3133. K normalizaci dat z microarray čipů byl použit program R (www.R-project.org) s využitím funkce `read.maimages` z balíčku `limma`¹⁴². Pozadí dat bylo upraveno a normalizováno v rámci čipu pomocí `loess` a mezi čipy pomocí metody `Gquantile`. Následně byla normalizovaná data z červeného kanálu analyzována pomocí programu `GeneSpring GX v.12` (Agilent) jako jedno-barevná microarray data. Geny se statisticky významnou změnou v expresi byly vybrány na základě filtru více než dvojnásobné změny v expresi (2- fold change) a p hodnoty 0,05. Jako statistické metody jsme využili moderovaný *t* test a metodu zvanou „Benjamini Hochberg false-discovery rate“ (FDR),¹⁴⁰.

3.1.7. Real time PCR

Změny v genové expresi byly na základě výsledků z microarray experimentu testovány u celkem 18 vybraných genů u izolátů od 8 pacientů, kteří prodělali cepacia syndrom (Tabulka č. 1).

Izoláty byly kultivovány v kontrolním médiu (BSM) a RNA byla extrahována podle postupu popsaného výše.

Druhou částí experimentu byla kultivace a extrakce bakteriální RNA přímo z klinického materiálu, sputa. Sputum odebrané od pacienta jsme kultivovali přes noc při 37°C, 200 rpm. Následná extrakce RNA proběhla stejně jako v případě kultivace bakterií. RNA byla v obou případech přepsána do cDNA pomocí kitu `QuantiTect reverse transcription kit` (Qiagen). Koncentraci přepsané cDNA jsme změřili na nanodropu a následně naředili na 100 ng/ml.

Jako referenční gen jsme vybrali housekeepingový gen *recA*, a to díky jeho nezměněné expresi skrz všechny podmínky v rámci microarray experimentu. Všechny primery byly navrženy pomocí programu `Primer-Blast` (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Testované geny a na ně navržené primery jsou shrnuty v Příloze č. 1.

PCR reakce byla provedena v duplikátech o celkovém objemu 25 µl obsahujícím 2 µl cDNA, chemikálie byly použity z kitu `QuantiTect SYBR green PCR kit` (Qiagen): 2x `QuantiTect Sybr`

Green PCR, 0,3 μM primer F a 0,3 μM primer R. PCR program byl složen z počátečních 2 min při 50°C, dále počáteční denaturace 95°C, 15 min, následovalo 45 cyklů tvořených z denaturace při 94°C, 15 s; nasednutí primerů 55°C, 30 s; 72°C, 30 s.

Pro vyhodnocení relativního množství exprese jsme použili metodu $\Delta\Delta\text{Ct}$ ¹⁴³. Pro vyjádření relativní exprese v grafech jsme použili hodnoty $\log \Delta\text{Ct}$.

3.1.8. Elektronová mikroskopie

Pro elektronovou mikroskopii byly vybrány 2 izoláty ST32, které byly použity při microarray experimentu (A2 a A3, viz Tabulka č. 1). Izoláty byly kultivovány v BSM, podle postupu popsaného výše, viz Kultivace bakterií. Po uplynutí doby kultivace byly tepelně izolované izoláty převezeny na Státní zdravotní ústav, kde bylo provedeno vlastní zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii. Na parafilm byla aplikována kapka (10 - 20 μl) naředěné bakteriální kultury (ředění bylo provedeno 1:10 v BSM). Na tuto kapku byla pomocí pinzety položena formarová síťka, pouhlikovanou stranou dolů, která se nechala inkubovat přibližně 30 minut. Poté byla síťka opatrně osušena, pro promytí položena na kapku destilované vody (přibližně 30 s) a poté znovu opatrně osušena. Posledním krokem bylo kontrastování preparátu na kapce 1% uranyl acetátu po dobu 30 s. Vzorek se nechal důkladně usušit a následovalo prohlížení na elektronovém mikroskopu.

3.1.9. Funkční test pro měření schopnosti motility bakterií

Metoda měření motility bakterií vypovídá o funkčnosti bakteriálního bičíku. Celkem jsme otestovali 55 izolátů od 9 pacientů, kteří prodělali cepacia syndrom. Dále jsme otestovali izoláty od 16 kontrolních pacientů s chronickou infekcí *B. cenocepacia* ST32. Testování probíhá na speciálním 0,3% Bacto agaru (Sigma-Aldrich). Pěs noc narostlou kulturu v LB broth jsme naředili na OD_{600} 1. Inokulovali jsme 2 μl takto naředěné kultury propíchnutím agaru ve středu petriho misky, přibližně do poloviny jeho hloubky. Misky se nechaly inkubovat při 37°C až po dobu 120 hodin. Každý izolát byl vždy měřen v triplikátu. Schopnost motility daného izolátu byla určena měřením průměru narostlého kruhu. Pokles motility byl definován jako výskyt prvního nemotilního izolátu, či pokles motility o více než 40 mm v průběhu 12 měsíců měření

¹⁴⁰

3.2. Výsledky

3.2.1. Microarray experiment

Pro sledování změn v expresi u jednotlivých izolátů při různých podmínkách jsme zvolili metodu microarray čipů, která je u bakterií Bcc dobře zavedena ¹²⁹. Použili jsme čip určený pro sledování transkriptomu u J2315 (kmen velmi blízce příbuzný našemu testovanému epidemickému kmeni ST32). Kmen ST32 byl podroben genomovému sekvenování na akademii věd ČR (Michal Kolář a Hynek Strnad, IMG, nepublikovaná data) a podle předběžných výsledků se 6 755 prób obsažených na čipu shoduje se sekvencemi ST32 (5 436 odpovídá CDS a 1 049 odpovídá intergenovým oblastem ST32). Předpokládá se, že ST32 obsahuje celkem 7 150 CDS, z čehož vyplývá, že jsme schopni detekovat přibližně 76 % všech ST32 CDS ¹⁴⁰. Nicméně naše studie se zaměřuje převážně na sledování faktorů virulence, jejichž geny jsou ve většině případů společné pro ST32 a J2315, tudíž jsme schopni změny v jejich expresi na čipu detekovat.

Pro analýzu výsledků se nám vyskytly dva různé způsoby. První možností je porovnání exprese v rámci biologického zdroje izolátů (sputum/krev), druhou možností je analýza v rámci kultivační podmínky.

Analýza 1: Porovnání z hlediska zdroje izolátu

Nejprve jsme se zaměřili na pro nás nejvýznamnější možnost porovnání genové exprese, a to na porovnání z hlediska zdroje izolátu. Rozdíly v expresi izolátu ze sputa a izolátu z krve by nám mohly objasnit příčinu cepacia syndromu, případně přiblížit mechanismus, kterým dojde k jeho vzniku. Tabulka v Příloze č. 2 zobrazuje souhrn počtu genů se změnou exprese při různých kombinacích porovnávání izolátů z krve s izoláty ze sputa.

V rámci tohoto přístupu porovnávání jsme se nejvíce zaměřili na analýzu iv (viz Příloha č. 2), kdy se jedná o porovnání exprese dvou izolátů z krve, kultivovaných ve všech třech podmínkách se dvěma izoláty ze sputa, kultivovanými ve všech třech podmínkách. Tato analýza by nám měla odhalit pouze geny, kterými se krevní a sputové izoláty liší bez závislosti na vnějším kultivačním prostředí. Tyto geny by nám mohly poskytnout informaci, čím se izoláty z krve liší od izolátů ze sputa.

Získaly jsme celkem 60 genů, které se lišily svou expresí. Jejich seznam a funkce jsou shrnuty v Tabulce č. 2.

Název genu	Anotace nebo putativní funkce genu	Změna v expresi
TRANSPORT A METABOLISMUS KOVOVÝCH IONTŮ		
BCAM2233	Putative pyochelin biosynthetic protein, <i>pchC</i>	2.7 ↓
BCAM0810	Putative aromatic oxygenase	2.5 ↑
BCAM0811	Putative aromatic oxygenase	3.1 ↑
TRANSPORT A METABOLISMUS SACHARIDŮ		
BCAL2793	Major facilitator superfamily protein	3.5 ↓
BCAL2472	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, <i>otsA</i>	2.1 ↑
BCAM0783	Major facilitator superfamily protein	3.4 ↑
VÝVOJ BUNĚČNÉ MEMBRÁNY, MEMBRÁNOVÉ PROTEINY		
BCAM0081	Putative outer membrane protein - <i>ompW</i> rodina	2.4 ↓
BCAL1391	Cellulose biosynthesis protein	2.1 ↓
BCAL1395	Cellulose synthase catalytic subunit, <i>bscA</i>	2.9 ↓
BCAL1396	Cellulose synthase operon protein <i>yhjU</i>	2.2 ↓
BCAM0805	Muconate cycloisomerase I 1, <i>catB1</i>	2.9 ↑
BCAM1004	GDP-mannose 4,6-dehydratase, <i>gca</i>	2.6 ↑
BCAM1008	Glycosyltransferase	2.9 ↑
BCAM1010	Putative UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, <i>gtA</i>	3.5 ↑
TRANSPORT A METABOLISMUS LIPIDŮ		
BCAM0080	AMP-binding domain-containing protein	2.7 ↓
BCAM1005	Putative acyltransferase	3.2 ↑
PRODUKCE ENERGIE		
BCAL2795	Aldehyde dehydrogenase family protein	2.1 ↑
BCAL3184	Homogentisate 1,2-dioxygenase, <i>hmgA</i>	3.2 ↑
BCAL3187	FAD-dependent oxidoreductase	2.4 ↑
REGULAČNÍ PROTEINY		
BCAL0534	Two-component regulatory system, response regulator protein	2.1 ↓
BCAM2329	GntR family regulatory protein	2.0 ↓

BCAL3205a	Putative phage-related regulator	2.1 ↓
BCAM1290	RpiR-family transcriptional regulator	2.2 ↓
BCAM0835	AraC family regulatory protein	3.7 ↓
BCAM0784	LysR family regulatory protein	2.0 ↑

QUORUM SENSING

BCAM1870	N-acylhomoserine lactone synthase CepI	3.9 ↑
BCAM1871	hypothetical protein	4.5 ↑

SEKRECE

BCAM2041	Yop virulence translocation protein R	4.2 ↑
BCAM2042	Lytic transglycosylase	4.1 ↑
BCAM2043_J_0	Putative uncharacterised protein	2.4 ↑
BCAM2044	Asparagine synthetase	3.0 ↑
BCAM2046	Type III secretion protein <i>sciT</i>	2.6 ↑
BCAM2048	Type III secretion apparatus H ⁺ -transporting two-sector ATPase	4.9 ↑
BCAM2049	BcscL, type III secretion apparatus protein	4.9 ↑
BCAM2050	BcscK, Putative uncharacterised protein	7.3 ↑
BCAM2051	Type III secretion apparatus lipoprotein	3.8 ↑
BCAM2052	Uncharacterised protein	3.4 ↑
BCAM2053	Uncharacterised protein	6.9 ↑
BCAM2055	Type III secretion outer membrane pore	4.0 ↑

EXOPOLYSACHARIDY

BCAM0859	Capsular exopolysaccharide family	2.8 ↑
BCAM0860	Glycosyltransferaze	4.7 ↑
BCAM0861	Glycosyltransferaze - podobný protein	3.1 ↑
BCAM0863	Glycosyltransferaze	3.0 ↑
BCAM0864	Glycosyltransferaze	2.0 ↑
BCAM0856_J_0	Sugar transferase	2.1 ↑
BCAM0856_J_1	Sugar transferase	4.9 ↑

MOTILITA A ADHERENCE

BCAL1677	Type 1 fimbrial protein	3.4 ↓
BIOFILM		
BCAM0184	Fucose-binding lectin II., Photopexin A	3.3 ↑
OSTATNÍ PROTEINY		
BCAL2025	Hypothetical protein	2.0 ↓
BCAL2793	Major facilitator superfamily protein	3.5 ↓
BCAL3207	Hypothetical protein	2.5 ↓
BCAM0414	Hypothetical protein	2.3 ↓
BCAM2685	Hypothetical protein	2.6 ↓
BCAL3006	Cold shock-like protein	2.2 ↑
BCAL3186	Hypothetical protein	2.4 ↑

Tabulka č. 2. Seznam genů se změněnou expresí při porovnání všech krevních izolátů se sputovými izoláty. Názvy genů jsou ponechány v anglickém jazyce. Analýza iv podle Přílohy č. 2. Převzato a upraveno z publikace ¹⁴⁰.

Z genů, které změnilu svou expresi (Tabulka č. 2), nás nejvíce zaujala zvýšená exprese celého klastru genů pro sekreční systém typu III (T3SS, BCAM2041 – BCAM2055), kdy u některých genů byla tato exprese zvýšena až 7x v porovnání s izoláty ze sputa. Dále zde byla vidět změna v expresi u genů pro exopolysacharid (cepacian) a quorum sensing systém (*cepI*).

Při porovnání exprese krevního izolátu kultivovaného ve všech podmínkách s expresí izolátu ze sputa pouze v rámci pacienta A (A3 vs A2) jsme zaznamenali významnou změnu v expresi u více klastrů genů pro motilitu a chemotaxi, která byla u krevního izolátu významně snížena (Příloha č. 3a).

V Příloze č. 3b je seznam genů se změnou exprese pouze při porovnání izolátů od pacienta B (B8 vs B7). Na rozdíl od izolátů od pacienta A zde není viditelná snížená exprese u genů pro motilitu. Můžeme pozorovat sníženou expresi mimo jiné u několika regulačních proteinů. Znovu je zde potvrzena významně zvýšená exprese genů pro T3SS a exopolysacharidy.

Analýza 2: Porovnání z hlediska kultivační podmínky

Druhou možností pojetí analýzy dat je analýza s ohledem na kultivační podmínku, kdy jsme získali velké množství genů se změněnou expresí (Tabulka č. 3). Analýza proběhla jako porovnání daného izolátu/izolátů kultivovaných v jedné podmínce (sputum, sérum) vůči kultivaci v kontrolní podmínce (BSM). Izoláty získané ze sputa vykazují mnohem širší oblast genů se změněnou expresí v jednotlivých podmínkách než izoláty získané z krve a zároveň

kultivační podmínka „sérum“ vykazovala mnohem větší změnu v expresi genů než kultivační podmínka „sputum“. Výsledky této analýzy jsme se i přes významnou změnu v expresi u několika faktorů virulence hlouběji nezabývali.

	Počet genů se změnou exprese	up-regulované	down-regulované
(i) Růstová podmínka <u>Sputum</u>			
Izoláty získané z krve:			
- A3 a B8 izoláty dohromady	30	22	8
- A3 pouze	61	37	24
- B8 pouze	163	93	70
Izoláty získané ze sputa:			
- A2 a B7 izoláty dohromady	208	89	119
- A2 pouze	262	141	121
- B7 pouze	359	153	206
Izoláty získané z krve i ze sputa:			
- A3, B8, A2 and B7	157	70	87
(ii) Růstová podmínka <u>Sérum</u>			
Izoláty získané z krve:			
- A3 a B8 izoláty dohromady	169	90	79
- A3 pouze	67	33	34
- B8 pouze	304	137	167
Izoláty získané ze sputa:			
- A2 a B7 izoláty dohromady	374	177	197
- A2 pouze	488	200	288
- B7 pouze	381	186	195
Izoláty získané z krve i ze sputa:			
- A3, B8, A2 a B7	265	134	131

Tabulka č. 3. Souhrn počtu genů se změněnou expresí při analýzách microarray dat zaměřených na kultivační podmínku. Změny v expresi pozorované při inkubaci stejného izolátu/izolátů ve sputu nebo séru, v porovnání s kultivací v kontrolním médiu. Převzato a upraveno z publikace ¹⁴⁰.

3.2.2. Kvantitativní PCR u vybraných genů po kultivaci izolátů v BSM

Testování bylo provedeno na širším panelu izolátů od více pacientů, kteří prodělali cepacia syndrom, se snahou najít na základě transkriptomových analýz gen či skupinu genů, které by mohly být využity jako případný marker pro blížící se cepacia syndrom. Výsledky jsou rozděleny podle tří fází experimentu: Úvodního testování, Rozšířeného testování většího počtu genů a Hlubšího testování genů pro T3SS.

Kvantitativní PCR: Úvodní testování

V první fázi jsme se zaměřili na ověření výsledků získaných z microarray u pro nás nejzajímavějších skupin genů, mezi které patří T3SS (BCAM2048 a BCAM2050), geny pro tvorbu bakteriálního pouzdra (BCAM0859 a BCAM0860) a nakonec geny pro quorum sensing systém (BCAM1870 a BCAM1871). Vybrané geny vykazovaly v rámci transkriptomového experimentu významnou změnu v expresi. Expresi těchto genů jsme testovali u izolátů

od celkem 8 pacientů, kteří prodělali cepacia syndrom. Od každého pacienta jsme vzali jeden izolát z krve z období cepacia syndromu a jeden izolát ze sputa, z období přibližně jeden měsíc před cepacia syndromem. Pokud jsme při porovnání těchto dvou izolátů nedetekovali žádnou změnu v expresi, pokračovali jsme v testování staršího izolátu.

Výsledky z kvantitativního PCR jsou shrnuty v Tabulce č. 4. V případě genů pro T3SS, jsme zaznamenali vyšší expresi u krevního izolátu v porovnání se sputovým izolátem získaným přibližně jeden měsíc před cepacia syndromem hned u šesti pacientů. U zbývajících dvou pacientů (C a E) byla tato změna exprese potvrzena až u starších izolátů ze sputa (24 a 18 měsíců před vznikem CS). Obecně tedy můžeme tvrdit, že zvýšená exprese T3SS je spojena s krevním izolátem a mohla by být případně použita jako možný marker pro sledování stavu infekce u pacienta, byť předmětná změna je zjištělná až poměrně pozdě, resp. časově blízko cepacia syndromu. Vyšší exprese genů pro tvorbu bakteriálního pouzdra u krevních izolátů byla potvrzena u 7 z 8 testovaných pacientů, z toho u 3 pacientů šlo o potvrzení až u starších izolátů získaných ze sputa. Testované geny pro quorum sensing sice potvrdily výsledky získané z transkriptomového experimentu (pacient A a B), ale jinak zde nebyl patrný žádný vzor.

Pacient	Porovnání	T3SS		Tvorba pouzdra		QS	
		BCAM2048	BCAM2050	BCAM0859	BCAM0860	BCAM1870	BCAM1871
A	A3 x A2	↑9,8x	↑9,2x	↑30x	↑23,6x	↑19,7x	↑22,7x
B	B8 x B7	↑16,7x	↑20,3x	↑26,2x	↑22,12	↑9,1x	↑17,7x
C^a	C6 x C5	=	=	=	=	=	=
	C6 x C4	↑6x	↑6,9x	↑10,2x	↑6,9x	↑4,8x	↑11,5x
D	D8 x D6	↑9,3x	↑8,5x	↑7,1x	↑10,2x	↓12,1x	↓9,1x
E^a	E6 x E4	↑4x	=	=	=	=	=
	E6 x E3	↑9x	↑9x	↑12,1x	↑9x	↑3x	↑7,6x
F^a	F3 x F2	↑14,8x	↑15,1x	=	↑8,6x	↓30x	↓9,7x
	F3 x F1	↑14,8x	↑15,2x	=	=	↓3,2x	↓13,9x
G	G5 x G4	↑21,2x	↑22,4x	↑10,9x	↑11,2x	↑6x	↑8,3x
H^a	H8 x H9	↑20,8x	↑14,9x	↑13,7x	↑16,3x	↑22,4x	↑20x
	H8 x H6	↑16,6x	↑20,9x	↑12,7x	↑8,6x	↓12,1x	=
	H8 x H5	↑4,4x	↑3x	↑4,8x	↑3x	↓17,8x	↓15,1x
Microarray analýza	A3+B8 x A2+B7	↑4,9x	↑7,3x	↑2,8x	↑4,7x	↑3,9x	↑4,5x

Tabulka č. 4. Výsledky kvantitativního PCR při testování změny exprese (krevní versus sputový izolát) u 6 genů faktorů virulence. Šipka nahoru znázorňuje zvýšenou expresi genu u krevního izolátu, šipka dolů znázorňuje sníženou expresi u krevního izolátu. Znak „=” vyjadřuje stejnou expresi daného genu porovnávaných izolátů. Pro srovnání v posledním řádku jsou uvedeny výsledky získané v microarray experimentu. Převzato a upraveno z publikace¹⁴⁰.

^aPorovnání exprese krevního izolátu s dalším sputovým izolátem byla provedena vždy, když předcházející izolát (izolát časově bližší izolátu z cepacia syndromu) vykázal stejnou expresi s krevním izolátem.

Kvantitativní PCR: Rozšířené testování většího počtu genů

Ve druhé fázi testování jsme se zaměřili převážně na geny, které v průběhu transkriptomového experimentu změnilы svou expresi pouze v rámci jednoho pacienta (A3 vs A2 nebo B8 vs B7). Naším cílem bylo najít takový gen, který by měl ve většině případů porovnání izolátu z krve a izolátu ze sputa (získaného měsíc před vznikem CS) stejnou hladinu exprese. Takovéto pozorování by mohlo nasvědčovat tomu, že daný gen mění svou expresi dříve než 1 měsíc před vznikem cepacia syndromu, což by umožnilo dřívější detekci možnosti jeho rozvoje. V této fázi jsme otestovali celkem 12 genů u krevních a sputových izolátů od 7 pacientů. Pacient H byl z vyšetření vyřazen, jelikož u něj byl pozorován netypický průběh cepacia syndromu. Výsledky získané pomocí kvantitativního PCR jsou shrnuty v Tabulce č. 5.

Pacient	A	B	C	D	E	F	G	Microarray analýza
Porovnání	A3xA2	B8xB7	C6xC5	D8xD6	E6xE5	F3xF2	G5xG4	A3+B8 X A2+B7
BCAM0079 ^b	=	↓45,3x	↓137,2x	=	=	↓6x	=	↓13,3x
BCAM0081 ^b	=	↓3,5x	=	=	↑2048x	↓3x	=	↓4,8x
BCAM0184 ^b	↑256x	↑6,23x	=	NA	=	NA	NA	↑2,8x
BCAM0784 ^b	↑4x	↑29,4x	=	NA	NA	↓25,8x	NA	↑3,8x
BCAM0863 ^c	↑24,3x	=	↑5,3x	↑4x	=	↓19,3x	=	↑3x
BCAM2044 ^b	↑152x	↑5,3x	=	=	=	↑5x	↑5,7x	↑3,2x
BCAM2055 ^c	↑194x	↑45,3x	=	=	↑8x	=	↑7,5x	↑4,1x
BCAM2053 ^c	↑256x	↑29,9x	↑22,5x	=	↑5,7x	↑4x	↑4x	↑7,35x
BCAM2329 ^b	=	↓20,6x	=	↑5,7x	↓6,7x	↓20,4x	=	↓2,9x
BCAM2685 ^a	=	↑9x	↑5,3x	=	=	=	↓16x	↓5,3x
BCAL3283 ^b	=	=	=	↑4,5x	=	↓11,3x	=	↓4,65x
G4822 ^b	↓6,27x	↑9x	=	=	↓1530x	↓22,62x	↓252,5x	↑20,2x

Tabulka č. 5. Výsledky kvantitativního PCR další skupiny vybraných genů. Šipka nahoru znázorňuje zvýšenou expresi genu u krevního izolátu, šipka dolů znázorňuje sníženou expresi u krevního izolátu. Znak „=“ vyjadřuje stejnou expresi daného genu porovnávaných izolátů. NA je vyznačeno tam, kde exprese genu u jednoho/obou porovnávaných izolátů nebyla měřitelná.

^a Expresie změněna pouze při porovnání izolátu A3 versus A2

^b Expresie změněna pouze při porovnání izolátu B8 versus B7

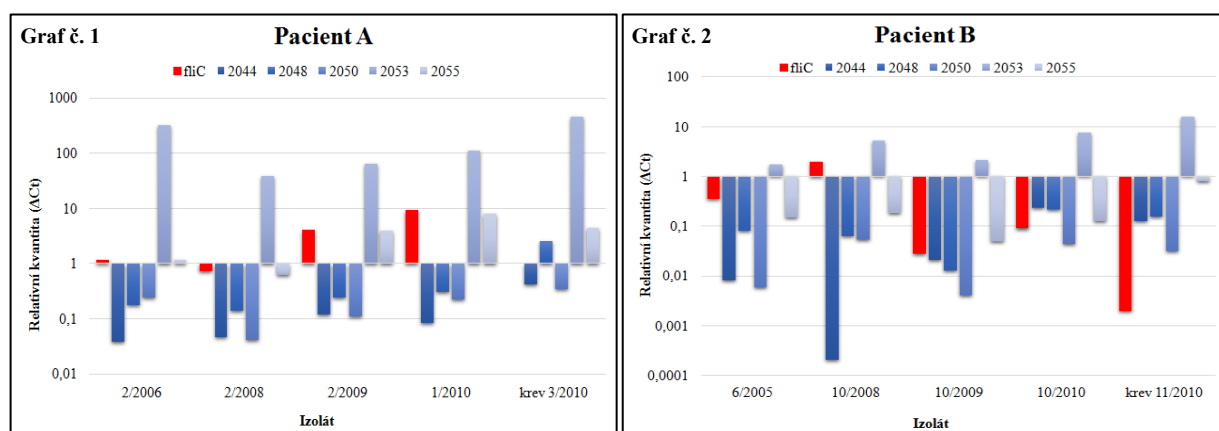
^c Expresie změněna v obou případech porovnání (A3 versus A2, B8 versus B7)

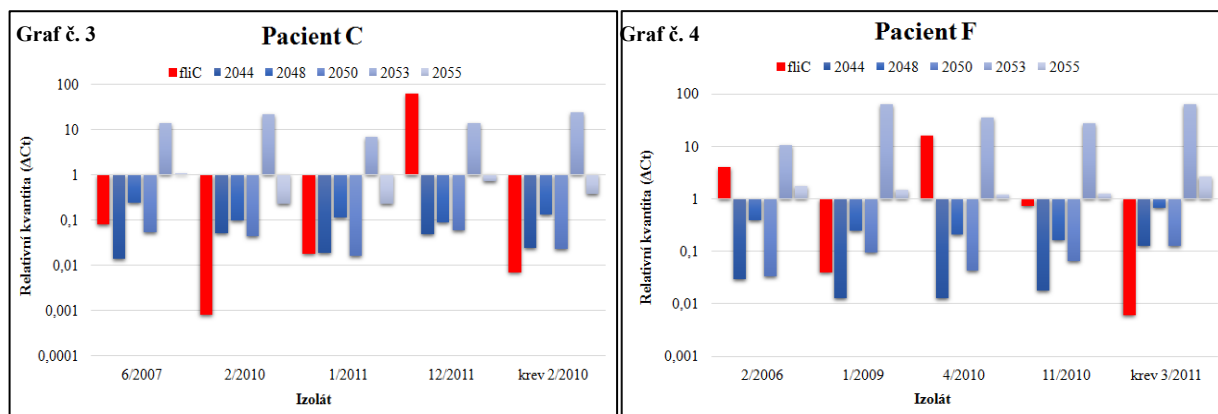
Z tabulky je patrné, že výsledky u jednotlivých genů byly mezi izoláty od jednotlivých pacientů velice rozkolísané. Naši hypotéze v menší míře odpovídala exprese u genů BCAM0079 a BCAM0184 (i když v tomto případě u izolátů od 3 pacientů nebyla možná detekce exprese). Dále do této skupiny můžeme zařadit geny BCAM2044, BCAM2050 a BCAM2053, které patří

do sekrečního systému typu III. Zbylé testované geny vykazovaly velmi nesourodé rozdíly v expresi při porovnání krevních a sputových izolátů od jednotlivých pacientů.

Kvantitativní PCR: Hlubší testování genů pro T3SS

Na základě výsledků z prvních dvou fází kvantitativního PCR jsme se rozhodli pro poslední fázi testování vybrat geny z klastru pro sekreční systém typu III. Expresí těchto genů vykazovala v obou případech testování spojitost s krevním izolátem a to bez ovlivnění vnějším prostředím (kultivační podmínkou). Zároveň jsme se zaměřili na sledování souvislosti mezi zvýšenou expresí genů pro T3SS a sníženou expresí genů pro tvorbu bičíku. Testovali jsme změnu v expresi u celkem 5 genů z T3SS klastru (BCAM2044, BCAM2048, BCAM2050, BCAM2053 a BCAM2055) a genu *fliC* (BCAL0114) pro tvorbu bičíku. Pro tuto část jsme si vybrali 4 pacienty s podobným časovým harmonogramem získaných izolátů (Pacient A, B, C a F), kteří prodělali cepacia syndrom. Od každého pacienta jsme otestovali 5 izolátů v časové linii (čtyři sputové izoláty získané před rozvojem cepacia syndromu a krevní izolát z cepacia syndromu). Změna v expresi T3SS a *fliC* mezi jednotlivými izoláty je znázorněna v grafech (Graf č. 1 - 4). Můžeme pozorovat pomalu vzrůstající expresi některých genů T3SS s blížícím se cepacia syndromem (zejména u genů BCAM2053 a BCAM2055), která je provázána se současnou klesající expresí genu pro tvorbu bičíku. Nicméně u pacienta C je viditelné zvýšení exprese genu *fliC* ještě před rozvojem cepacia syndromu (izolát 12/2011). Tento jev může být způsoben tím, že od pacienta byl odebrán mimo jiné motilní izolát, který v prostředí upřednostňující motilní bakterie přerostl masu nemotilních izolátů. U izolátů získaných z krve byla naměřena zvýšená exprese vždy alespoň u dvou genů pro T3SS v porovnání s expresí těchto genů u izolátů ze sputa.





Graf č. 1-4. Relativní kvantita exprese genů pro T3SS (BCAM2044, BCAM2048, BCAM2050, BCAM2053 a BCAM2055) a genu *fliC* (BCAL0114) pro tvorbu bičíku u vždy pěti ST32 izolátů od 4 pacientů s CF. Jedná se o izoláty získané ze sputa, poslední izolát označený „krev“ je izolát získaný z krve v období CS.

U pacienta F je změna exprese genů pro T3SS patrná až při porovnání krevního izolátu s předcházejícím izolátem získaným ze sputa. Tento jev může být způsoben tím, že se jedná o časový rozdíl 4 měsíce mezi těmito izoláty, kdy u ostatních pacientů A, B a C se jednalo pouze o rozdíl mezi získáním posledního sputového izolátu před získáním krevního izolátu 1-2 měsíce před cepacia syndromem.

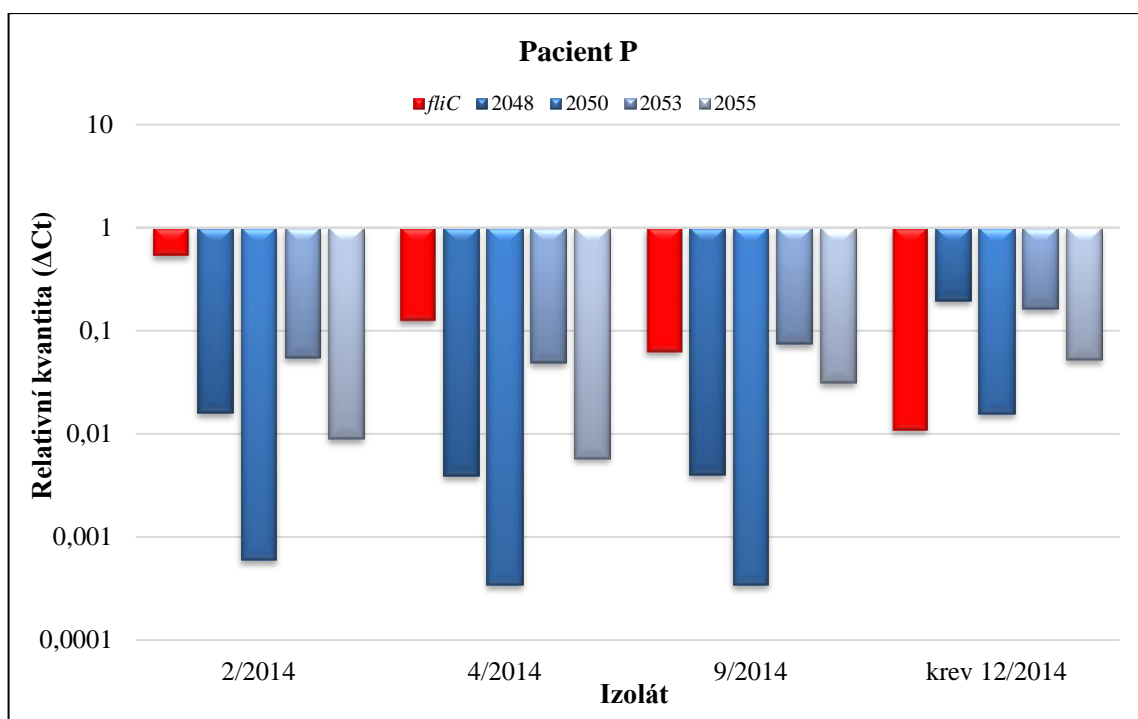
3.2.3. Kvantitativní PCR přímo z klinického materiálu

Pro zjednodušení a zkvalitnění detekce změny exprese daných genů jsme se rozhodli převést tuto metodu na sledování exprese genů bakterií kmene ST32 po extrakci RNA přímo z klinického materiálu (sputum). Sputa odebraná od pacientů jsou ihned uložena do -20°C . Pro sledování změn v expresi jsou daná sputa kultivována 24 h, při 37°C . Následně probíhá extrakce RNA, její prepis do cDNA a kvantitativní PCR jak je popsáno výše v metodice. V průběhu experimentu jsme zjistili, že nemůžeme použít sputum starší než 1 rok. Bakterie vyskytující se ve sputu pravděpodobně nepřežijí dlouhodobější skladování v -20°C . U starších vzorků, i přes pokus o prodloužený čas kultivace, jsme nebyli schopni extrahovat dostatečné množství RNA ke kvalitnímu provedení kvantitativního PCR.

V rámci pilotní studie jsme se rozhodli otestovat kompletní řadu sput získaných od pacienta P. Jedná se o pacienta, který byl původně v rámci přípravy publikace zařazen mezi pacienty pro kontrolní sledování (viz příloha č. 5a). Ovšem v průběhu sledování se u něj rozvinul cepacia syndrom, kterému v prosinci roku 2014 podlehl. K testování jsme vybrali sputum z období cepacia syndromu (CS sputum), dále sputum získané 3, 8 a 10 měsíců před vznikem cepacia syndromu. U těchto sput jsme otestovali expresi u 13 vybraných genů pro ověření, zda přístup přímé kultivace může být použit pro případné klinické vyšetřování. Výsledky získané z kvantitativního PCR jsou shrnuty v Příloze č. 4. V Grafu č. 5 je zobrazena exprese 4 vybraných

genů z T3SS (BCAM2048, BCAM2050, BCAM2053 a BCAM2055) a genu *fliC* (BCAL0114) pro tvorbu bičíku. Z grafu je patrné, že u genů pro T3SS systém opět platí, že s blížícím se cepacia syndromem se zvyšuje jejich exprese, v porovnání s genem *fliC*, kde jeho exprese v čase směrem k CS klesala.

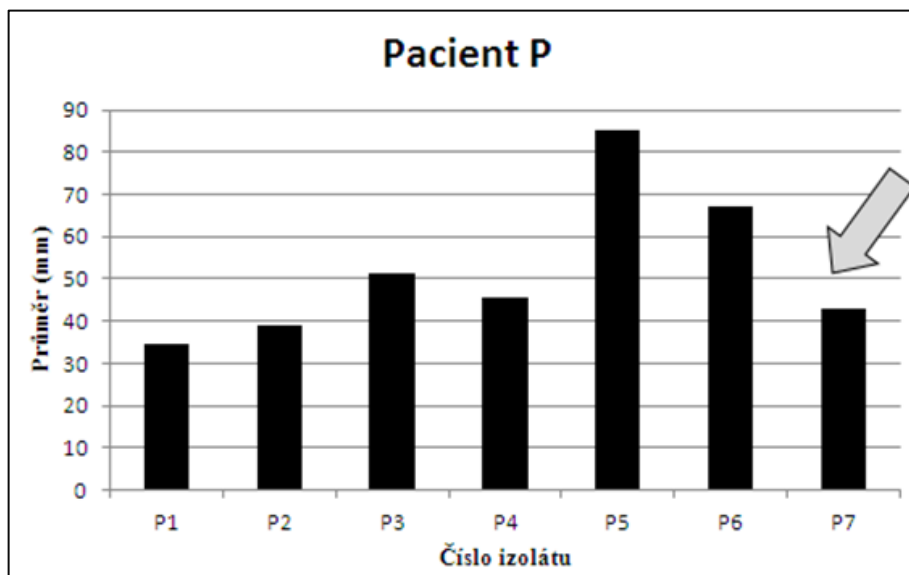
Zhodnotili jsme, že je možné zavést detekci exprese daného genu přímo z klinického materiálu (sputum) bez potřeby *in vitro* kultivace izolátů v kontrolním médiu. Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli pro testování exprese genů BCAM2053, BCAM2055 a BCAL0114, které vykazovaly největší rozdíly exprese v období těsně předcházejícím cepacia syndromu. V současné době probíhá pilotní prospektivní studie s detekcí exprese těchto genů u 6 žijících pacientů s CF, kteří mají chronickou infekci ST32 a dosud neprodělali CS.



Graf č. 5. Relativní kvantita exprese genů pro T3SS (BCAM2048, BCAM2050, BCAM2053 a BCAM2055) a genu *fliC* (BCAL0114) pro tvorbu bičíku při přímé extrakci bakteriální RNA z klinického materiálu (sputum) od pacienta P. Poslední sputum, označené „krev“ bylo získáno od pacienta v době CS.

Zároveň s měřením exprese vybraných genů po izolaci RNA přímo z klinického materiálu také probíhalo sledování motility izolátů získaných od pacienta P pomocí funkčního testu (výsledky sledování motility u izolátů od ostatních pacientů viz dále, kapitola 3.2.5.). Testované izoláty od pacienta P jsou shrnuty v tabulce v Příloze 5a (jak již bylo zmíněno výše, byl tento pacient zařazen při přípravě publikace do kontrolní skupiny pro sledování motility, během tohoto sledování se u něj rozvinul cepacia syndrom, kterému nakonec podlehl). Výsledné měření je zaznamenáno v Grafu č. 6. S blížícím se cepacia syndromem je zde viditelná klesající schopnost

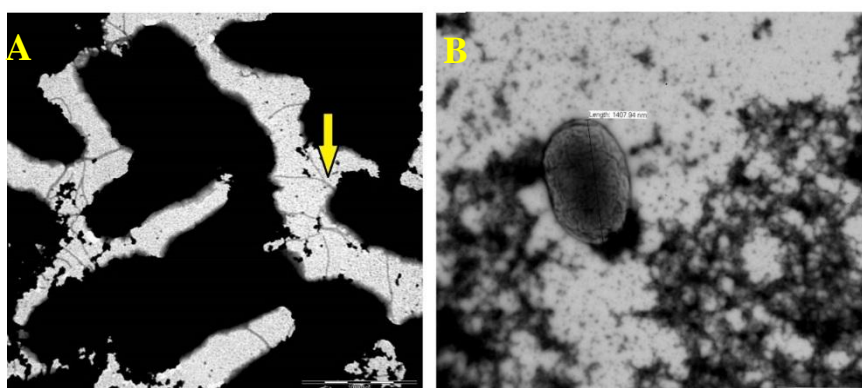
motility. Bohužel u tohoto pacienta se nám nepodařilo získat izolát z krve v době cepacia syndromu, a tedy potvrdit zde předpoklad úplné ztráty pohyblivosti krevního izolátu. Izolát P7 je poslední izolát získaný od pacienta P, cca 1 měsíc před cepacia syndromem.



Graf č. 6. Přehled motility u izolátů od pacienta P, který prodělal cepacia syndrom. Šedou šipkou je označen izolát s významným poklesem motility. P7 je poslední izolát ze sputa získaný od pacienta (cca 1 měsíc před cepacia syndromem).

3.2.4. Elektronová mikroskopie

Při analýze výsledků z microarray experimentu jsme zjistili, že u sputového izolátu je významně zvýšená exprese hned několika klastrů genů pro bičík. Pro potvrzení tohoto nálezu jsme si vybrali elektronovou mikroskopii. Díky této metodě jsme potvrdili výskyt bičíku u izolátu ze sputa (izolát A2, Obrázek č. 9A), na rozdíl od izolátu z krve, u kterého jsme nenašly vůbec žádnou přítomnost bičíku (izolát A3, Obrázek č. 9B).

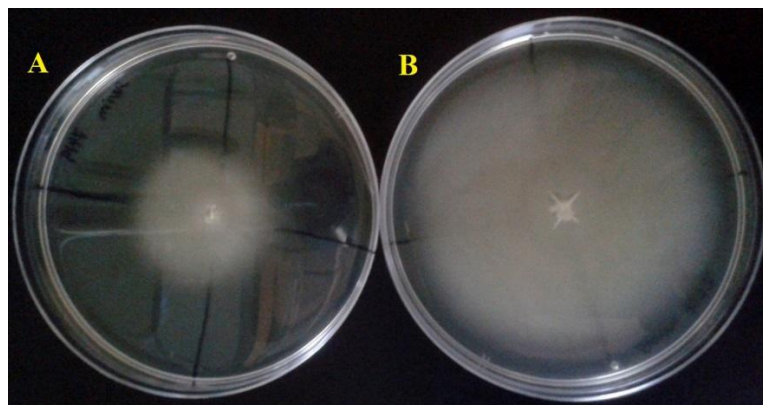


Obrázek č. 9A, B. Fotografie z elektronového mikroskopu, barvení 1% uranyl acetátem. A) Izolát získaný ze sputa A2, je zde viditelná přítomnost bičíku. B) Izolát získaný z krve A3, bičík nebyl přítomen.

3.2.5. Měření schopnosti motility bakterií

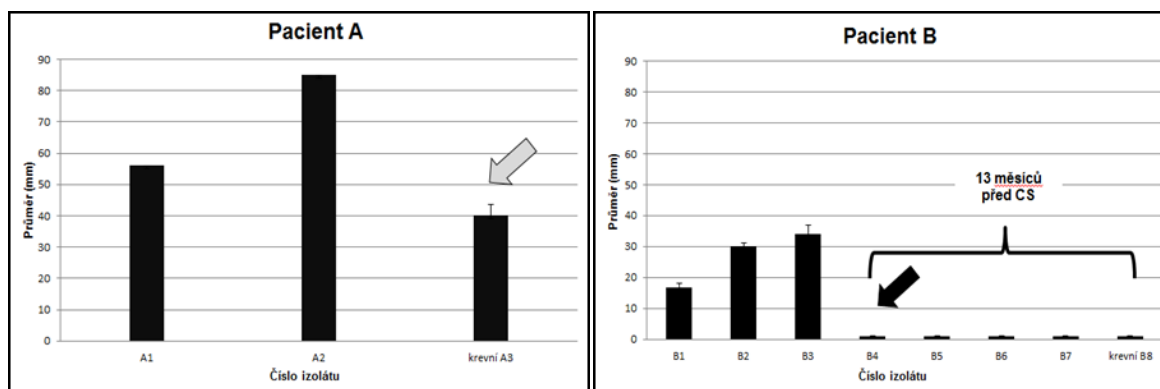
Přítomnost bičíku u izolátu ze sputa v porovnání s chybějícím bičíkem u izolátu z krve jsme se rozhodli ověřit i funkčním testem, měřením motility bakterií.

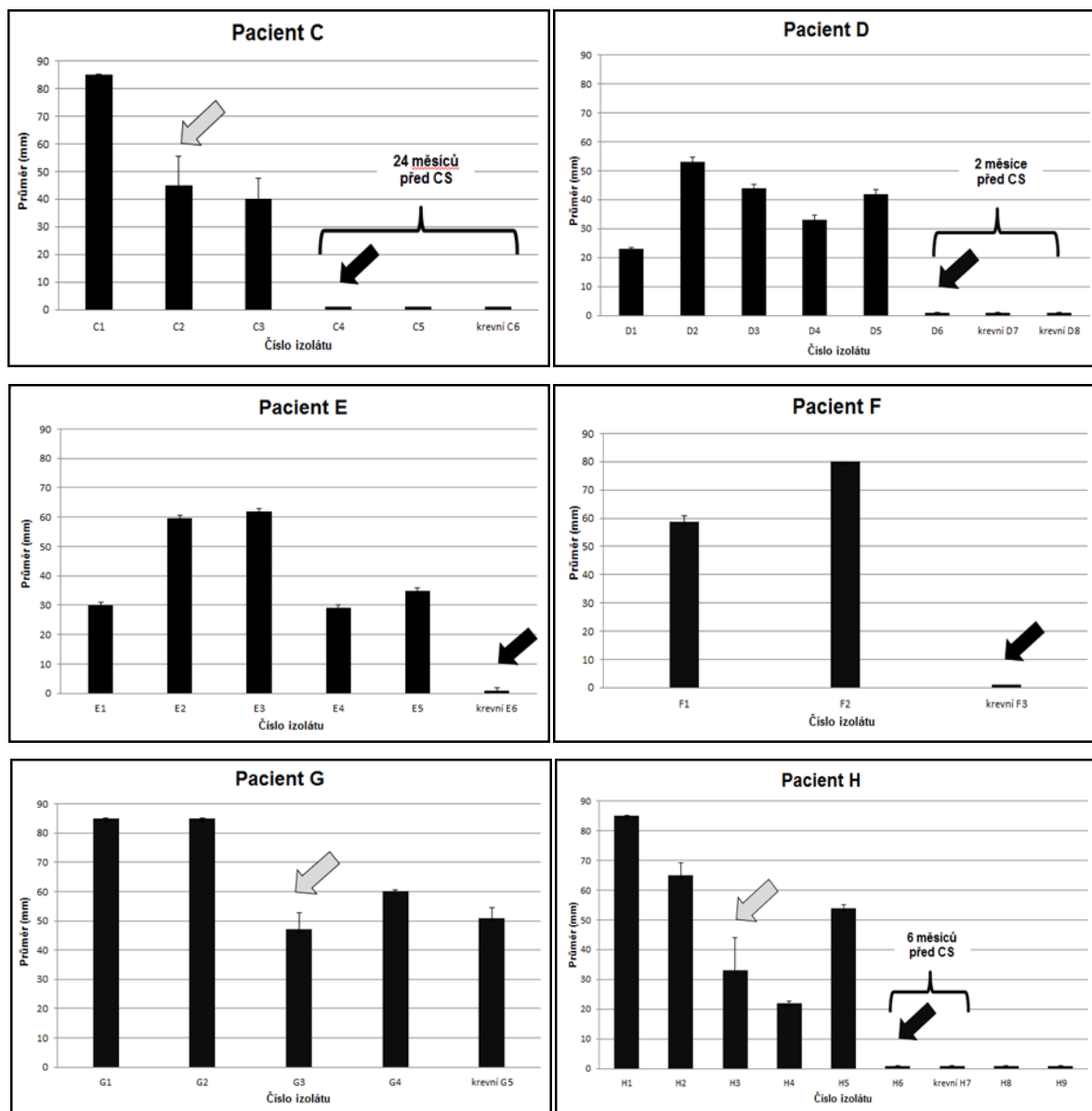
Data získaná z transkriptomového experimentu (izoláty A2 a A3) se nám podařilo potvrdit i touto metodou. Sputový izolát na rozdíl od krevního vykazuje viditelně zvýšenou schopnost motility (Obrázek č. 10).



Obrázek č. 10. Fotografie ploten při měření schopnosti motility bakterií po 120 h. A) Izolát získaný z krve (A3). B) Izolát získaný ze sputa (A2) vykazující značně vyšší schopnost motility než krevní izolát.

Jelikož u pacienta B nebyla změna v expresi genů pro motilitu pozorována, rozhodli jsme se od něj získané izoláty chronologicky otestovat metodou měření schopnosti motility, až jsme v čase 21 měsíců před rozvojem CS objevili motilní izolát. Následně jsme takto otestovali izoláty od dalších šesti pacientů, kteří prodělali cepacia syndrom. Úplnou ztrátu motility spojenou s cepacia syndromem jsme našli u 6 z 8 pacientů. Izoláty od zbylých dvou pacientů (pacient A a G) sice nevykázaly úplnou ztrátu motility, ale byl zde její viditelný pokles až o 40 mm při měření průměru (Graf č. 7-14). Nejdelší časový úsek mezi cepacia syndromem a prvním nemotilním izolátem byl 24 měsíců u izolátů od pacienta C.





Graf č. 7 - 14. Přehled motility u izolátů od pacientů A – H, kteří prodělali cepacia syndrom. Šedou šipkou jsou označeny izoláty s významným poklesem motility, černou šipkou jsou označeny izoláty s první viditelnou ztrátou motility. U úplné ztráty motility je zaznamenáno časové období předcházející vzniku cepacia syndromu. Převzato a upraveno z publikace¹⁴⁰.

Pro ověření tohoto pozorování jsme vybrali kontrolní izoláty od 16 pacientů s CF s chronickou ST32 infekcí, kteří doposud neprodělali cepacia syndrom (Příloha č. 4a). Z grafů v Příloze č. 4b je viditelné, že izoláty získané od těchto pacientů zůstávají ve většině případů stále stějně motilní. Jediné varovné signály jsme zaznamenali u pacientů L, U, W a Y, kde je viditelný významný pokles v motilitě jednotlivých izolátů. Toto pozorování může být varovným signálem pro možný blížící se rozvoj cepacia syndromu. Tito pacienti byli zařazeni do prospektivní studie pro sledování exprese genů po extrakci RNA přímo z klinického materiálu.

Získané výsledky nás utvrzují v tom, že zde je statisticky významná spojitost mezi úplnou ztrátou motility, či jejím rapidním poklesem a vznikem CS ($p = 0,0002$, Fisherův test).

3.3. Diskuze

Využití microarray čipů pro studium a porovnávání Bcc transkriptomů má mezi nově se vyvíjejícími metodami stále své místo (118). Pro microarray experiment jsme využili čipy navržené pro blízkce příbuznou *B. cenocepacia* J2315 patřící do linie ET12. Jak již bylo popsáno ve výsledcích, tento čip pokryje pouze 76 % CDS ST32. Ovšem většina faktorů virulence a dalších důležitých genů jsou pro J2315 a ST32 shodné (nepublikovaná data dodaná M. Kolářem a H. Strnadem, AVČR) a nám se podařilo zacílit řadu takových genů. Na čipu navrženém pro kmen J2325 bylo provedeno také několik dalších studií jiných kmenů, mimo jiné sem patří například H111 (48) a IST439 (128). V rámci transkriptomového experimentu jsme odhalili velké množství genů, které změnilly svou expresi.

Během studie jsme se zaměřili na porovnání expresních profilů na základě původního zdroje izolátů, zejména na porovnání všech izolátů z krve kultivovaných ve všech podmínkách se všemi izoláty ze sputa kultivovanými ve všech podmínkách, které by nám mělo pomoci odhalit, čím se tyto izoláty liší. Zajímalo nás, zda by některý z genů s odlišnou expresí mohl být použit jako případný prognostický marker pro blížící se CS.

Přehled genů se zvýšenou či sníženou expresí u krevních izolátů je zobrazen v Tabulce č. 4. Mezi těmito geny se mimo jiné objevilo také několik již známých genů pro významné faktory virulence. Jedná se například o geny pro T3SS¹⁴⁴, cepacian¹⁴⁵ a quorum sensing^{146 147}, které jsou často spojovány se zvýšenou virulencí bakterií. Z genů, které byly významně down (sníženy) - regulované (ovšem pouze v rámci pacienta A) nás zaujalo především několik klastrů genů pro tvorbu bičíku (Příloha č. 2a). Expresí T3SS spolu s virulencními faktory jako je motilita a exopolysacharidy je, jak již bylo popsáno, ovlivňována QS^{148 149}, což podporuje naše pozorování, kdy v rámci krevních izolátů byla exprese těchto genů změněna.

Pro následnou studii pomocí qRT-PCR bylo vybráno celkem 18 genů, jejichž exprese byla testována u izolátů od osmi pacientů, kteří prodělali cepacia syndrom. V první a druhé fázi byla testována exprese genů po kultivaci daného izolátu v BSM. V případě izolátů použitých pro microarray experiment byla většina expresních profilů testovaných genů shodná s microarray výsledky. Ovšem u izolátů od zbývajících pacientů byla exprese u většiny testovaných genů velmi rozkolísaná a nebyl zde viditelný trend vyznačující možnost využití daného genu jako prognostického markeru. Toto pozorování může být způsobeno tím, že se jedná o regulátory transkripce, hypotetické proteiny, membránové proteiny atd., které mohou být ovlivněny vnějším prostředím a nesouvisí tak přímo s původní změnou exprese na základě zdroje izolátu. Našemu požadavku pro vhodný „marker“ nejvíce odpovídaly testované geny pro T3SS a motilitu.

Na základě výsledku z prvních dvou fází qRT-PCR jsme se zaměřili na hlubší testování exprese genů pro T3SS a genu *fliC* pro tvorbu bičíku, u kterých byla v nedávno publikované práci prokázána jejich negativní korelace¹⁵⁰. Již popsaný vliv T3SS¹⁵¹ a nemotilního fenotypu¹⁵² na únik bakterií *P. aeruginosa* před fagocytózou nás v našem přesvědčení jen utvrdil.

V rámci třetí fáze kvantitativního PCR jsme pozorovali jistou tendenci zvyšování exprese některých genů pro T3SS a snižování exprese genu *fliC* u sputových izolátů v porovnání s izolátem získaným z krve. Toto sledování se nám podařilo převést do formy stanovení exprese genů ST32 přímo z klinického materiálu (sputum) bez nutnosti předchozí *in vitro* kultivace izolátů. Pilotní studie byla provedena u sput získaných od pacienta P, který podlehl cepacia syndromu, a od kterého jsme získali i vzorek sputa přímo z období cepacia syndromu (Graf č. 5). Z grafu je viditelná korelace mezi expresí některých genů pro T3SS a motilitu. Pokles motility izolátů od pacienta P byl potvrzen také funkčním testem (Graf č. 6).

Vliv zvýšené exprese T3SS na stav pacienta je diskutován u *P. aeruginosa*¹⁵³, kdy se jedná o faktor zhoršující průběh infekce u pacienta a je zde snaha zacílit T3SS pro účely terapie. Na druhou stranu se fenomén zvýšení exprese některých genů pro T3SS zdá být úzce spojený s cepacia syndromem, a proto viditelné zvýšení je ve velké části pozorováno až u krevního izolátu. V tomto případě by se dalo do studie zařadit sledování některého z regulačních faktorů T3SS, který by nás mohl upozornit dříve.

Ovšem v kombinaci poklesu exprese genu *fliC* pro tvorbu bičíku a stoupající tendence exprese vybraných genů pro T3SS (BCAM2053 a BCAM2055) by se mohla hrozba přicházejícího cepacia syndromu odvodit. Zároveň zavedením extrakce bakteriální RNA přímo z klinického materiálu dochází ke zkvalitnění získaných výsledků.

Zaměřili jsme se na korelaci mezi cepacia syndromem a motilitou izolátů a zjistili jsme, že u 75 % pacientů (6/8), kteří prodělali cepacia syndrom, došlo k úplné ztrátě motility. Izoláty od zbývajících 25 % pacientů (2/8) sice zůstaly motilní, nicméně zde byl pozorován významný pokles jejich motility. Toto pozorování se zdá být úzce kmenově specifické, jelikož nedávno publikovaná studie hledající korelaci mezi motilitou a stavem pacienta u širokého panelu izolátu Bcc od pacientů s CF zde nenašla žádnou souvislost¹⁵⁴. Stále však věříme, že tímto jednoduchým a rychlým testem můžeme sledovat schopnost motility ST32 izolátů, což nám spolu s výsledky qRT-PCR snad pomůže včas odhalit pacienty, u kterých by mohlo hrozit rozvinutí CS.

Během měření schopnosti motility jsme u kontrolních pacientů L, U, W a Y pozorovali její varovný pokles. Při pozorování významného poklesu by bylo vhodné zvýšit frekvenci

vyšetřování exprese genů ze sputa, kdy při současně pomalu se zvyšující expresi genů pro T3SS by se mohlo jednat o varovný signál pro možný vznik cepacia syndromu.

Díky této studii dochází v současné době v naší laboratoři nejen k testování motility u všech ST32 izolátů od pacientů s CF, kdy sledujeme, zda nedochází k jejímu rapidnímu poklesu, ale také k testování exprese genů pro T3SS (BCAM2053 a BCAM2055) a genu *fliC* (BCAL0114) pro tvorbu flagelly pomocí qRT-PCR přímo z klinických vzorků (sputum) od vybraných ST32 pozitivních žijících pacientů s CF.

Na závěr je nutné podotknout, že výsledky metody qPCR mohou být velmi ovlivněny v průběhu zpracování vzorku, zejména v rámci izolace a zpracování RNA, která vyžaduje velmi rychlou a kvalitní práci.

Nicméně věříme, že vhodná kombinace těchto dvou přístupů sledování by nám mohla pomoci lépe monitorovat případný zhoršující se stav infekce a její přechod do cepacia syndromu.

4. STUDIUM SEKREČNÍHO SYSTÉMU TYPU III U BAKTERIE *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA* ST32

Cíl: Studium funkce sekrečního systému typu III ve vztahu k izolátům z krve a cepacia syndromu.

Hypotéza: Zvýšená exprese sekrečního systému typu III (T3SS) byla pozorována u všech testovaných izolátů získaných z krve během cepacia syndromu v porovnání s izoláty získanými ze sputa od téhož pacienta před vznikem cepacia syndromu. T3SS patří mezi významné faktory virulence, a tudíž by mohl mít vliv na samotný vznik cepacia syndromu. U různých druhů bakterií se T3SS přiřítají různé funkce, které by mohly mít význam i v případě gradace klinického stavu způsobeného chronickou infekcí epidemického kmenu ST32.

Autorské publikace k tématu: Publikace k tématu je ve fázi přípravy.

Na základě výsledků z microarray experimentu a jejich následného potvrzení pomocí kvantitativního PCR jsme se rozhodli pro hlubší studium T3SS. Pro studium jsme vybrali možnost vytvoření izolátu mutantního právě pro T3SS. K tvorbě tohoto mutantního izolátu jsme využili metodu „Triparental mating assay“ zavedenou v laboratoři prof. Valvana (Queen's University, Belfast, UK)¹¹¹. Tento projekt se stal součástí řešení grantu GAUK 640214.

4.1. Metodika

4.1.1. Získání tetracyklin senzitivních izolátů

Postup pro získání tetracyklin senzitivních kmenů byl navržen na základě publikace¹⁵⁵. Jedná se o selekci kolonií senzitivních na tetracyklin s využitím vlastností fusarové kyseliny. Pro přípravu 0,5 litru půdy pro selekci tetracyklin senzitivních kmenů je potřeba: 7,5 g BactoAgar (Oxoid); 2,5 g Tryptone broth (Sigma-Aldrich); 2,5 g Yeast extract (Amresco), 2,5 ml tetracyklin (12,5 μ M, Sigma-Aldrich), 5 g NaCl (Penta). Směs autoklávovat a temperovat na přibližně 50°C. Poté přidat 5 g NaH₂PO₄·H₂O (Sigma-Aldrich); 3 ml fusarové kyseliny (2 mg/ml, Sigma-Aldrich) a 2,5 ml ZnCl₂ (20 mM, Sigma-Aldrich).

Přes noc narostlé izoláty A2 a A3 (LB médium, 37°C) jsme naředili desítkovou ředící řadou na 10^{-1} - 10^{-5} . Na plotny jsme naočkovali 100 μ l z každé ředící řady. Plotny jsme inkubovali po dobu 24 - 48 h při 37°C. Na plotnách narostly pouze tetracyklin senzitivní kmeny, které byly ověřeny naočkováním na LB plotnu a LB plotnu obsahující tetracyklin.

4.1.2. Tvorba mutantních izolátů pro T3SS a gentamicin („Triparental mating assay“)

Pro tvorbu mutantního izolátu jsme použili následující bakteriální kmeny a plazmidy:

Plazmid

MV3999 (pGPI-SceI + fragment pro delecí T3SS, BCAM2040 – BCAM2057)

MV4148 (pGPI-SceI + fragment pro delecí T3SS, BCAM1674 – BCAM1676)

Kmeny

E. coli GT115 (pro přípravu donorového kmene)

MV0100: *E. coli* SY2370 + pRK2013 (pomocný kmen pro konjugaci)

Izoláty ST32 určené pro delecí: A2 a A3, viz výše, tabulka č. 1, str. 38.

Příprava donorového kmene

Na ledu se nechaly rozmraznout 2 alikvoty zásobních buněk GT115 a plazmid (MV3999 nebo MV4248). Do jedné zkumavky s GT115 byly přidány 2 μ l plazmidu, druhá alikvota buněk byla ponechána jako negativní kontrola. Inkubace trvala 30 min na ledu a následně 2 min při 45°C, poté byly buňky ihned přeneseny zpátky na led. Do každé falkonky bylo přidáno 900 μ l SOC média, jemně promícháno pipetou a směs byla přenesena do zkumavek s pohyblivým víčkem, které byly následně přilepeny páskou ve vodorovné poloze v inkubátoru. Inkubace trvala 2 h při 37°C. Následovalo rozočkování 100 μ l buněk na LB agar obsahující 50 μ g/ml trimethoprimu. Plotny byly inkubovány přes noc při 37°C. Jedna narostlá kolonie byla rozočkována na LB plotnu s trimethoprimem. Na plotně s kontrolními buňkami nesmělo nic narůst. Narostlá kolonie byla zamrazena a připravena pro použití pro „Triparental mating assay“ metodu ¹¹¹.

Postup „Triparental mating assay“:

- Naočkování donorových bakterií obsahující plazmid pro mutaci (MV3999 a MV4148) na LB plotny obsahující trimethoprim a dále pomocné bakterie (MV0100) na LB plotny obsahující kanamycin (40 μ g/ml). Do 5 ml LB naočkovat izoláty určené pro mutagenezi (A2 a A3), inkubace přes noc, 37°C

- 500 µl narostlé kultury v tekutém LB přenést do nových 5 ml LB, inkubace 5 h při 37°C.
- Vatovým tamponem sebrat narostlé donor a helper bakterie a resuspendovat do 5 ml tekutého LB, opatrně promíchat, nevortexovat. Následně změřit OD₆₀₀. Do nové zkumavky přidat množství bakterií tak aby bylo dosaženo požadovaného OD (OD 0,5 pro pomocné a donorové bakterie, OD 0,45 pro bakterie určené pro mutagenezi). Do zkumavky přidat odpovídající objem: donorové bakterie (MV3999 nebo MV4148) + pomocné bakterie (MV0100) + bakteriálního izolátu určeného pro mutagenezi (A2 nebo A3). Přetáčením zkumavky směs promíchat, následně stočit 1 min při 12 000 rpm. Peletu opatrně resuspendovat ve 100 µl SOC média (SigmaAldrich). Celý objem přenést doprostřed LB agaru ve formě kapky. Inkubace plotny víkem nahoru přes noc při 37°C.
- Narostlou kulturu resuspendovat v 5 ml LB, zvortexovat a připravit desítkovou ředící řadu (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}). Rozočkovat 100 µl z každého ředění na LB plotnu obsahující antibiotika pro selekci. Pro MV3999: trimethoprim 200 µg/ml (selekcce pro bakterie obsahující plazmid) + gentamicin 50 µg/ml (odstranění *E. coli*); pro MV4148: trimethoprim 200 µg/ml (selekcce pro bakterie obsahující plazmid) + ampicilin 200 µg/ml + polymyxin 20 µg/ml (odstranění *E. coli*). Inkubace 48 h při 37°C.
- Vatovým tamponem sebrat do 5 ml LB + 200 µg/ml trimethoprimu 10 – 15 narostlých kolonií. Na LB plotnu obsahující 40 µg/ml kanamycinu naočkovat bakterie obsahující plazmid produkující endonukleázu I-SceI (MV3675). Inkubace přes noc při 37°C.
- Vatovým tamponem opatrně sebrat narostlou bakteriální kulturu MV3675 a resuspendovat v 5 ml LB, změřit OD₆₀₀. Do nové zkumavky přidat množství bakterií tak, abychom dosáhly požadovaného OD (OD 0,5 pro MV3675, OD 0,45 pro bakterie určené pro mutagenezi). Do zkumavky přidat odpovídající objem: MV3675 + bakteriálního izolátu určeného pro mutagenezi již obsahujícím plazmid MV3999 nebo MV4148. Přetáčením zkumavky směs promíchat, následně stočit 1 min při 12 tis. rpm. Peletu opatrně resuspendovat ve 100 µl SOC média (Sigma). Celý objem přenést doprostřed LB agaru ve formě kapky. Inkubace plotny víkem nahoru přes noc při 37°C.
- Narostlou kulturu resuspendovat v 5 ml LB, zvortexovat a připravit desítkovou ředící řadu (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}). Rozočkovat 100 µl z každého ředění na LB plotnu obsahující antibiotika pro selekci (pro MV3999: tetracyklin 400 µg/ml + gentamicin 50 µg/ml; pro MV4148: tetracyklin 400 µg/ml + ampicilin 200 µg/ml + polymyxin 20 µg/ml). Inkubace 48 h při 37°C.

- Narostlé kolonie přečárkováním naočkovat na dvě plotny. Pomocí sterilní špičky nabrat narostlou kolonii, nejprve udělat čárku na LB plotnu obsahující 200 µg/ml trimetoprimu + 400 µg/ml tetracyklinu + 50 µg/ml gentamicinu, následně udělat čárku na LB plotně obsahující 400 µg/ml tetracyklinu + 50 µg/ml gentamicinu. Inkubace ploten přes noc při 37°C.
- Kolonie citlivé na trimethoprim přenést pomocí sterilní špičky každou zvlášť do 50 µl injekční H₂O a resuspendovat. Odebrat 5 µl z každé zkumavky na LB plotnu, nechat inkubovat přes noc při 37°C.
- Zbylých 45 µl inkubovat 10 min při 96°C, poté centrifugovat 1 min 14 000 rpm, následně použít pro PCR pro ověření delece vybraného úseku.
- PCR pro potvrzení delece v mutovaném izolátu provést v duplikátech o celkovém objemu 12,5 µl + 7,7 µl DNA. Chemikálie použít z kitu Taq core PCR kit (Qiagen): Buffer 5x, QSS 5x, 0,3 µM primer F a 0,3 µM primer R, 2,5 µM dNTPs a 50 units Taq polymerase. PCR program se skládá z počáteční denaturace 95°C, 3 min, následuje 45 cyklů tvořených z denaturace při 94°C, 30 s; nasednutí primerů 56°C, 30 s; 72°C, 1:30 s a závěrečných 10 min 72°C. Správnost délky PCR produktů potvrdit pomocí gelové elektroforézy.
- U kolonií s potvrzenou delecí odebrat narostlou bakteriální do 5 ml LB, inkubace přes noc při 37°C.
- Připravit desítkovou ředící řadu (10⁻³ - 10⁻⁵). Rozočkovat 100 µl z každého ředění na Nutrient Broth plotnu (Fulka) obsahující 5% sacharózu (Sigma-Aldrich), inkubace přes noc, 37°C.
- Narostlé kolonie přečárkováním naočkovat na dvě plotny. Pomocí sterilní špičky nabrat narostlou kolonii, nejprve udělat čárku na LB plotnu obsahující 400 µg/ml tetracyklinu, následně udělat čárku na samotné LB plotně. Inkubace ploten přes noc při 37°C.
- Kolonii citlivou na tetracyklin rozočkovat na LB plotnu, inkubace přes noc, 37°C, následně mutantní izolát zamrazit (920 µl TSB [Trypton Soya Broth, Sigma-Aldrich] + 80 µl DMSO [Dymethyl sulfooxid, Sigma-Aldrich]). Takto připravený mutantní izolát je možno použít pro další mutagenезi pomocí "Triparental Mating assay".

4.1.3. Měření schopnosti tvorby biofilmu

Pro měření schopnosti tvorby biofilmu mutantních a nemutantních izolátů byla použita metoda popsaná v publikaci M. Soledad Saldías a spol.⁷⁷. Přes noc narostlá bakteriální kultura v LB byla naředěna na OD₆₀₀ 0,005. Do polyesterových falkonek (12 x 75 mm, Falcon) bylo v triplicátu napipetováno 500 µl naředěné bakteriální kultury. Následovala statická inkubace po dobu 24 h při 37°C. Poté bylo LB s bakteriální kulturou odstraněno a zkumavky byly opatrně vypláchnuty 1 ml vody pro odstranění zbylých nepřichycených bakterií. Přichycené bakterie byly inkubovány s 1% krystalovou violetí po dobu 1 min při pokojové teplotě. Následovalo několikanásobné promytí zkumavek vodou, pro odstranění přebytečné krystalové violeti. Na závěr byl přidán 1 ml 100% metanolu pro rozpuštění barviva. Měření absorbance krystalové violeti proběhlo na spektrofotometru při OD₆₀₀. Experiment byl opakován celkem třikrát, jako negativní kontrola byl použitý vzorek samotného LB, který prošel stejným procesem jako měřené vzorky (už od počáteční kultivace bakterií). Výsledná OD₆₀₀ naměřená u negativní kontroly byla odečtena od všech měřených vzorků. Vzrůstající hodnota OD₆₀₀ odpovídá vzrůstající schopnosti bakteriální kultury tvořit biofilm.

4.1.4. Růstové křivky

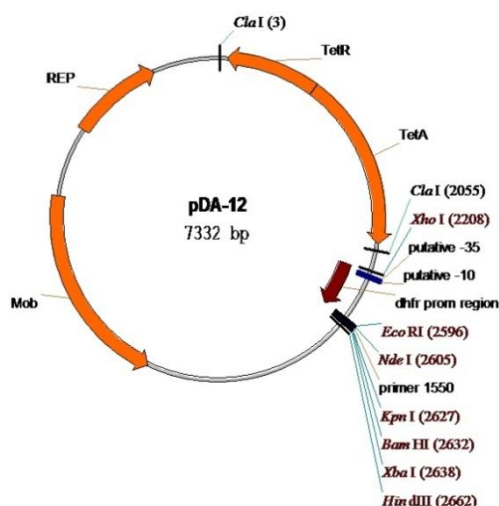
Pro srovnání schopnosti adaptovat se na různá kultivační prostředí bylo zavedeno měření růstových křivek. Pro vlastní měření bylo použito několik kultivačních podmínek (sputum od pacientů s CF, tepelně inaktivované sérum od pacientů s CF, plná krev, kontrolní médium BSM a nakonec LB). Kultury přes noc narostlé v tekutém LB byly naředěny na OD₆₀₀ 0,1 u kultivačních podmínek využívajících měření absorbance a na OD₆₀₀ 0,5 u kultivačních podmínek využívajících pro měření koncentrace metodu dropcount. Následně byly odebrány 2 ml naředěné kultury a centrifugovány 8 min, 2 000 rpm. Peleta byla resuspendována v požadovaném médiu a byla započata kultivace při 37°C, 200 rpm. Podle typu média probíhalo měření koncentrace. Pro kultivaci v BSM, LB a tepelně inaktivovaném séru byla každou hodinu měřena absorbance při OD₆₀₀ pomocí spektrofotometru. Pro kultivaci ve sputu a plné krvi bylo každou hodinu odebráno 50 µl kultury, které byly následně naředěny desítkovou řadou (10⁻¹ - 10⁻⁸). Koncentrace byla měřena pomocí metody dropcount, kdy na TSA (Tryptone Soya agar, Sigma-Aldrich) bylo napipetováno v triplicátu 10 µl z každé alikvoty v desítkové ředící řadě. Plotny byly inkubovány, 24 h při 37°C. Pomocí počtu narostlých bakteriálních kolonií v jednotlivých ředících řadách byla spočítána původní koncentrace vzorku, počet CFU/ml (colony forming unit/ml; počet kolonií

tvořících jednotek/ml). Všechna měření byla provedena v triplicátu. Výsledná data jsou zobrazena pomocí grafů.

4.1.5. Testování izolátů na makrofázích

Vložení plazmidu s genem pro produkci mCherry proteinu do testovaných izolátů

Pro vizualizaci vybraných izolátů pomocí fluorescenčního mikroskopu bylo nejprve potřeba vložení plazmidu obsahujícího gen produkující fluorescenční mCherry protein. My jsme použili plazmid pJT04 obsahující gen *mCherry* (plazmid pDA-12, Obrázek č. 11) a gen pro tetracyklinovou rezistenci, poskytnutý prof. Valvanem z Queens University of Belfast. Plazmid byl vložen do vybraných izolátů pomocí první části „Triparental mating assay“ metody (využití pomocných buněk MV0100) popsané výše. Testování úspěšnosti vložení genu proběhlo pomocí specifického PCR pro *mCherry* gen. Kolonie obsahující plazmid zároveň získaly růžové zabarvení.



Obrázek č. 11. Obrázek plazmidu pDA-12. Z tohoto plazmidu byl vytvořen plazmid pJT04 nesoucí gen pro tvorbu proteinu *mCherry* a gen pro tetracyklinovou rezistenci.

Určení MOI (multiplicity of infection) testovaných izolátů

Experimenty spojené s makrofágovými buněčnými liniemi byly provedeny během stáže v laboratoři prof. Valvana, Queens University of Belfast. Pro testování chování bakteriálních izolátů v makrofázích je nejprve potřeba určit takzvanou MOI, která udává potřebnou infekční dávku pro daný izolát. Nejprve se nechala narůst buněčná makrofágová linie RAW 264.7 v šesti jamkové destičce obsahující skříčka pro nárůst buněk, přes noc při 37°C, a to v takové koncentraci, aby pokrytí narostlých buněk bylo druhý den přibližně 70 %. Vybrané izoláty obsahující gen pro fluorescenční protein *mCherry* byly kultivovány v 5 ml tekutého LB přes noc

při 37°C, 200 rpm. Poté byly buňky 2x promyty v DMEM médiu (SigmaAldrich) a následně rozpuštěny v 1 ml DMEM. Byla změřena jejich absorbance při OD₆₀₀. Podle procentuálního pokrytí nárůstu buněk v jamkách byla spočítána potřebná koncentrace bakteriální kultury na jamku, při testování MOI 10 (= 10 bakterií na 1 buňku). Potřebné množství bakteriální kultury bylo přidáno k narostlým buňkám v médiu bez přidání antibiotik. Následovala centrifugace destičky, 3 min při 1 000 rpm a 2 x promytí pomocí PBS (SigmaAldrich). Poté byl do každé jamky přidán 1 ml parafínu, pomocí kterého byly buňky fixovány na sklíčka obsažená v jamkách. Následovala inkubace po dobu 1 h při pokojové teplotě, a poté 2x promytí sklíček pomocí PBS. Po promytí se sklíčka s buňkami nechala oschnout a bylo přiloženo krycí sklíčko. Jednotlivá sklíčka byla kontrolována pomocí fluorescenčního mikroskopu Axioscope 2 (Carl Zeiss) a objektivu 100x s použitím imerzního oleje. Jako kontrolní vzorky byly využity alikvoty použitých izolátů, které byly tepelně inaktivovány.

Gentamicinový test

Gentamicinový test byl proveden podle již popsaného protokolu v publikaci ¹¹². Ve zkratce, makrofágové buňky se nechaly přes noc narůst v šesti jamkových destičkách na koncentraci 1 x 10⁶ buněk/jamka. Přes noc narostlé ST32 izoláty (LB, 37°C) byly třikrát promyty pomocí DMEM s FBS a následně použity pro infekci makrofágů při MOI 30. Po provedení infekce byla destička s makrofágy centrifugována 1 min při 300 rpm a poté inkubována 2 h při 37°C a 5% CO₂. Po inkubaci byly buňky třikrát promyty pomocí PBS, pro odstranění neadherovaných bakterií. Po odstranění zbylých extracelulárních bakterií proběhla inkubace buněk, 30 min v DMEM s FBS obsahujícím 50 µg/ml gentamicinu. Následovalo odstranění média a jeho nahrazení čerstvým médiem obsahujícím 10 µg/ml gentamicinu. Pro určení množství intracelulárních bakterií, které infikovaly makrofágy, byly buňky promyty v PBS a poté lyzovány pomocí 1% Triton X-100 v PBS a to v čase 0, 24 a 48 hodin po infikování bakteriemi. Množství bakterií bylo určeno kultivací na LB plotnách (desítkové ředění) a následným spočítáním narostlých kolonií. Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t testu.

4.2. Výsledky

4.2.1. Získání tetracyklin senzitivních izolátů

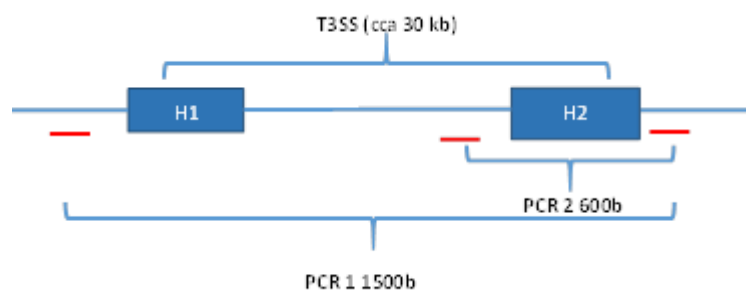
Metodika postavená na vlastnostech kyseliny fusarové funguje na principu selekce. Kmeny rezistentní na tetracyklin vlastní efluxovou pumpu, která odstraňuje tetracyklin z buňky. Fusarová kyselina funguje jako antagonistka k tetracyklinu a vstupuje dovnitř bakterie. Speciální půda obsahuje tepelně inaktivovaný tetracyklin, který aktivuje tuto pumpu, ale zároveň nezabíjí senzitivní kolonie. Aktivací pumpy způsobí, že fusarová kyselina se dostane dovnitř tetracyklin rezistentních bakterií a zabije je. Na těchto speciálních plotnách by měly narůst pouze kolonie, které jsou tetracyklin senzitivní. Toto se potvrdilo u obou testovaných izolátů, A2 a A3, kdy jsme získali izoláty citlivé na tetracyklin a to již při koncentraci 150 µg/ml.

4.2.2. Tvorba izolátu mutantního pro T3SS a citlivého na gentamicin

Pro mutagenézi jsme si vybrali izolát z krve z období cepacia syndromu (A3) a izolát ze sputa získaný měsíc před rozvojem cepacia syndromu (A2) od pacienta A (viz Tabulka č. 1). Na základě výsledků z transkriptomového experimentu, kdy byla zvýšená exprese téměř celého klastru genů pro T3SS u krevních izolátů, jsme se u izolátu získaného z krve (A3) rozhodli pro delecí celého T3SS regionu (BCAM2040 – BCAM2057, přibližně 29,3kb).

Jelikož jsme se rozhodli pro testování T3SS mutantního izolátu na makrofázích, kde je nezbytná senzitivita bakterií na gentamicin, a ST32 izoláty jsou vysoce rezistentní k tomuto antibiotiku, byli jsme nuceni vytvořit izoláty s delecí v oblasti pro gentamicinovou rezistenci. Delece byla navržena pro oblast gentamicinové pumpy (BCAM1674 – BCAM1676, přibližně 5,8kb).

Příprava mutantních izolátů byla velmi komplikovaná, a to nejen z důvodu, že se jedná o velmi dlouhý úsek vybraný pro delecí (v případě T3SS až 29,3kb), ale také z toho důvodu, že s kmenem ST32 je všeobecně velmi těžká genetická manipulace. V rámci prvního crossing overu jsme většinou získali pozitivní výsledek a kolonie na selekčních půdách narostly. Nicméně během druhého crossing overu docházelo ve většině případů místo delece vybraného genu k obnovení původních alel (viz kapitola 2.4.2.). Průběh druhého crossing overu jsme v případě delece T3SS ověřovali pomocí PCR jednotlivých kolonií, které narostly na selekčních plotnách (Obrázek č. 12).



Obrázek č. 12. Schématický obrázek navržených PCR reakcí pro ověření průběhu druhého crossing overu. Červenými pomlčkami jsou zobrazené oblasti pro nasednutí primerů.

Oblasti H1 a H2 na Obrázku č. 12 jsou sekvence před a za T3SS regionem vybrané pro vložení do mutačního plazmidu. Mezi těmito oblastmi by mělo dojít k delecí. PCR 1 obsahuje primery nasedající na sekvenci obklopující T3SS systém (mimo oblast určenou pro delecí), z toho důvodu reakce proběhne pouze v případě, pokud došlo k delecí T3SS oblasti, jinak je produkt pro úspěšnou PCR reakci příliš dlouhý. PCR 2 obsahuje F primer, který zasahuje do oblasti určené pro delecí. Z toho důvodu je PCR 2 pozitivní pouze v případě, kdy během druhého crossing overu došlo k obnovení původních alel. V případě delecí je PCR 2 negativní. Jako pozitivní kontrolu pro T3SS delecí jsme použili mutantní izolát Δ T3SS K56-2, jako negativní kontrolu jsme použili divoký kmen, izolát A3.

Nakonec se nám podařilo získat kolonii, která svými PCR výsledky (PCR 1 – band o velikosti cca 1500bp, PCR 2 – negativní) odpovídala požadované delecí T3SS regionu. S touto kolonií byla provedena poslední část „Triparental mating assay“ (kapitola 4.1.) pro odstranění druhého plazmidu. Delecí celého T3SS regionu byla následně potvrzena pomocí sekvenace užitím primerů z PCR 1 a tento mutantní izolát byl označen jako Δ T3SS A3.

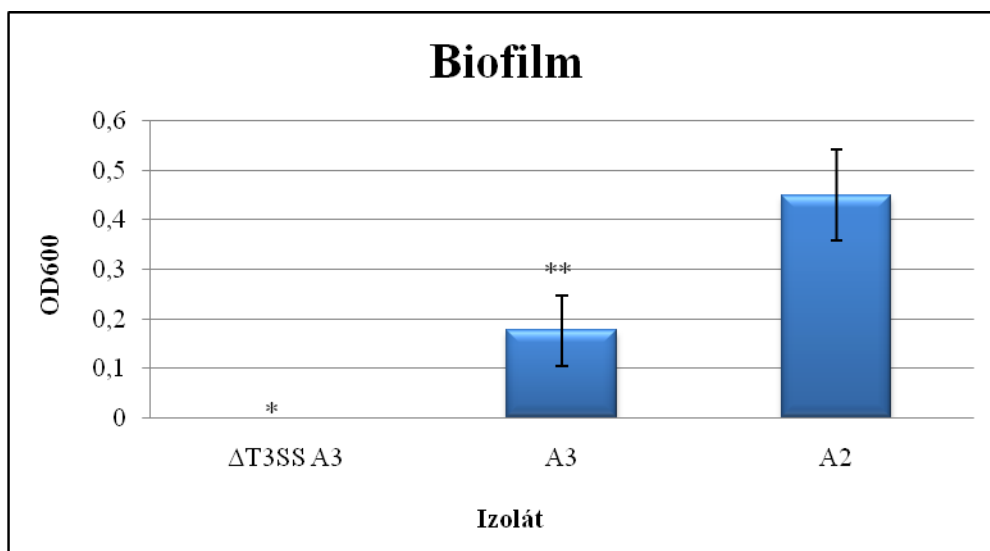
U izolátů Δ T3SS A3, A3 a A2 byla provedena „Triparental mating assay“ pro získání gentamicin senzitivních kolonií (viz kapitola 4.1.). Správnost provedení mutace byla ověřena pomocí současné kultivace na LB plotnách a LB plotnách obsahujících gentamicin (150 μ g/ml). Podařilo se nám získat kolonie senzitivní na gentamicin pouze u dvou izolátů (A3 a A2). Bohužel se nám zatím nepodařilo získat dvojitý mutantní izolát Δ T3SS A3 citlivý na genatamicin.

4.2.3. Měření schopnosti tvorby biofilmu

Zaměřili jsme se na porovnání schopnosti tvorby biofilmu u tří vybraných izolátů (Δ T3SS A3, A3 a A2). Měření bylo opakováno třikrát, testování izolátů proběhlo vždy v triplikátu. Jako kontrolní vzorek byla použita prázdná zkumavka bez přidaného bakteriálního izolátu, která prošla stejným procesem jako testované izoláty. Výsledná absorbance této kontroly byla odečtena od absorbance měřených vzorků. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu č. 15. Největší

schopnost tvořit biofilm jsme pozorovali u izolátu A2 získaného ze sputa ($p = 0,00003$ v porovnání s izolátem A3).

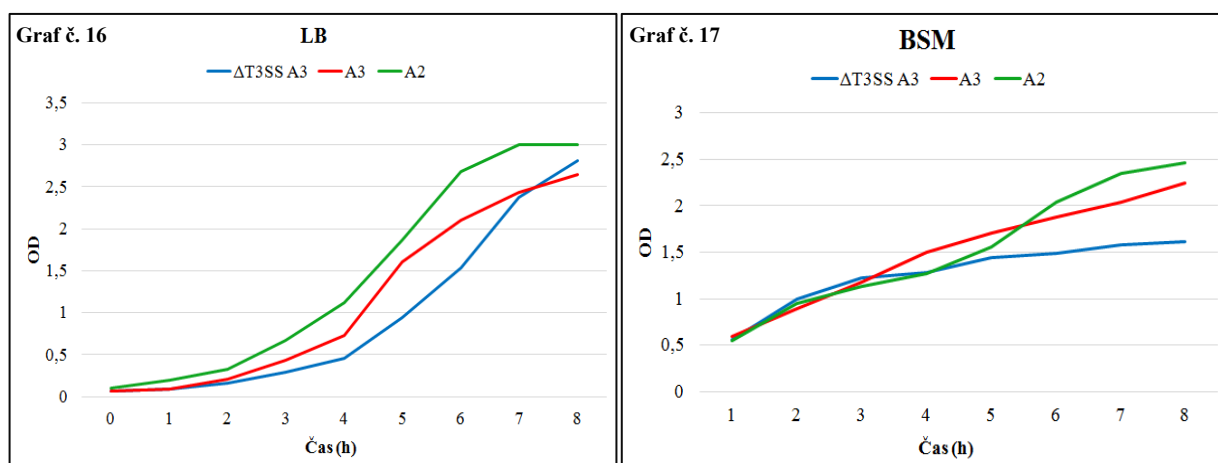
U krevního izolátu A3 jsme pozorovali mnohem lepší schopnost produkce biofilmu než u krevního izolátu mutantního pro T3SS region ($\Delta T3SS$ A3), u kterého byla naměřená nulová schopnost tvorby biofilmu ($p = 0,00359$ v porovnání s izolátem A3).



Graf č. 15. Hodnoty absorbance pro jednotlivé izoláty ($\Delta T3SS$ A3, A3, A2) získané při měření schopnosti tvorby biofilmu. * p ($\Delta T3SS$ A3 vs A3) = 0,00359; ** p (A3 vs A2) = 0,00003.

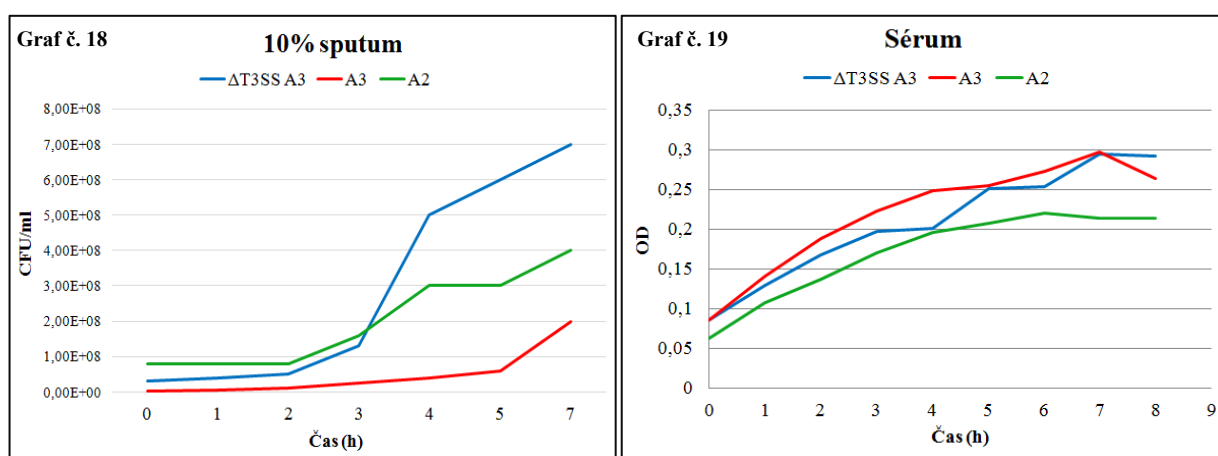
4.2.4. Růstové křivky

Nejprve byly testovány jednotlivé izoláty ($\Delta T3SS$ A3, A3 a A2) v triplikátu měřením absorbance při růstu v kontrolním médiu (BSM) a LB. Všechny izoláty vykazovaly obdobnou schopnost růstu v čase (Graf č. 16-17).



Grafy č. 16-17. Graf č. 16 znázorňuje růstové křivky pro jednotlivé izoláty (A3, $\Delta T3SS$ A3, A2) při kultivaci v LB, Graf č. 17 při kultivaci v BSM. Každou hodinu byl odebrán vzorek a změřena jeho OD_{600} pomocí spektrofotometru.

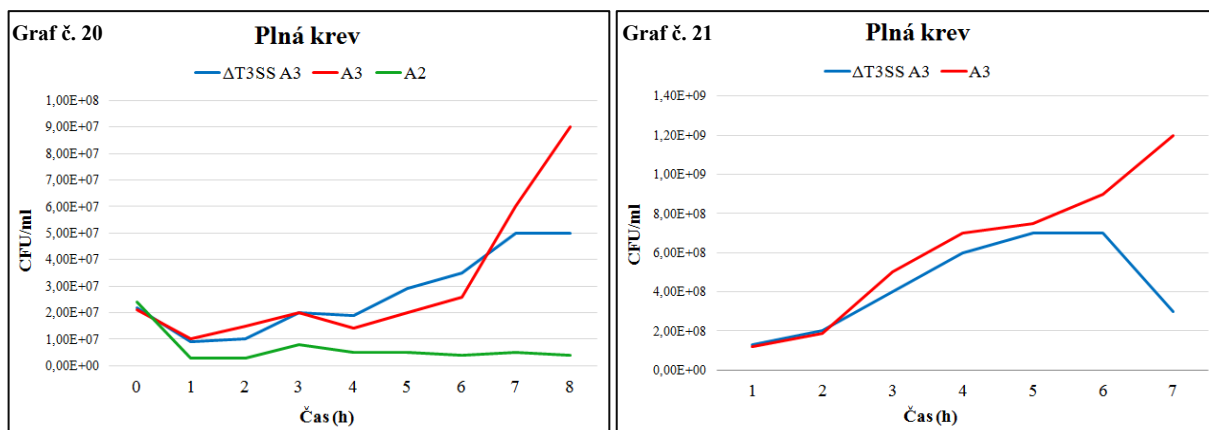
Schopnost růstu izolátů v 10% sputu (w/v; BSM) byla měřena pomocí metody dropcount popsané výše (viz kapitola 4.1.4. Růstové křivky). Naměřená hodnota OD 0,5 odpovídá přibližně počtu 3×10^8 CFU/ml. Měření bylo opakováno celkem třikrát a výsledky jsou zobrazeny v Grafu č. 18, ze kterého je evidentní, že mutantnímu izolátu $\Delta T3SS$ A3 se v 10% sputu daří daleko lépe než původnímu krevnímu izolátu A3 ($p = 0,017948$) a dokonce také lépe než izolátu získanému ze sputa A2 ($p = 0,01613$). Měření schopnosti přežití a růstu v tepelně inaktivovaném séru bylo pomocí metody dropcount provedeno také celkem třikrát. Během tohoto měření jsme nezaznamenali žádné statisticky významné rozdíly ve schopnosti růstu jednotlivých izolátů. Výsledky z měření růstu v tepelně inaktivovaném séru jsou znázorněny v Grafu č. 19.



Graf č. 18-19. Graf č. 18 znázorňuje růstové křivky pro jednotlivé izoláty ($\Delta T3SS$ A3, A3, A2) při kultivaci v 10% směsném sputu od pacientů s CF. Každou hodinu bylo odebráno 10 μ l a proveden dropcount ke stanovení počtu CFU/ml. Graf č. 19 znázorňuje růstové křivky pro jednotlivé izoláty ($\Delta T3SS$ A3, A3, A2) při kultivaci v tepelně inaktivovaném směsném séru od pacientů s CF. Každou hodinu byl odebrán vzorek a změřena OD_{600} pomocí spektrofotometru.

Nakonec jsme pomocí metody dropcount testovali schopnost růstu izolátů ($\Delta T3SS$ A3, A3 a A2) v plné krvi (Graf č. 20). Z grafu je patrné, že izolát A2 získaný ze sputa nebyl schopen se v plné krvi replikovat a držel se pouze na hladině přežívání (průměrně $5 - 6 \times 10^6$ CFU/ml). Oproti tomu izolát A3 získaný z krve v plné krvi schopnost replikace prokázal.

U mutantního izolátu byla pozorována snížená schopnost replikace v porovnání s izolátem z krve. Toto pozorování jsme potvrdili i při opakované kultivaci izolátů $\Delta T3SS$ A3 a A3 v plné krvi (Graf č. 21). V grafu je viditelný statisticky významný pokles v replikaci u mutantního izolátu $\Delta T3SS$ A3 v porovnání s původním izolátem z krve, A3 ($p = 0,000388$). Získané výsledky nasvědčují tvrzení, že exprese T3SS má vliv na schopnosti bakterií přežít a replikovat se v plné krvi.

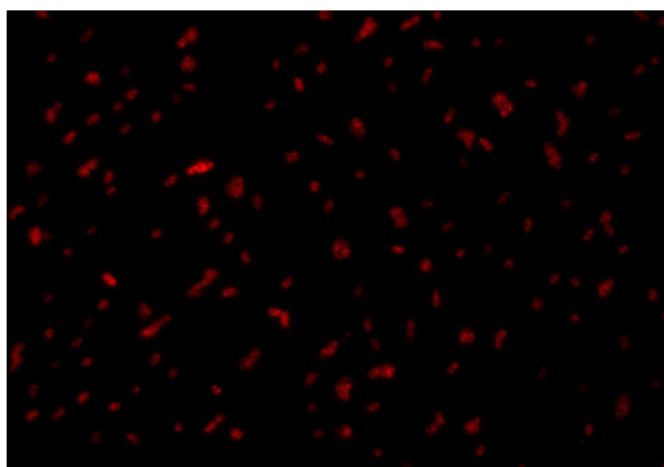


Graf č. 20-21. Graf č. 20 znázorňuje růstové křivky pro jednotlivé izoláty ($\Delta T3SS A3$, A3, A2) při kultivaci v plné krvi. Každou hodinu bylo odebráno 10 μl a proveden dropcount ke stanovení počtu CFU/ml. V grafu č. 21 je znázorněno opakování měření růstových křivek v plné krvi pouze u izolátů $\Delta T3SS A3$ a A3. Měření bylo provedeno také pomocí metody dropcount.

4.2.5. Testování izolátů na makrofázích

Vložení plazmidu pJT04 do ST32 izolátů

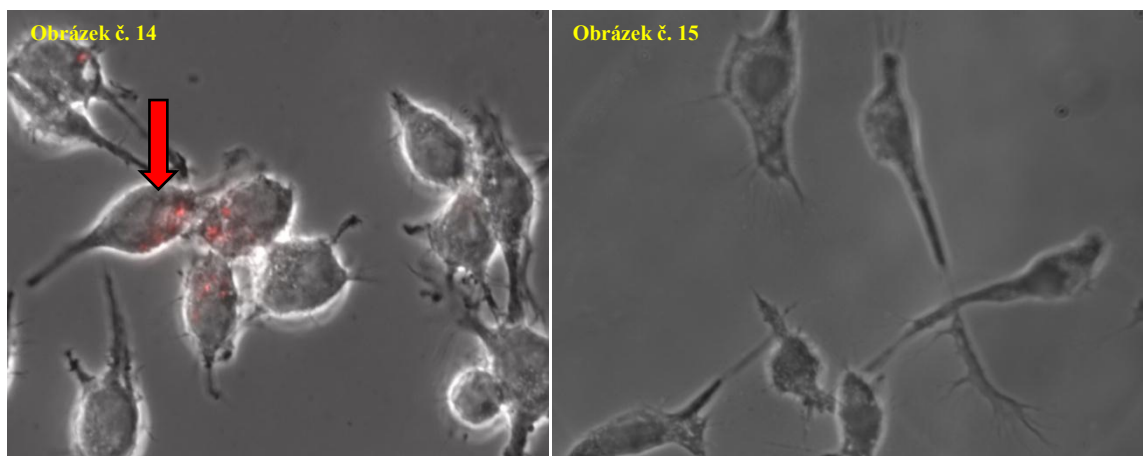
Vložení plazmidu pJT04 do ST32 izolátů ($\Delta T3SS A3$, A3 a A2) bylo potvrzeno pomocí cíleného PCR pro *mCherry* gen a následně vizualizací ve fluorescenčním mikroskopu (Obrázek č. 13).



Obrázek č. 13. *Burkholderia cenocepacia* ST32 po vložení plazmidu pJT04 s genem pro fluorescenční protein (*mCherry*).

Stanovení vhodné MOI

Při testování vhodné infekční dávky pro vlastní experimenty na makrofázích jsme jako první zvolili MOI 10. Tímto způsobem jsme otestovali ST32 izoláty A3 a A2. Z Obrázku č. 14 je patrné, že izolát získaný z krve, A3, viditelně infikoval makrofágy (šipkou označené infekční ložisko). Na rozdíl od toho, MOI 10 byla velmi nedostačující pro infikování makrofágů izolátem ze sputa, A2 (Obrázek č. 15).



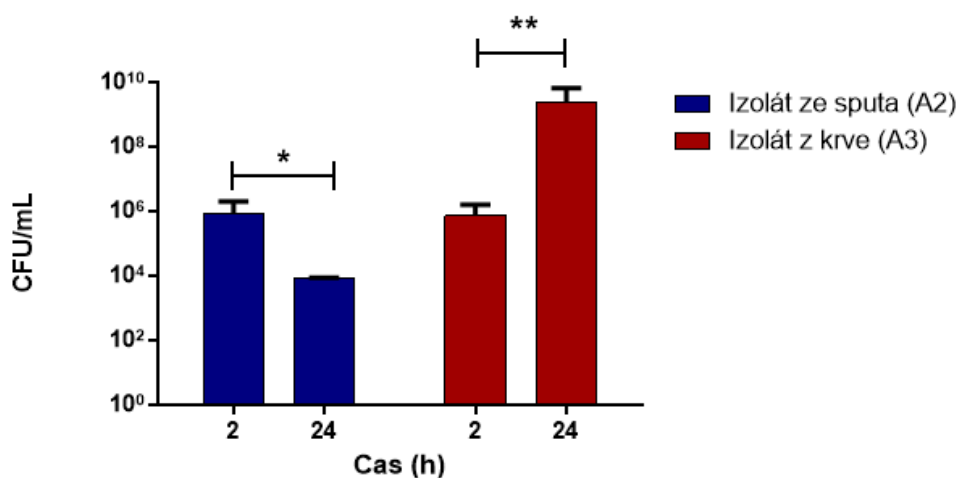
Obrázek č. 14 a 15. Makrofágová buněčná linie RAW 267.3 po infikování ST32 izoláty při MOI 10. Na Obrázku č. 14 jsou makrofágy infikované izolátem z krve (A3), šipkou je označeno viditelné infekční ložisko. Na Obrázku č. 15 jsou makrofágy infikované izolátem ze sputa (A2) při stejné MOI. Z obrázku je patrné, že nedošlo k žádné infekci makrofágů.

Na základě těchto výsledků jsme pro následné experimenty na makrofázích upravili MOI ST32 izolátu, kterou jsme stanovili pro oba ST32 izoláty stejně, na MOI 30.

Gentamicinový test

Gentamicinový test pro porovnání přežívání bakterií v makrofázích byl proveden pouze pro izoláty A2 (izolát ze sputa) a A3 (izolát z krve), u kterých se nám podařilo získat izoláty citlivé na gentamicin. Senzitivita na gentamicin je nezbytná pro vlastní provedení testu (viz kapitola 4.1.5. Testování izolátů na makrofázích – gentamicinový test).

Během experimentu jsme získali velmi zajímavé výsledky. Izolát získaný ze sputa (A2) nebyl schopen vůbec žádné replikace v makrofázích, zatímco izolát získaný z krve (A3) tuto schopnost prokázal (Graf č. 22). Oba izoláty během experimentu vykazaly schopnost být fagocytovány.



Graf č. 22: Výsledky získané při porovnání schopnosti izolátů A2 a A3 replikace v makrofázích. Z grafu je patrné, že zatímco izolát získaný z krve (A3) se replikuje v makrofázích (nárůst počtu CFU/ml v čase, ** $p = 0,0043$), izolát získaný ze sputa (A2) tuto schopnost nemá. (pokles počtu CFU/ml v čase, * $p = 0,0238$)

4.3. Diskuze

V rámci této části dizertační práce jsme se zaměřili na jeden vybraný faktor virulence, a to T3SS. U bakterií *P. aeruginosa* je aktivace a zvýšená exprese tohoto systému spojována se zhoršujícím se klinickým stavem pacienta a může být brána jako prediktor špatné prognózy¹⁵³. V publikaci Baer a spol. se v rámci *P. aeruginosa* zabývají otázkou tvorby protilátky proti strukturnímu proteinu T3SS¹⁵⁶.

My jsme si pro hlubší studium T3SS vybrali přístup mutagenese, kdy jsme se rozhodli provést delecí celého klastru genů pro tento systém. Pro vlastní mutagenesi jsme si vybrali krevní izolát *B. cenocepacia* ST32 od pacienta A (A3). Mutagenese byla provedena na základě opublikované metodiky „Triparental mating assay“¹¹¹. Během tvorby mutantního izolátu se vyskytlo hned několik problému. Prvním problémem byla rozsáhlá rezistence vybraného izolátu k velkému množství antibiotik. Na základě publikace S. R. Maloy a spol.¹⁵⁵ se nám podařilo získat tetracyklin senzitivní kolonie. Ovšem je otázkou, zda jsme touto selekcí neovlivnili určité vlastnosti daného izolátu (izolát z krve, izolát ze sputa), jelikož se musel přizpůsobit ztíženým selekčním podmínkám pro růst.

V případě genů pro T3SS se jedná o velmi rozsáhlou oblast genomu (cca 30 kb), tudíž příprava mutantního izolátu byla velmi náročná, a ve většině případů jsme v rámci druhého crossing overu dosáhli pouze uspořádání genomu do původního stavu. Nakonec se nám ovšem podařilo získat mutantní izolát s deletovanou oblastí celého T3SS. Tato delecce byla potvrzena nejen pomocí specifického PCR, ale také sekvenačně.

S nově získaným mutantním izolátem Δ T3SS A3, původním krevním izolátem A3 a izolátem získaným ze sputa A2 jsme provedli několik funkčních experimentů. Na základě publikace Cohena a spol.¹⁵⁷, který popisuje, že T3SS systém je velmi důležitý pro tvorbu biofilmu, a to ve fázi přichycení buňky na povrch, jsme se rozhodli vliv T3SS na tvorbu biofilmu u ST32 otestovat. Zjistili jsme, že izolát Δ T3SS A3 nebyl schopen tvorby biofilmu (Graf č. 15). Největší schopnost tvorby biofilmu byla pozorována u izolátu A2 získaného ze sputa. To nás vede k domněnce, že bakterie v plicích jsou více připravené na tvorbu biofilmu, než je tomu u bakterií získaných přímo z krve.

Dále jsme porovnávali schopnost růstu izolátů Δ T3SS A3, A3 a A2 v různých kultivačních médiích. Při kultivaci izolátů v 10% sputu jsme pozorovali, že izolátu Δ T3SS A3 se dařilo mnohem lépe replikovat než izolátu z krve (A3, $p = 0,017948$) a dokonce i lépe než izolátu získanému ze sputa (A2, $p = 0,01613$). Tyto výsledky nasvědčují tomu, že přítomnost T3SS (izolát A3, A2) je zhoršující podmínkou pro růst ST32 bakterií ve sputu. Zajímavých výsledků

jsme dosáhli také při kultivaci jednotlivých izolátů v plné krvi (Graf č. 20 a 21). Zdá se, že zatímco izolát získaný ze sputa (A2) vůbec není schopen replikace v plné krvi, u izolátu získaného z krve je tomu naopak. U mutantního izolátu Δ T3SS A3 byla pozorována jistá schopnost replikace, která se však v čase zlomila. Toto pozorování si vysvětlujeme faktem, že T3SS byl popsán jako důležitý faktor pro přežívání a replikaci bakterií v makrofázích¹⁰². T3SS pomáhá bakteriím pohlceným makrofágy uniknout z fagosomu a tím se volně replikovat uvnitř makrofágů.

Na základě těchto informací jsme se rozhodli pro studium přežívání bakterií v makrofázích pomocí gentamicinového testu. V tomto případě znovu nastala komplikace, jelikož naše izoláty jsou vysoce rezistentní vůči gentamicinu potřebnému v této metodě. Proto jsme museli izoláty podrobit další mutagenезi s cílenou delecí genů pro efluxní pumpu pro gentamicin¹¹². Mutantní kolonie, citlivé na gentamicin se nám sice podařilo získat, ale bohužel pouze u izolátů A2 a A3. Dvojitý mutantní izolát Δ T3SS A3 senzitivní na gentamicin se nám zatím získat nepodařilo.

Získané izoláty, citlivé na gentamicin byly podrobeny studiu na makrofázích. Během experimentu bylo potvrzeno, že krevní izolát A3 má schopnost replikovat se v makrofázích, zatímco izolát ze sputa (A2) nikoliv (Graf č. 22). Toto pozorování podporuje naše přesvědčení, že T3SS by mohl mít určitý vliv na přechod bakterií z plic do krevního oběhu a jeho aktivace by mohla být důležitá pro následné přežití bakterií v krvi.

Výsledky získané v rámci studia T3SS posílily naši snahu sledovat hladinu exprese u žijících pacientů s chronickou infekcí *B. cenocepacia* ST32. Zvýšení hladiny exprese některého z genů pro T3SS by mohlo být varovným signálem přechodu těchto bakterií do krve. Zároveň se T3SS systém zdá být vhodným terapeutickým cílem, jako je tomu u *P. aeruginosa*¹⁵⁸.

5. SURVEILLANCE INFEKČÍ BAKTERIEMI *P. AERUGINOSA*

Cíl: S využitím genotypizačních technik zkontrolovat a pravidelně mapovat epidemiologickou situaci infekci bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s CF v pražském CF centru a vyloučit případné epidemické šíření jednoho kmene.

Hypotéza: Bakterie *P. aeruginosa* patří mezi nejčastější infekční agens u pacientů s CF. Ve světě se již vyskytlo několik případů výskytu nebezpečného šíření epidemického kmene *P. aeruginosa*.

Autorské publikace k tématu: Publikace č. 2

5.1. Metodika

V rámci této části práce byly vyšetřovány vzorky *P. aeruginosa* získané od pacientů s CF pravidelně navštěvující pražské CF centrum. Pro prvotní detekci byla použita metoda nested PCR pro gen *oprL*. Zároveň byly všechny vzorky vyšetřeny také kultivačně a pomocí MALDI-TOF.

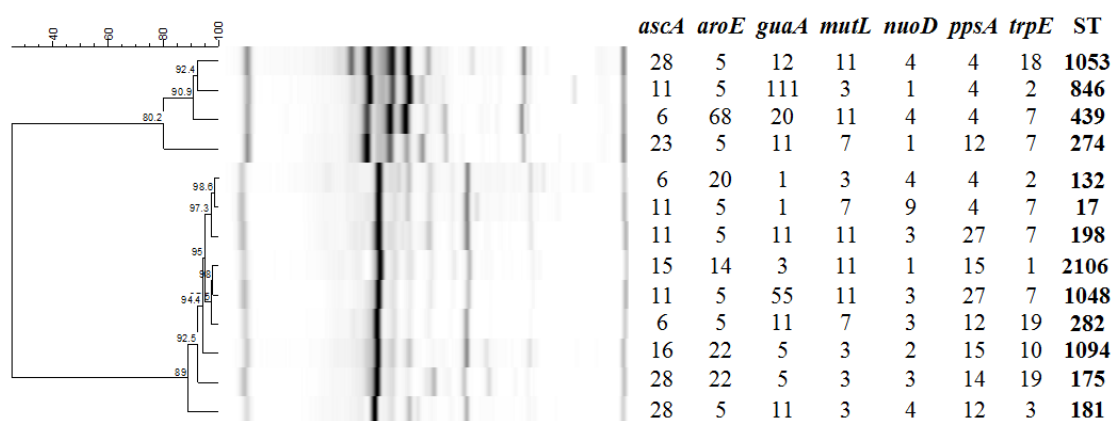
Následné určení kmenové příslušnosti bylo provedeno pomocí metod RAPD a/nebo MLST^{34 159}. RAPD fragmenty byly separovány pomocí přístroje Bioanalyzer 2100 (Agilent) a profily jednotlivých izolátů byly zpracovávány pomocí programu BioNumerics (AppliedMaths).

5.2. Výsledky

5.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

V období devíti let jsme genotypizačními metodami vyšetřili celkem 342 izolátů *P. aeruginosa* od 131 pacientů s CF. Na základě Leedsových kritérií definice infekcí způsobených *P. aeruginosa*¹⁰ bylo určeno, že 99 pacientů trpělo chronickou infekcí a zbývajících 32 pacientů odpovídalo definici intermitentní infekce.

Při sestavování protokolu pro sledování epidemiologické situace *P. aeruginosa* u pacientů s CF jsme vycházeli z postupu zavedeného u bakterií Bcc³⁴. Bohužel u *P. aeruginosa* jsme u metody RAPD narazili na problém tvorby pseudoklastrů tvořených více než jedním ST (Obrázek č. 16), na rozdíl od Bcc, kde jeden klastř odpovídal jednomu ST.



Obrázek č. 16. Srovnání výsledků metod RAPD a MLST u izolátů *P. aeruginosa* od různých pacientů s CF. Analýza RAPD profilů nekoreluje s výslednými sekvenčními typy získanými pomocí MLST. V rámci RAPD vznikají pseudoklastry s více ST. Převzato a upraveno z publikace¹⁵⁹.

Pro srovnání metod MLST a RAPD jsme následně provedli retrospektivní pilotní studii, kdy bylo vyšetřeno 54 izolátů od 14 pacientů. Během této analýzy jsme zjistili, že v rámci jednoho pacienta je zde jasně patrná shoda mezi výsledky RAPD a MLST, kdy změna ST u MLST odpovídá změně profilu získaného metodou RAPD (Tabulka č. 6).

Pacient	Datum izolátu	MLST výsledek	RAPD výsledek
A	04/2005	ST1021	
	02/2006	ST1021	
	08/2011	ST296	
B	01/2007	ST282	
	02/2010	ST282	
	02/2013	ST282	
C	03/2005	ST17	
	11/2006	ST17	
	11/2009	ST17	
D	5/2005	ST198	
	01/2006	ST198	
	03/2010	ST198	
E	09/2005	ST308	
	03/2006	ST1197	
	09/2010	ST27	
	02/2012	ST27	
F	03/2005	ST1058*	
	08/2006	ST1055	
	10/2010	ST1055	
G	04/2005	ST1050	
	10/2006	ST1050	
	01/2011	ST1050	
H	09/2006	ST260	
	10/2009	ST175	
	12/2011	ST267	
I	10/2009	ST1196	
	09/2010	ST2120	
	11/2010	ST1196	
J	05/2010	ST258	
	07/2011	ST258	
	12/2013	ST258	

K	05/2010	ST279	
	09/2012	ST279	
	09/2013	ST235	
L	12/2009	ST266	
	02/2012	ST357	
	01/2013	ST357	
M	09/2006	ST1090	
	03/2010	ST1090	
N	11/2009	ST179	
	03/2012	ST1210	
	04/2013	ST1210	

Tabulka č. 6. Porovnání výsledků metodik MLST a RAPD u izolátů od 14 chronicky infikovaných pacientů. Převzato a upraveno z publikace ¹⁵⁹. *ST1058 se od ST1055 liší mutací pouze jednoho nukleotidu v genu *ppsA*.

Jediná výjimka byl pacient F, kde se podle RAPD profilu jedná o stejný kmen *P. aeruginosa*. Ovšem metoda MLST odhalila dva různé sekvenční typy. V tomto případě se však jedná o záměnu pouze jednoho nukleotidu v rámci konkatenované MLST sekvence. Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli využívat metodu RAPD pouze pro analýzu v rámci jednoho pacienta, pro sledování zda u něho došlo k infekci novým kmenem či nikoliv.

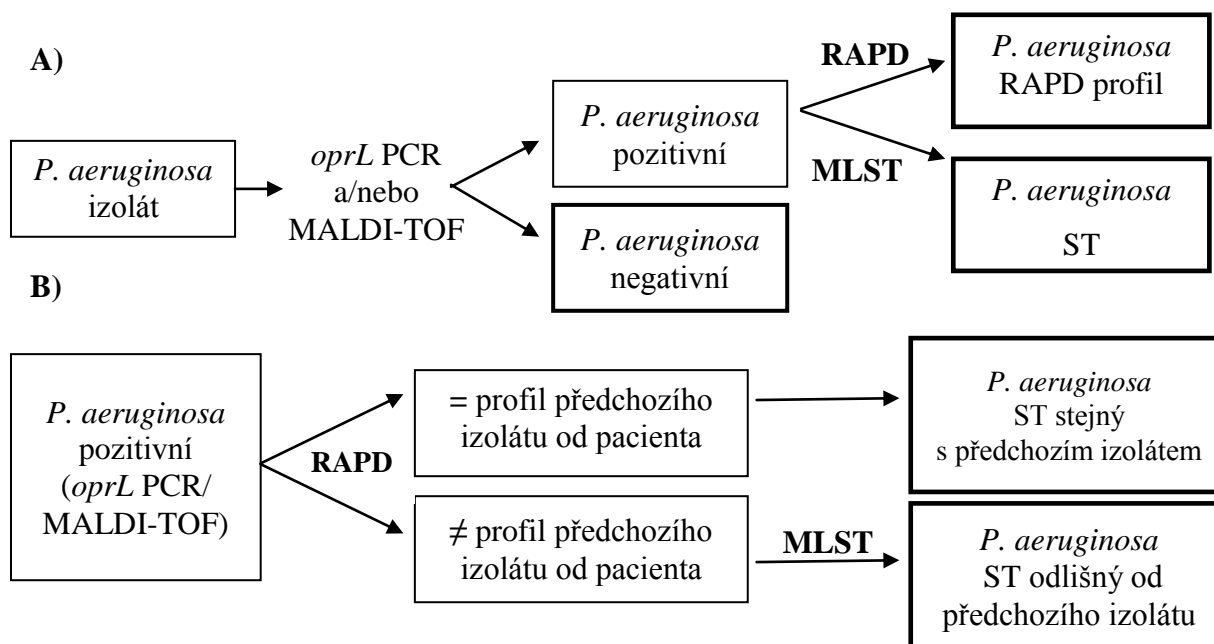
Metodou MLST jsme odhalili 97 různých kmenů *P. aeruginosa* (ST) u testovaných pacientů s CF. Nejčastěji se objevoval kmen ST253 (10 pacientů), ovšem nenalezli jsme zde žádnou spojitost s jeho případným epidemickým šířením. Dále se u sedmi pacientů vyskytl kmen ST175 a vždy u šesti pacientů kmeny ST395 a ST179. Šíření epidemického kmene *P. aeruginosa* mezi pacienty z pražského CF centra bylo během této studie vyloučeno.

Z celkem 131 vyšetřených pacientů si 110 pacientů udrželo po celou dobu sledování stejný kmen *P. aeruginosa*. U zbylých 21 pacientů byla pozorována změna RAPD, infekce novým ST byla potvrzena pomocí MLST (vždy s rozdílem minimálně ve 3 alelách).

Zajímalo nás, zda u pacientů, kteří v průběhu infekce *P. aeruginosa* změnili ST, bylo zaznamenáno období obsahující negativní vzorky. U 8 z 21 pacientů, kteří změnili ST, byla pozorována nepřetržitá pozitivita testovaných vzorků, tudíž bez metody RAPD bychom nezaznamenali změnu v kmeni způsobující infekci. U zbylých 13 pacientů bylo pozorováno různě dlouhé období negativních vzorků *P. aeruginosa*.

Velmi zajímavé bylo pozorování u 18 ze 32 intermitentně infikovaných pacientů, kdy byla zaznamenána přerušovaná infekce, ovšem vždy jedním ST *P. aeruginosa*.

Na základě všech těchto poznatků jsme sestavili protokol pro vyšetřování infekcí *P. aeruginosa* a zachycení případného šíření epidemického kmenu u pacientů s CF (Obrázek č. 17).



Obrázek č. 17. Schéma vyšetřování infekcí způsobených bakteriemi *P. aeruginosa*. Převzato a upraveno z publikace 159.

A) Při prvozáchytu je kultura *P. aeruginosa* potvrzena pomocí nested PCR genu *oprL* a MALDI-TOF. Při získání druhého pozitivního vzorku od pacienta (vyloučení kontaminace či úspěšně eradikované infekce) je tento vzorek podroben metodám RAPD a MLST.

B) U chronicky infikovaných pacientů dochází k vyšetření izolátu jednou za rok. Po potvrzení positivity *P. aeruginosa* ovšem dochází k provedení pouze metody RAPD. Získaný RAPD profil se porovná s RAPD profilem předcházejícího izolátu. Pokud jsou profily identické, uzavřeme izolát jako stejný ST kmen předchozího izolátu. Pokud RAPD profily vykazují rozdíly, následuje MLST analýza nového izolátu se zařazením do nového ST.

5.3. Diskuze

Poslední část práce byla zaměřena na zhodnocení a sledování epidemiologické situace u bakterií *P. aeruginosa* u pacientů v pražském CF centru, což se stalo již tradiční náplní práce laboratoře a díky té jsem si také na začátku svého postgraduálního studia osvojila základní molekulárně genetickou a mikrobiologickou práci.

Práce se věnovala zhodnocení epidemiologické situace u bakterií *P. aeruginosa* a zvolení finančně a časově nejméně náročného přístupu pro její sledování. Vycházeli jsme ze zkušeností získaných při sledování bakterií *Bcc* ^{35 34} a rozhodli jsme se pro kombinaci genotypizačních metod RAPD a MLST.

Bohužel v případě RAPD jsme zjistili, že u *P. aeruginosa* dochází při porovnání profilů od všech pacientů k tvorbě pseudoklastrů obsahujících více ST určených metodou MLST. Ovšem stejný

izolát si pokaždé drží stejný RAPD profil, tudíž při sledování izolátů pouze od jednoho pacienta můžeme zjistit, zda došlo ke změně profilu a následně tuto změnu ST potvrdit pomocí MLST¹⁵⁹. K dalším překvapivým závěrům jsme došli díky hlubšímu studiu výskytu negativních období mezi jednotlivými izoláty u pacienta. Zjistili jsme, že u poměrně velké části pacientů (8 z 99) s domněle chronickou infekcí se ve skutečnosti jedná o reinfekce jiným kmenem, které by bez využití molekulárních technik byly nerozpoznatelné. Na druhou stranu u velké části dlouhodobě intermitentních pacientů (18 z 32) bylo zjištěno, že se ve skutečnosti jedná o chronickou infekci, kdy dochází k falešně negativním nálezům u pacienta pravděpodobně v důsledku antibiotické léčby. Bedlivé posouzení kategorie stavu infekce má přitom pro pacienta velké důsledky jak ve smyslu izolačních opatření na klinice, tak i v terapeutickém přístupu (intermitentní, resp. jednorázové nálezy infekce se léčí jinak než chronická infekce).

Věříme, že námi zavedený postup vyšetřování, kombinující levný a rychlý RAPD s dražším, ale vysoce rozlišujícím MLST, je nejschůdnějším přístupem pro dlouhodobé sledování epidemiologické situace u *P. aeruginosa*.

6. DALŠÍ SMĚRY VÝZKUMU

Tato práce si kladla za cíl podkrýt molekulární mechanismy zodpovídající a účastníci se přechodu bakterií *B. cenocepacia* ST32 do krve, který má ve většině případů za následek pro pacienta smrtelný cepacia syndrom. Studie porovnávající expresní profil izolátu získaného ze sputa a izolátu získaného z krve odhalil desítky již popsanych i neznámých genů se změnou exprese. Během této práce jsme se zaměřili na sledování některých genů klastru pro T3SS, které byly v rámci krevních izolátů zvýšené ve všech kultivačních podmínkách.

Podařilo se nám zavést metodiku pro sledování exprese vybraných genů přímo z klinického materiálu získaného od pacienta, ze sputa. Momentálně v naší laboratoři probíhá pilotní studie zaměřená na sledování změn exprese dvou genů pro T3SS (BCAM2053 a BCAM2055) u vybraných pacientů s CF trpících chronickou ST32 infekcí.

V rámci této pilotní studie by mělo dojít k vyhodnocení, zda jde o souvislost mezi zvýšeným T3SS a zhoršením stavu pacienta, nebo zda je toto zvýšení spojeno přímo se spuštěním cepacia syndromu. Je potřeba zjistit, zda ke zvýšení exprese genů pro T3SS dochází ještě před rozvojem cepacia syndromu u izolátů ze sputa či se jedná o fenomén spojený až s krevním izolátem.

Stejně je potřeba sledovat korelaci výsledků exprese genu *fliC* pro tvorbu bičíku a funkčního testu pro sledování motility bakterií. Pro statistické zhodnocení funkčnosti sledování exprese těchto genů a korelace mezi nimi je potřeba nasbírat větší množství dat v čase od více pacientů trpících chronickou infekcí ST32.

Zatím bylo zvýšení exprese genů pro T3SS ve většině případů pozorováno až v období těsně před propuknutím cepacia syndromu. Proto by bylo dobré úzce spojit metodiku qRT-PCR s funkčním testem pro motilitu bakterií, kdy při významném poklesu motility bakterií by mělo dojít k častějšímu (minimálně každý měsíc) testování exprese genů pro T3SS.

Další variantou by mohlo být zaměření se na regulační geny pro T3SS, kdy sledování jejich exprese by nás mohlo varovat dříve. Pokud se potvrdí spojitost těchto markerů s nastupujícím cepacia syndromem, dalo by se předčasně terapeuticky zasáhnout a potlačit tak rozvoj cepacia syndromu.

Rozhodli jsme se pro hlubší studium T3SS pomocí cílené mutagenese. Během této studie se nám i přes spoustu komplikací podařilo získat krevní izolát mutantní pro celý klastr genů pro T3SS. Zároveň se nám podařilo uskutečnit několik základních testů pro porovnání mutantního a nemutantního krevního izolátu spolu s izolátem ze sputa. Dalším cílem by mohlo být získání dvojitého mutantního izolátu Δ T3SS citlivého na gentamicin. Tento dvojitý mutantní izolát by

mohl být podroben testování na makrofázích, kdy se sleduje schopnost bakterií infikovat makrofágy a jejich schopnost přežití a replikace uvnitř makrofágů.

Současná technologie umožňuje fluorescenční značení různých signálních molekul a jejich sledování pomocí fluorescenční mikroskopie. Takto lze sledovat změny u mutovaných i nemutovaných izolátů při expozici makrofágové buněčné linii.

Dále ve spolupráci s doktorkou Amal Amer z Univerzity Ohio plánujeme podrobit náš mutovaný krevní izolát experimentu přímo na CF makrofázích, kde bychom měli dosáhnout ještě většího přiblížení *in vivo* situace u pacientů s CF.

Následovat bude také testování vlivu T3SS na virulenci porovnáním krevního izolátu a Δ T3SS krevního izolátu na zvířecích modelech. Studie proběhne ve spolupráci s laboratoří doktorky Annette Vergunst z Univerzity Montpellier na jejich dobře zavedeném modelu *D. rerio*.

Ve spolupráci s pracovištěm profesora Miguela Valvana na Queen's Univerzitě v Belfastu bude virulence našich izolátů testována také na modelu *G. mellonella*.

Pokud se potvrdí náš předpoklad vlivu T3SS na virulenci a tím zhoršení stavu pacienta, jako je tomu například u bakterií *P. aeruginosa*¹⁵⁸, mohlo by se na tento systém začít pohlížet jako na vhodný terapeutický cíl, kdy by mohlo dojít k potlačení replikace bakterií v makrofázích a tím zamezení jejich šíření krevním řečištěm.

7. ZÁVĚR

Tato dizertační práce plynule navazuje na práci doc. MUDr. Pavla Dřevínka, PhD. a Mgr. Kláry Vilimovské Dědečkové, PhD, kteří se zabývali epidemiologickou studií bakterií *Burkholderia cepacia* komplexu u pacientů s CF.

Podařilo se nám identifikovat geny, které se liší při porovnání transkriptomových profilů izolátů získaných z krve a izolátů získaných ze sputa ve všech použitých kultivačních podmínkách. Z těchto genů jsme se nakonec zaměřili na geny pro tvorbu T3SS a na gen *fliC* pro tvorbu bičíku. Dále jsme zavedli sledování exprese genů u bakterií přímo z klinického materiálu (sputum) bez potřeby *in vitro* kultivace izolátů.

Zjistili jsme, že s přibližujícím se cepacia syndromem dochází ve většině případů ke zvýšení exprese některých genů pro T3SS (kratší časový úsek před CS) a zároveň ke snižování exprese genu pro tvorbu bičíku (delší časový úsek před CS). Pro potvrzení ztráty motility byl zaveden jednoduchý funkční test. Vhodná kombinace těchto dvou přístupů by nám měla pomoci lépe monitorovat aktuální stav pacienta a případně nás upozornit na blížící se hrozbu cepacia syndromu.

Pro hlubší porozumnění T3SS jsme vytvořili krevní izolát mutantní pro celý klastr genů pro tento systém. Během několika funkčních testů jsme zpozorovali, že T3SS má patrně význam pro přežití a replikaci bakterií v plné krvi. Předběžné výsledky z experimentů na makrofágové buněčné línii potvrdily, že krevní izolát má daleko lepší schopnost replikace v makrofázích než je tomu u izolátu ze sputa. V plánu je hlubší studium vlivu T3SS na virulenci a schopnost přežití bakterií *B. cenocepacia* ST32 v krvi.

Vyloučili jsme také šíření epidemického kmene *P. aeruginosa* mezi pacienty z pražského CF centra a sestavili jsme nejvhodnější a nejefektivnější postup pro vyšetření těchto bakterií u pacientů s CF v naší laboratoři.

8. LITERATURA

1. Sommerburg, O. *et al.* Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *J. Cyst. Fibros.* **13**, 15–23 (2014).
2. Vávrová, V., Brázová, J., Bartošová, J. & Dřevínek, P. *Cystická fibróza*. (Grada Publishing, 2006).
3. Křenková, P. *et al.* Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J. Cyst. Fibros.* **12**, 532–537 (2013).
4. Gibson, R. L., Burns, J. L. & Ramsey, B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 918–951 (2003).
5. Nussbaum, R. L., McInnes, R. R. & Willard, H. F. *Klinická genetika*. (Triton).
6. Quintana-Gallego, E., Delgado-Pecellín, I. & Calero Acuña, C. CFTR Protein Repair Therapy in Cystic Fibrosis. *Arch. Bronconeumol. (English Ed.)* **50**, 146–150 (2014).
7. Lynch, S. V & Bruce, K. D. The Cystic Fibrosis Airway Microbiome. 1–8 (2013).
8. Holland, I. B. in *Protein Secretion SE - 1* (ed. Economou, A.) **619**, 1–20 (Humana Press, 2010).
9. Foundation, C. F. 2013 CFF Annual Data Report to the Center Directors. (2013).
10. Lee, T. W. R., Brownlee, K. G., Conway, S. P., Denton, M. & Littlewood, J. M. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **2**, 29–34 (2003).
11. Cystic Fibrosis Foundation. *Natl. patient Regist. 2011 Annu. Data Rep.* (2012).
12. Gallant, C. V, Raivio, T. L., Olson, J. C., Woods, D. E. & Storey, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity. 1891–1899 (2015).
13. Nixon, G. M. *et al.* Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J. Pediatr* **138**, 699–704. (2001).
14. Mahenthalingam, E., Campbell, M. E. & Speert, D. P. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **62**, 596–605. (1994).
15. Hancock, R. E. W. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis : A Class of Serum-Sensitive , Nontypable Strains Deficient in Lipopolysaccharide O Side Chains. **42**, 170–177 (1983).
16. Speert, D. P. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Biosci* **7**, e354–61. (2002).
17. Pedersen, S. S., Koch, C., Høiby, N. & Rosendal, K. An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *J. Antimicrob. Chemother.* **17**, 505–516 (1986).
18. Cheng, K. *et al.* Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* **348**, 639–642 (1996).
19. Jones, A. M. *et al.* Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* **358**, 557–8. (2001).
20. Armstrong, D. S. *et al.* Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 983–7. (2002).
21. Romling, U., Kader, A., Sriramulu, D. D., Simm, R. & Kronvall, G. Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Env. Microbiol* **7**, 1029–1038 (2005).
22. Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R. & LiPuma, J. J. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3427–3436 (2001).
23. Coenye, T. & Vandamme, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* **5**, 719–729 (2003).
24. Mahenthalingam, E., Urban, T. A. & Goldberg, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* **3**, 144–156 (2005).
25. Peeters, C. *et al.* *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 483–489 (2013).
26. Burkholder, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* **40**, 115–117 (1950).
27. Yabuuchi, E. *et al.* Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* **36**, 1251–75. (1992).
28. Smet, B. D. *et al.* *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2015). doi:10.1099/ijs.0.000251
29. Vial, L., Chapalain, A., Groleau, M. C. & Déziel, E. The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: A tribute to adaptation. *Environ. Microbiol.* **13**, 1–12 (2011).

30. Jones, A. M., Dodd, M. E., Doherty, C. J., Govan, J. R. & Webb, A. K. Increased treatment requirements of patients with cystic fibrosis who harbour a highly transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax* **57**, 924–5. (2002).
31. Isles, A. *et al.* *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* **104**, 206–10. (1984).
32. Baldwin, A. *et al.* Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **43**, 4665–4673 (2005).
33. Dedeckova, K. *et al.* PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex as one of key factors to handle a long-term outbreak. *J. Cyst. Fibros.* **11**, 440–445 (2012).
34. Dedeckova, K., Kalferstova, L., Strnad, H., Vavrova, J. & Drevinek, P. Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **12**, 475–481 (2013).
35. Dedeckova, K. *et al.* PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex as one of key factors to handle a long-term outbreak. *J. Cyst. Fibros.* **11**, 440–445 (2012).
36. Vandamme, P. *et al.* *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Res Microbiol* **154**, 91–6. (2003).
37. Ortega, X. *et al.* Reconstitution of O-specific lipopolysaccharide expression in *Burkholderia cenocepacia* strain J2315, which is associated with transmissible infections in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* **187**, 1324–1333 (2005).
38. Drevinek, P. & Mahenthalingam, E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect* **16**, 821–830 (2010).
39. Jones, A. M. *et al.* *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* **59**, 948–951 (2004).
40. Speert, D. P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M. & Mahenthalingam, E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* **8**, 181–7. (2002).
41. Mahenthalingam, E. *et al.* Infection with *Burkholderia cepacia* Complex Genomovars in Patients with Cystic Fibrosis: Virulent Transmissible Strains of Genomovar III Can Replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* **33**, 1469–75. (2001).
42. Mahenthalingam, E., Baldwin, A. & Vandamme, P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* **51**, 533–8. (2002).
43. Baldwin, A., Sokol, P. A., Parkhill, J. & Mahenthalingam, E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **72**, 1537–1547 (2004).
44. Govan, J. R. *et al.* Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* **342**, 15–19. (1993).
45. Sun, L. *et al.* The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat Med* **1**, 661–6. (1995).
46. Baldwin, A. *et al.* Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **46**, 290–295 (2008).
47. Holden, M. T. G. *et al.* The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* **91**, 261–277 (2009).
48. Chen, J. S., Witzmann, K. A., Spilker, T., Fink, R. J. & LiPuma, J. J. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr* **139**, 643–9. (2001).
49. Coenye, T., Spilker, T., Van Schoor, A., LiPuma, J. J. & Vandamme, P. Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax* **59**, 952–954 (2004).
50. Kumar, a. *et al.* Genetic relatedness of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from five cystic fibrosis centers in Michigan. *Respir. Med.* **91**, 485–492 (1997).
51. Segonds, C. *et al.* Genotypic analysis of *Burkholderia cepacia* isolates from 13 French cystic fibrosis centers. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2055–2060 (1997).
52. Cunha, M. V *et al.* Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J Clin Microbiol* **41**, 4113–4120 (2003).
53. Aaron, S. D., Ferris, W., Henry, D. A., Speert, D. P. & Macdonald, N. E. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1206–12. (2000).
54. St. Denis, M. *et al.* Infection with *Burkholderia cepacia* complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Chest* **131**, 1188–1196 (2007).
55. Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P. & Sokol, P. a. Quorum Sensing in *Burkholderia cepacia* : Identification of the LuxRI Homologs CepRI Quorum Sensing in *Burkholderia cepacia* : Identification of the LuxRI Homologs CepRI. **181**, 748–756 (1999).

56. O'Grady, E. P., Viteri, D. F., Malott, R. J. & Sokol, P. A. Reciprocal regulation by the CepIR and CciIR quorum sensing systems in Burkholderia cenocepacia. *BMC Genomics* **10**, 441 (2009).
57. McCarthy, Y. *et al.* A sensor kinase recognizing the cell-cell signal BDSF (cis-2-dodecenoic acid) regulates virulence in Burkholderia cenocepacia. *Mol. Microbiol.* **77**, 1220–1236 (2010).
58. Tyrrell, J. *et al.* Investigation of the multifaceted iron acquisition strategies of Burkholderia cenocepacia. *BioMetals* **28**, 367–380 (2015).
59. Thomas, M. S. Iron acquisition mechanisms of the Burkholderia cepacia complex. *Biometals* **20**, 431–452 (2007).
60. Agnoli, K., Lowe, C. A., Farmer, K. L., Husnain, S. I. & Thomas, M. S. The ornibactin biosynthesis and transport genes of Burkholderia cenocepacia are regulated by an extracytoplasmic function sigma factor which is a part of the Fur regulon. *J Bacteriol* **188**, 3631–3644 (2006).
61. Whitby, P. W. *et al.* Burkholderia cenocepacia utilizes ferritin as an iron source. *J. Med. Microbiol.* **55**, 661–668 (2006).
62. SITES, S. W., Plautz, M. W., Bailey, K., O'Brien-Ladner, A. R. & Wesselius, L. J. Increased concentrations of iron and isoferritins in the lower respiratory tract of patients with stable cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 796–801 (1999).
63. Holden, M. T. *et al.* The genome of Burkholderia cenocepacia J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol* **191**, 261–277 (2009).
64. Hutchison, M. L., Poxton, I. R. & Govan, J. R. Burkholderia cepacia produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. *Infect Immun* **66**, 2033–2039 (1998).
65. Corbett, C. R., Burtnick, M. N., Kooi, C., Woods, D. E. & Sokol, P. A. An extracellular zinc metalloprotease gene of Burkholderia cepacia. *Microbiology* **149**, 2263–2271 (2003).
66. Kooi, C., Subsin, B., Chen, R., Pohorelic, B. & Sokol, P. a. Burkholderia cenocepacia ZmpB is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence. *Infect. Immun.* **74**, 4083–4093 (2006).
67. Kooi, C. & Sokol, P. a. Burkholderia cenocepacia zinc metalloproteases influence resistance to antimicrobial peptides. *Microbiology* **155**, 2818–2825 (2009).
68. Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700 (2002).
69. Saldias, M. S., Ortega, X. & Valvano, M. A. Burkholderia cenocepacia O antigen lipopolysaccharide prevents phagocytosis by macrophages and adhesion to epithelial cells. *J Med Microbiol* **58**, 1542–1548 (2009).
70. Sajjan, U. S., Xie, H., Lefebvre, M. D., Valvano, M. A. & Forstner, J. F. Identification and molecular analysis of cable pilus biosynthesis genes in Burkholderia cepacia. *Microbiology* **149**, 961–971 (2003).
71. Lefebvre, M. & Valvano, M. In vitro resistance of Burkholderia cepacia complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. *Microbiology* **147**, 97–109 (2001).
72. Lefebvre, M. D., Flannagan, R. S. & Valvano, M. A. A minor catalase/peroxidase from Burkholderia cenocepacia is required for normal aconitase activity. *Microbiology* **151**, 1975–1985 (2005).
73. Keith, K. E. & Valvano, M. A. Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from Burkholderia cenocepacia. *Infect Immun* **75**, 2451–2460 (2007).
74. Keith, K. E., Killip, L., He, P., Moran, G. R. & Valvano, M. a. Burkholderia cenocepacia C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *J. Bacteriol.* **189**, 9057–9065 (2007).
75. Ades, S. E. Control of the alternative sigma factor σ^{24} in Escherichia coli. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 157–162 (2004).
76. Flannagan, R. S. & Valvano, M. A. Burkholderia cenocepacia requires RpoE for growth under stress conditions and delay of phagolysosomal fusion in macrophages. *Microbiology* **154**, 643–653 (2008).
77. Saldias, M. S., Lamothe, J., Wu, R. & Valvano, M. a. Burkholderia cenocepacia requires the RpoN sigma factor for biofilm formation and intracellular trafficking within macrophages. *Infect. Immun.* **76**, 1059–1067 (2008).
78. Welman, A. D. & Maddox, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**, 269–274 (2003).
79. Zlosnik, J. E. *et al.* Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the Burkholderia cepacia complex. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1470–1473 (2008).
80. Ryall, B. *et al.* The Mucoid Switch in *Pseudomonas aeruginosa* Represses Quorum Sensing Systems and Leads to Complex Changes to Stationary Phase Virulence Factor Regulation. *PLoS One* **9**, e96166 (2014).
81. Govan, J. R. & Deretic, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia. *Microbiol Rev* **60**, 539–74. (1996).
82. Tomich, M., Herfst, C. A., Golden, J. W. & Mohr, C. D. Role of flagella in host cell invasion by Burkholderia cepacia. *Infect Immun* **70**, 1799–1806 (2002).

83. Urban, T. A. *et al.* Contribution of Burkholderia cenocepacia flagella to infectivity and inflammation. *Infect Immun* **72**, 5126–5134 (2004).
84. Drevinek, P. *et al.* Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when Burkholderia cenocepacia grows in cystic fibrosis sputum. *BMC Infect Dis* **8**, 121 (2008).
85. Estrela, A. B., Heck, M. G. & Abraham, W.-R. Novel approaches to control biofilm infections. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1512–1530 (2009).
86. Huber, B. *et al.* The cep quorum-sensing system of Burkholderia cepacia H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**, 2517–2528 (2001).
87. Riedel, K. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in mixed biofilms. *Microbiology* **147**, 3249–3262 (2001).
88. Tomlin, K. L., Coll, O. P. & Ceri, H. Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Can. J. Microbiol.* **47**, 949–954 (2001).
89. Schwab, U. *et al.* Patterns of epithelial cell invasion by different species of the Burkholderia cepacia complex in well-differentiated human airway epithelia. *Infect Immun* **70**, 4547–55. (2002).
90. Loutet, S. A. & Valvano, M. A. A decade of Burkholderia cenocepacia virulence determinant research. *Infect Immun* (2010). at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20643851
91. Bernier, S. P., Nguyen, D. T. & Sokol, P. a. A LysR-type transcriptional regulator in Burkholderia cenocepacia influences colony morphology and virulence. *Infect. Immun.* **76**, 38–47 (2008).
92. Aubert, D. F., Flannagan, R. S. & Valvano, M. a. A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in Burkholderia cenocepacia. *Infect. Immun.* **76**, 1979–1991 (2008).
93. Cunha, M. V. *et al.* Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the Burkholderia cepacia complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3052–3058 (2004).
94. Huber, B. *et al.* Genetic analysis of functions involved in the late stages of bio film development. *Burkholderia cepacia H111. Mol Microbiol* **46**, 411–426 (2002).
95. Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. J. & Coenye, T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2655–2661 (2011).
96. Holland, I. B. in *Protein Secretion SE - I* (ed. Economou, A.) **619**, 1–20 (Humana Press, 2010).
97. Thomas, S., Holland, I. B. & Schmitt, L. The Type I secretion pathway - The hemolysin system and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1629–1641 (2014).
98. Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G. J. & Sandkvist, M. Type II secretion: From structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 175–186 (2006).
99. Cianciotto, N. P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**, 581–588 (2005).
100. Mueller, C. a., Broz, P. & Cornelis, G. R. The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol. Microbiol.* **68**, 1085–1095 (2008).
101. Zimaro, T. *et al.* The type III protein secretion system contributes to Xanthomonas citri subsp. citri biofilm formation. *BMC Microbiol.* **14**, 96 (2014).
102. Burtnick, M. N., DeShazer, D., Nair, V., Gherardini, F. C. & Brett, P. J. Burkholderia mallei cluster 1 type VI secretion mutants exhibit growth and actin polymerization defects in RAW 264.7 murine macrophages. *Infect. Immun.* **78**, 88–99 (2010).
103. High, N., Mounier, J., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. IpaB of Shigella flexneri causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. **1**, 1991–1999 (1999).
104. Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J. & Tang, C. M. Life on the inside : the intracellular. **7**, 333–341 (2009).
105. Shafikhani, S. H., Morales, C. & Engel, J. The Pseudomonas aeruginosa type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. **10**, 994–1007 (2008).
106. Christie, P. J., Whitaker, N. & González-Rivera, C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 1578–1591 (2014).
107. Henderson, I. R., Navarro-García, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter Story Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter Story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692–744 (2004).
108. Jani, A. J. & Cotter, P. a. Type VI Secretion: Not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* **8**, 2–6 (2010).

109. Langille, M. G. I., Hsiao, W. W. L. & Brinkman, F. S. L. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 373–382 (2010).
110. Mahenthiralingam, E., Simpson, D. A. & Speert, D. P. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **35**, 808–16. (1997).
111. Flannagan, R. S., Linn, T. & Valvano, M. a. A system for the construction of targeted unmarked gene deletions in the genus *Burkholderia*. *Environ. Microbiol.* **10**, 1652–1660 (2008).
112. Hamad, M. a., Skeldon, A. M. & Valvano, M. a. Construction of aminoglycoside-sensitive *Burkholderia cenocepacia* strains for use in studies of intracellular bacteria with the gentamicin protection assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3170–3176 (2010).
113. O’Callaghan, D. & Vergunst, A. Non-mammalian animal models to study infectious disease: worms or fly fishing? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 79–85 (2010).
114. Sokol, P. A., Darling, P., Woods, D. E., Mahenthiralingam, E. & Kooi, C. Role of ornibactin biosynthesis in the virulence of *Burkholderia cepacia*: characterization of *pvdA*, the gene encoding L-ornithine N(5)-oxygenase. *Infect Immun* **67**, 4443–55. (1999).
115. Vergunst, A. C., Meijer, A. H., Renshaw, S. A. & O’Callaghan, D. *Burkholderia cenocepacia* creates an intra-macrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infect Immun* **78**, 1495–1508 (2010).
116. Köthe, M. *et al.* Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. *Cell. Microbiol.* **5**, 343–351 (2003).
117. Castonguay-Vanier, J., Vial, L., Tremblay, J., Déziel, E. & Leulier, F. *Drosophila melanogaster* as a Model Host for the *Burkholderia cepacia* Complex. *PLoS One* **vol. 5**, e11467–
118. Seed, K. D. & Dennis, J. J. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect. Immun.* **76**, 1267–1275 (2008).
119. Uehlinger, S. *et al.* Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infect Immun* **77**, 4102–4110 (2009).
120. Ferrandon, D., Imler, J.-L., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. The *Drosophila* systemic immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **vol. 7**, 862–874 (2007).
121. Adams, M. D. *et al.* The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (80-.)*. **287**, 2185 (2000).
122. Lamothe, J., Huynh, K. K., Grinstein, S. & Valvano, M. a. Intracellular survival of *Burkholderia cenocepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. *Cell. Microbiol.* **9**, 40–53 (2007).
123. Saldias, M. S. & Valvano, M. A. Interactions of *Burkholderia cenocepacia* and other *Burkholderia cepacia* complex bacteria with epithelial and phagocytic cells. *Microbiology* **155**, 2809–2817 (2009).
124. Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M. & Boor, K. J. Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 527–543 (2005).
125. Saini, L. S. Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* complex isolates in the presence of macrophage cell activation. *Microbiology* **145 (Pt 1)**, 3465–3475 (1999).
126. Van Vliet, A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiol. Lett.* **302**, 1–7 (2010).
127. Sorek, R. & Cossart, P. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 9–16 (2010).
128. Zhang, W., Li, F. & Nie, L. Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: Application and methodologies. *Microbiology* **156**, 287–301 (2010).
129. Sass, A., Drevinek, P. & Sokol, P. in *Burkholderia: from genomes to function* (eds. Coenye, T. & Mahenthiralingam, E.) 77–98 (Caister Academic Press, 2014).
130. Malone, J. H. & Oliver, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.* **9**, 34 (2011).
131. Oh, S., Yoder-Himes, D. R., Tiedje, J., Park, J. & Konstantinidis, K. T. Evaluating the performance of oligonucleotide microarrays for bacterial strains with increasing genetic divergence from the reference strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2980–2988 (2010).
132. Conway, T. & Schoolnik, G. K. Microarray expression profiling: Capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol. Microbiol.* **47**, 879–889 (2003).
133. Leiske, D. L., Karimpour-Fard, A., Hume, P. S., Fairbanks, B. D. & Gill, R. T. A comparison of alternative 60-mer probe designs in an in-situ synthesized oligonucleotide microarray. *BMC Genomics* **7**, 72 (2006).
134. Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*
135. Ehrenreich, A. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 255–273 (2006).

136. Marguerat, S. & Bähler, J. RNA-seq: from technology to biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 569–579 (2010).
137. Croucher, N. J. & Thomson, N. R. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 619–624 (2010).
138. Yoder-Himes, D. R. *et al.* Mapping the Burkholderia cenocepacia niche response via high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3976–3981 (2009).
139. Sass, A. M. *et al.* Genome-wide transcription start site profiling in biofilm-grown Burkholderia cenocepacia J2315. *BMC Genomics* **16**, 775 (2015).
140. Kalferstova, L., Kolar, M., Fila, L., Vavrova, J. & Drevinek, P. Gene expression profiling of Burkholderia cenocepacia at the time of cepacia syndrome: loss of motility as a marker of poor prognosis? *J. Clin. Microbiol.* **53**, JCM.03605–14 (2015).
141. Dobbin, K., Shih, J. H. & Simon, R. Statistical design of reverse dye microarrays. *Bioinformatics* **19**, 803–810 (2003).
142. Smyth, G. K. in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor SE - 23* (eds. Gentleman, R., Carey, V., Huber, W., Irizarry, R. & Dudoit, S.) 397–420 (Springer New York, 2005). doi:10.1007/0-387-29362-0_23
143. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
144. Loutet, S. a. & Valvano, M. a. A decade of Burkholderia cenocepacia virulence determinant research. *Infect. Immun.* **78**, 4088–4100 (2010).
145. Ferreira, A. S. *et al.* Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical Burkholderia strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 441–50 (2010).
146. O’Grady, E. P., Viteri, D. F. & Sokol, P. a. A unique regulator contributes to quorum sensing and virulence in Burkholderia cenocepacia. *PLoS One* **7**, (2012).
147. Sokol, P. A. *et al.* The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of Burkholderia cenocepacia respiratory infections. *Microbiology* **149**, 3649–3658 (2003).
148. Loutet, S. A., Di Lorenzo, F., Clarke, C., Molinaro, A. & Valvano, M. A. Transcriptional responses of Burkholderia cenocepacia to polymyxin B in isogenic strains with diverse polymyxin B resistance phenotypes. *BMC Genomics* **12**, 472 (2011).
149. Sass, A., Marchbank, A., Tullis, E., LiPuma, J. J. & Mahenthiralingam, E. Spontaneous and evolutionary changes in the antibiotic resistance of Burkholderia cenocepacia observed by global gene expression analysis. *BMC Genomics* **12**, 373 (2011).
150. Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A. & Bleves, S. Cross Talk between Type III Secretion and Flagellar Assembly Systems in Pseudomonas aeruginosa . *J. Bacteriol.* **189**, 3124–3132 (2007).
151. Diaz, M. R., King, J. M. & Yahr, T. L. Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in Pseudomonas Aeruginosa. *Front. Microbiol.* **2**, 89 (2011).
152. Amiel, E., Lovewell, R. R., O’Toole, G. A., Hogan, D. A. & Berwin, B. Pseudomonas aeruginosa Evasion of Phagocytosis Is Mediated by Loss of Swimming Motility and Is Independent of Flagellum Expression . *Infect. Immun.* **78**, 2937–2945 (2010).
153. Roy-Burman, a *et al.* Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic Pseudomonas aeruginosa infections. *J. Infect. Dis.* **183**, 1767–1774 (2001).
154. Zlosnik, J. E. a. *et al.* Swimming Motility in a Longitudinal Collection of Clinical Isolates of Burkholderia cepacia Complex Bacteria from People with Cystic Fibrosis. *PLoS One* **9**, e106428 (2014).
155. Maloy, S. R. & Nunn, W. D. Selection for Loss of Tetracycline Resistance by Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **146**, 831 (1981).
156. Baer, M. *et al.* An engineered human antibody fab fragment specific for Pseudomonas aeruginosa PcrV antigen has potent antibacterial activity. *Infect. Immun.* **77**, 1083–1090 (2009).
157. Cohen, T. S. & Prince, A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat. Med.* **18**, 509–19 (2012).
158. Galle, M., Carpentier, I. & Beyaert, R. Structure and function of the Type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 831–42 (2012).
159. Kalferstova, L., Dedeckova, K. V., Antuskova, M., Melter, O. & Drevinek, P. How and why to monitor Pseudomonas aeruginosa infections in the long term at a cystic fibrosis centre. *J. Hosp. Infect.* - (2015). doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2015.09.010

9. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ

- Tabulka č. 1** Seznam vybraných izolátů od pacientů s cepacia syndromem.
- Tabulka č. 2** Seznam genů se změněnou expresí při porovnání všech krevních izolátů se sputovými izoláty.
- Tabulka č. 3** Souhrn počtu genů se změněnou expresí při analýzách microarray dat zaměřených na kultivační podmínku.
- Tabulka č. 4** Výsledky kvantitativního PCR při testování změny exprese (krevní versus sputový izolát) u 6 genů faktorů virulence.
- Tabulka č. 5** Výsledky kvantitativního PCR další skupiny vybraných genů.
- Tabulka č. 6** Porovnání výsledků metodik MLST a RAPD u izolátů od 14 chronicky infikovaných pacientů.
-
- Obrázek č. 1** Třídy mutací CFTR proteinu.
- Obrázek č. 2** Výskyt nejčastějších patogenů v jednotlivých věkových kategoriích u pacientů s CF (2013).
- Obrázek č. 3** Prospěšné a škodlivé působení bakterií z Bcc.
- Obrázek č. 4** Fylogenetický strom Bcc sestavený na základě MLST analýzy.
- Obrázek č. 5** Struktura a mechanismus antibiotické rezistence u bakterií *B. cepacia* komplexu.
- Obrázek č. 6** Zobrazení sekrečních systému typu I – VI u Bcc.
- Obrázek č. 7A, B** Mapy plazmidů pGPI-SceI (A) a pDAI-SceI (B).
- Obrázek č. 8** Obrázek gelu pro kontrolu kvality mRNA po extrakci a přečištění MICROBEnrich kitem.
- Obrázek č. 9A, B** Fotografie z elektronového mikroskopu, bavení 1% uranyl acetát.
- Obrázek č. 10** Fotografie ploten při měření schopnosti motility bakterií po 120 h.
- Obrázek č. 11** Obrázek plazmidu pDA-12.
- Obrázek č. 12** Schématický obrázek navržených PCR reakcí pro ověření průběhu druhého crossing overu.
- Obrázek č. 13** *Burkholderia cenocepacia* ST32 po vložení plazmidu pJT04 s genem pro fluorescenční protein (mcherry).
- Obrázek č. 14** Makrofágová buněčná linie RAW 267.3 po infikování ST32 izolátem při MOI 10.

- Obrázek č. 15** Makrofágová buněčná linie RAW 267.3 po infikování ST32 izolátem při MOI 10.
- Obrázek č. 16** Srovnání výsledků metod RAPD a MLST u izolátů *P. aeruginosa* od různých pacientů s CF.
- Obrázek č. 17** Schéma vyšetřování infekcí způsobených bakteriemi *P. aeruginosa*.
- Graf č. 1 - 4** Relativní kvantita exprese genů pro T3SS (BCAM2044, BCAM2048, BCAM2050, BCAM2053 a BCAM2055) a genu *fliC* (BCAL0114) pro tvorbu bičíku u vždy 5 ST32 izolátů od 4 pacientů s CF.
- Graf č. 5** Relativní kvantita exprese genů pro T3SS (BCAM2048, BCAM2050, BCAM2053 a BCAM2055) a genu *fliC* (BCAL0114) pro tvorbu bičíku po přímé extrakci bakteriální RNA z klinického materiálu (sputum) od pacienta P.
- Graf č. 6** Přehled schopnosti motility u izolátu od pacientů P, který prodělal cepacia syndrom.
- Graf č. 7-14** Přehled schopnosti motility u izolátů od pacientů A-H, kteří prodělali cepacia syndrom.
- Graf č. 15** Hodnoty absorbance pro jednotlivé izoláty (Δ T3SS A3, A3 a A2) získané při měření schopnosti tvorby biofilmu.
- Graf č. 16** Růstové křivky pro jednotlivé izoláty (Δ T3SS A3, A3 a A2) při kultivaci v LB.
- Graf č. 17** Růstové křivky pro jednotlivé izoláty (Δ T3SS A3, A3 a A2) při kultivaci v BSM.
- Graf č. 18** Růstové křivky pro jednotlivé izoláty (Δ T3SS A3, A3 a A2) při kultivaci v 10% směsném sputu od pacientů s CF.
- Graf č. 19** Růstové křivky pro jednotlivé izoláty (Δ T3SS A3, A3 a A2) při kultivaci v tepelně inaktivovaném směsném séru od pacientů s CF.
- Graf č. 20** Růstové křivky pro jednotlivé izoláty (Δ T3SS A3, A3 a A2) při kultivaci v plné krvi.
- Graf č. 21** Opakování měření růstových křivek v plné krvi pouze u izolátů Δ T3SS A3 a A3.
- Graf č. 22** Výsledky získané při porovnání schopnosti replikace v makrofázích u izolátů A2 a A3.

III. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Souhrn počtu genů se změněnou expresí při analýzách microarray dat zaměřených na zdroj izolátu.

	Počet genů se změnou exprese	up-regulované	down-regulované
(i) inkubace ve Sputu			
- Izoláty pacientů A a B dohromady (A3 a B8 vs. A2 a B7)	41	31	10
- Pouze izoláty od pacienta A (A3 vs. A2)	210	113	97
- Pouze izoláty od pacienta B (B8 vs. B7)	139	90	49
(ii) inkubace v Séru			
- Izoláty pacientů A a B dohromady (A3 a B8 vs. A2 a B7)	20	13	7
- Pouze izoláty od pacienta A (A3 vs. A2)	145	99	46
- Pouze izoláty od pacienta B (B8 vs. B7)	90	47	53
(iii) inkubace v kontrolním médiu			
- Izoláty pacientů A a B dohromady (A3 a B8 vs. A2 a B7)	57	24	33
- Pouze izoláty od pacienta A (A3 vs. A2)	34	28	6
- Pouze izoláty od pacienta B (B8 vs. B7)	188	92	96
(iv) všechny kultivační podmínky dohromady			
- Izoláty pacientů A a B dohromady (A3 a B8 vs. A2 a B7)	60	41	19
- Pouze izoláty od pacienta A (A3 vs. A2)	95	65	30
- Pouze izoláty od pacienta B (B8 vs. B7)	129	63	66

Příloha č. 1. Souhrn počtu genů se změněnou expresí při analýzách microarray dat zaměřených na zdroj izolátu. Změny v expresi pozorované při porovnání izolátu získaných z krve s izoláty získanými ze sputa. Převzato a upraveno z publikace ¹⁴⁰.

Příloha č. 2: Seznam genů a na ně navržených primerů vybraných pro testování genové exprese na real time PCR.

Název Genu	Funkce	Primer
RecA_F	<i>recA</i> , rekombináza A	GAAAAGCAGTTCGGCAAGGG
RecA_R		CGGCATATTGAACGTCGAGC
BCAM0079F	Sekundární metabolismus	TCACGGAACTTTCGGGTGTT
BCAM0079R		CCTTCGTGAAAATCCGCCAC
BCAM0081F	Vnější membránový protein	CAACATCAAGCTCAGCAATC
BCAM0081R		AATCGATGTTGTACGTCAGG
BCAM0184F	<i>bclB</i> , lektin	CGTGCTCGACCGGAT
BCAM0184R		GTGTCGCTTTCGAGAAGTA
BCAM0784F	LysR regulační protein	CCACCTATCCCAACATCAAG
BCAM0784R		CGTTCAGGTCGAACCATT
BCAM0859_F	<i>bceF</i> , tvorba pouzdra	TCGCTACAACGATCTCGACG
BCAM0859_R		TGCTGGTTCAGGTACGACTG
BCAM0860_F	<i>bceG</i> , tvorba pouzdra	CTGAACAAGGGGCTCGACTC
BCAM0860_R		GAGGTGATGATTGCCGACGA
BCAM0863F	<i>bceJ</i> , glykosyltransferáza	AAGAGTCCGTAATATCCGTT
BCAM0863R		CCGTTGTAGATCACGCTG
BCAM1870_F	<i>cepl</i> , quorum sensing	CCGTATCTGCTGAAGTCGCT
BCAM1870_R		GACGCCATCTACCTGCTTC
BCAM1871_F	Quorum sensing	GCGGACTGGCTCGAATATCA
BCAM1871_R		TCGTCATCGTCAACCTGTCTG
BCAM2044F	Sekreční systém typu III	CTCGTGGAAGCCGATCGTAA
BCAM2044R		GTACTGGACGCTCGAACAGG
BCAM2048_F	Sekreční systém typu III	CGCGAAGTACCAGGAGATCG
BCAM2048_R		GTCGTCGGCTTCAGACATGA
BCAM2050_F	Sekreční systém typu III	CGACGACGAAGCGCCGTA
BCAM2050_R		GCCAGTCCCATGACGCAA
BCAM2053F	Sekreční systém typu III	TGGTTTCGAACGTCGCAGT
BCAM2053R		GACACGAAGCAAGTCCAGCA
BCAM2055F	Sekreční systém typu III	CGTCTTGGTGACGATGTTGC
BCAM2055R		CCGGGCTATCAGGATTCGTC
BCAM2329F	GntR regulační protein	TATTCGCTGTTCCCGATGA
BCAM2329R		GTGATGACGATCTCCTCCAG
BCAM2685F	Hypotetický protein	TACAGGACGATCGGCACGAG
BCAM2685R		CATCCTCGCCCTACTGCAAA
BCAL3283F	Hypotetický protein	AACATGCACGATGCCAA
BCAL3283R		CGCTTGTCGGGATATTCAA
G4822F	LysRtranskripční regulátor	CGAAGGACCCGTTAGGCAAT
G4822R		AGTGCATCTGAGCCTTCACC

Příloha č. 2: Seznam genů a na ně navržených primerů vybraných pro testování genové exprese na real time PCR.

Příloha č. 3a: Seznam genů se změněnou expresí při porovnání izolátu z krve a izolátu ze sputa od pacienta A

Název genu	Anotace nebo putativní funkce genu	Změna v expresi
BCAL0112	Adenosylhomocysteinase	4.9 ↓
BCAL0113	Flagellar hook-associated 2 domain protein	4.4 ↓
BCAL0114	Flagellin-like protein	14.6 ↓
BCAL0125	Flagellar transcriptional regulator FlhC 1	4.6 ↓
BCAL0126	Flagellar motor component-like protein	4.1 ↓
BCAL0127	OmpA/MotB domain protein., Flagellar motor protein	2.4 ↓
BCAL0128	Response regulator receiver	3.8 ↓
BCAL0129	Chemotaxis two-component sensor kinase CheA	4.6 ↓
BCAL0132	Chemotaxis protein methyltransferase CheR	4.1 ↓
BCAL0134	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	2.8 ↓
BCAL0514	Hypothetical protein	2.2 ↓
BCAL0534	Two component LuxR family transcriptional regulator	2.9 ↓
BCAL0535	Putative signal transduction histidine kinase	2.9 ↓
BCAL0577	Flagellar hook-associated protein 3	5.4 ↓
BCAL1028_J_0_1	Transposase IS116/IS110/IS902 family protein	2.7 ↓
BCAL2025	Hypothetical protein	4.5 ↓
BCAL2610	ABC-type amino acid transport systém	2.3 ↓
BCAL2611	Histidine transport system permease protein	2.4 ↓
BCAL2612	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein	3.1 ↓
BCAL2793	4-hydroxybenzoate transporter	3.4 ↓
BCAL2796	Pyruvate decarboxylase	2.2 ↓
BCAL3205a	Transcriptional regulator, XRE family	3.6 ↓
BCAL3207	Hypothetical protein	2.4 ↓
BCAM1002	Putative reverse transcriptase-Group II intron	2.0 ↓
BCAM1804	Methyl-accepting chemotaxis protein	3.6 ↓
BCAM2346	OmpW family protein	2.1 ↓
BCAM2684	GCN5-related N-acetyltransferase	3.1 ↓
BCAM2685	Hypothetical protein	5.3 ↓
BCAM2837_J_1	Response regulator receiver	2.1 ↓
IG1_147730	Flagellar motor component-like protein	6.2 ↓
BCAL0009	Putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	3.8 ↑
BCAL0010	Phenylalanine-4-hydroxylase	20.8 ↑
BCAL0015	ABC transporter, hydrophobic amino acid uptake transporter	2.5 ↑

	(HAAT) family	
BCAL0016	Amino acid/amide ABC transporter ATP-binding protein 2	2.1 ↑
BCAL0017	ABC branched-chain amino acid family transporter	2.1 ↑
BCAL0049	Aminotransferase class I and II	2.8 ↑
BCAL0052	FAD linked oxidase domain protein	2.3 ↑
BCAL0833	Putative Acetoacetyl-CoA reductase	3.2 ↑
BCAL0834	Hypothetical protein	2.8 ↑
BCAL1040	Glycosyl transferase	2.1 ↑
BCAL1236	Hypothetical protein	3.3 ↑
BCAL2450	Chromate transporter	2.0 ↑
BCAL2471	ATPase-like protein	2.5 ↑
BCAL2472	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	2.9 ↑
BCAL2739	Elongation factor G 1	7.2 ↑
BCAL2740	High-affinity nickel-transporter	2.2 ↑
BCAL3008	Outer membrane protein (Porin)	2.0 ↑
BCAL3184	Homogentisate 1,2-dioxygenase	8.8 ↑
BCAL3185	Major facilitator superfamily MFS 1	2.9 ↑
BCAL3186	Hypothetical protein	6.0 ↑
BCAL3187	Monoxygenase FAD-binding	6.3 ↑
BCAL3194	Membrane protein	2.1 ↑
BCAL3195	Uncharacterized protein	6.8 ↑
BCAL3282	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	4.7 ↑
BCAL3283	Prevent-host-death family protein	6.4 ↑
BCAL3284	PilT protein domain protein	5.0 ↑
BCAM0059	3-oxoadipate CoA-transferase	2.6 ↑
BCAM0783	General substrate transporter:Major facilitator superfamily	2.5 ↑
BCAM0803	Muconolactone delta-isomerase	2.7 ↑
BCAM0804	Catechol 1,2-dioxygenase	4.5 ↑
BCAM0805	Muconate cycloisomerase	7.6 ↑
BCAM0810	Anthranilate 1,2-dioxygenase large subunit	5.6 ↑
BCAM0811	Anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit	7.6 ↑
BCAM0856_J_1	Sugar transferase	5.0 ↑
BCAM0859	Capsular exopolysaccharide family	2.8 ↑
BCAM0860	Glycosyl transferase, family 2	4.6 ↑
BCAM0861	Glycosyltransferase-like protein	2.9 ↑
BCAM0863	Glycosyltransferase	2.9 ↑
BCAM1005	Acyltransferase 3	3.0 ↑
BCAM1010	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	3.2 ↑
BCAM1172	FAD dependent oxidoreductase	16.2 ↑

BCAM1173	Gaba permease (4-amino butyrate transport carrier)	6.2 ↑
BCAM1176	DMSO reductase anchor subunit (DmsC)	3.5 ↑
BCAM1180	Predicted permease	3.9 ↑
BCAM1185	Hypothetical protein	2.2 ↑
BCAM1186	Putative NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5.1 ↑
BCAM1416	Lysine exporter protein	3.3 ↑
BCAM1417	Sensor protein copS	2.2 ↑
BCAM1418	Two component heavy metal response transcriptional regulator	2.0 ↑
BCAM1421	Cation/multidrug efflux pump	5.5 ↑
BCAM1869	Hypothetical protein	2.4 ↑
BCAM2043_J_0	Hypothetical protein	3.1 ↑
BCAM2046	Type III secretion protein SctT	2.4 ↑
BCAM2049	BcscL, type III secretion apparatus protein	3.9 ↑
BCAM2050	BcscK, Putative uncharacterized protein	5.6 ↑
BCAM2051	Type III secretion apparatus lipoprotein	3.7 ↑
BCAM2053	Hypothetical protein	4.7 ↑
BCAM2055	Type III secretion outer membrane pore	3.4 ↑
BCAM2073	Hypothetical protein	2.5 ↑
BCAM2165	Beta-lactamase	2.3 ↑
BCAM2503	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3.8 ↑
BCAS0251	Hypothetical protein	3.4 ↑
BCAS0637	60 kDa chaperonin 2	2.7 ↑
BCAS0638	10 kDa chaperonin 3	2.3 ↑
IG2_943874	UDP-glucose dehydrogenase	4.2 ↑

Příloha č. 3a. Seznam genů se změněnou expresí při porovnání izolátu z krve a izolátu ze sputa (kultivovaných ve všech podmínkách) pouze od pacienta A (analýza iv, Tabulka č. 3). Anotace genu ponechána v anglickém jazyce. Převzato a upraveno z publikace ¹⁴⁰.

Příloha č. 3b: Seznam genů se změněnou expresí při porovnání izolátu z krve a izolátu ze sputa od pacienta B

Název genu	Anotace nebo putativní funkce genu	Změna v expresi
AU1054_G2878	GntR, transcriptional regulatory protein	2.8 ↓
BCAL0009	Putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	3.3 ↓
BCAL0010	Phenylalanine-4-hydroxylase	14.9 ↓
BCAL0011	AsnC family transcriptional regulator	2.6 ↓
BCAL0145	Adenosylhomocysteinase	2.3 ↓
BCAL0147	Methylenetetrahydrofolate reductase	2.8 ↓
BCAL0560	Peptidase M24	2.7 ↓
BCAL0650	Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	4.3 ↓
BCAL1227	LysR family Transcriptional regulator	2.5 ↓
BCAL1252	General substrate transporter	2.2 ↓
BCAL1391	Cellulose synthase operon protein C	3.51 ↓
BCAL1395	Cellulose synthase (UDP-forming)	6.4 ↓
BCAL1396	Cellulose synthase operon protein YhjU	3.1 ↓
BCAL1677	Type 1 fimbrial protein	6.34 ↓
BCAL1723	Precorrin-3 methyltransferase	2.2 ↓
BCAL1726	Cobalamin biosynthesis protein CobG	2.4 ↓
BCAL2123	AIG2 family protein	3.0 ↓
BCAL2274	Putative exported protein	2.2 ↓
BCAL2791	Kynureninase	2.3 ↓
BCAL2792	Tryptophan 2,3-dioxygenase	2.4 ↓
BCAL3008	Outer membrane protein (Porin)	4.1 ↓
BCAL3207	N/A	2.6 ↓
BCAL3282	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	2.6 ↓
BCAL3283	Prevent-host-death family protein	2.9 ↓
BCAL3284	PilT protein domain protein	2.5 ↓
BCAL3297	Ferritin-like protein	2.1 ↓
BCAL3357	ABC-type arginine transport system	2.7 ↓
BCAL3358	Glutamate/aspartate ABC transporter	2.5 ↓
BCAM0079	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein	13.3 ↓
BCAM0080	AMP-dependent synthetase and ligase	7.5 ↓
BCAM0081	Outer membrane protein W	4.8 ↓
BCAM0279	Hypothetical protein	2.3 ↓
BCAM0414	Hypothetic protein	2.9 ↓

BCAM0798	AraC family transcriptional regulator	2.3 ↓
BCAM0835	AraC family regulatory protein	8.5 ↓
BCAM1124	Putative ABC transporter system permease	2.2 ↓
BCAM1217	Alkyl hydroperoxide reductase	2 ↓
BCAM1290	RpiR family transcriptional regulator	4.3 ↓
BCAM1291	L-asparaginase	2.9 ↓
BCAM1293	ABC transporter substrate-binding protein	2 ↓
BCAM1294	ABC transporter permease protein	2.5 ↓
BCAM1297	family M55 metallopeptidase	2.8 ↓
BCAM1486	GntR, transcriptional regulator	2.5 ↓
BCAM1522	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	2.3 ↓
BCAM1768	Transcriptional regulators	3.2 ↓
BCAM2276	FAD dependent oxidoreductase	2.2 ↓
BCAM2329	Transcriptional regulator	2.8 ↓
BCAM2356	Hypothetical protein	3.1 ↓
BCAM2357	Alpha/beta hydrolase	6.1 ↓
BCAM2484	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	13.9 ↓
BCAM2486	Hypothetical protein	2.1 ↓
BCAM2487	Hypothetical protein	2.8 ↓
BCAM2503	Putative amino acid dioxygenase	7.7 ↓
BCAM2602	Major facilitator superfamily protein	3.3 ↓
BCAM2634a	Putative chloramphenicol resistance-related protein	2.4 ↓
BCAM2771	Dihydrodipicolinate synthase	2.8 ↓
BCAS0310	Flp pilus assembly protein ATPase	3.1 ↓
BCAS0381	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	2.9 ↓
BCAS0382	AsnC family regulatory protein	3.9 ↓
BCAS0396	Putative dehydrogenase	3.2 ↓
BCAS0399	Citrate-proton symporter	2.2 ↓
BCAS0407	Hypothetical protein	2.6 ↓
BCAS0501	Hypothetical protein	2.2 ↓
BCAS0502	Multimeric flavodoxin WrbA	3.5 ↓
IG1_1891301	ChlD component of cobalt chelatase involved in B12 biosynthesis	3.5 ↓
IG2_1423308	Glutathione ABC transporter	2.8 ↓
AU1054_G4822	Rhs element Vgr protein	20.2 ↑
AU1054_G4915	LysR family transcriptional regulator	2 ↑
BCAL0269	Putative sulfite oxidase subunit YedY	2 ↑
BCAL0270	Sulfoxide reductase oxidase subunit YedZ	2 ↑
BCAL1333	Acyl-CoA dehydrogenase	2 ↑

BCAL1334	Putative dehydrogenase	2.6 ↑
BCAL1946	Hypothetical protein	5.7 ↑
BCAL1947	RNA polymerase sigma factor	4.1 ↑
BCAL2794	Putative ketopantoate reductase	2.8 ↑
BCAL2795	Aldehyde dehydrogenase family protein	3.6 ↑
BCAL3006	Cold shock-like protein	2.8 ↑
BCAL3150	Hypothetical protein	3.3 ↑
BCAL3152	RNA polymerase sigma factor	2.6 ↑
BCAL3487	Carboxymuconolactone decarboxylase family protein	2.2 ↑
BCAM0184	Photopexin A	2.8 ↑
BCAM0783	Major facilitator superfamily protein	4.5 ↑
BCAM0784	LysR family transcriptional regulator	3.8 ↑
BCAM0856_J_0	Sugar transferase	2.6 ↑
BCAM0856_J_1	Sugar transferase., Undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase	4.9 ↑
BCAM0858	<i>bceE</i> , stative polysaccharide biosynthesis/export lipoprotein	2.2 ↑
BCAM0859	<i>bceF</i> , Tyrosine-protein kinase	2.8 ↑
BCAM0860	<i>bceG</i> , Glycosyltransferase	4.8 ↑
BCAM0861	<i>bceH</i> , Glycosyltransferase	3.3 ↑
BCAM0863	<i>bceJ</i> , Glycosyltransferase	3.2 ↑
BCAM0864	<i>bceK</i> , Glycosyltransferase	2.2 ↑
BCAM0957	Pepstatin-insensitive carboxyl proteinase	2.2 ↑
BCAM1004	GDP-mannose 4,6-dehydratase	2.9 ↑
BCAM1005	Acyltransferase	3.4 ↑
BCAM1008	Glycosyltransferase	3.2 ↑
BCAM1010	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	3.7 ↑
BCAM1113	Putrescine transporter	2.3 ↑
BCAM1303	LysR family transcriptional regulator	2.1 ↑
BCAM1870	<i>cepI</i> , N-acylhomoserine lactone synthase CepI	4.5 ↑
BCAM1871	Hypothetical protein	5.2 ↑
BCAM1960	Calcineurin-like phosphoesterase	7.7 ↑
BCAM1961	Copper binding protein	8.5 ↑
BCAM1962A	Hypothetical protein	5.7 ↑
BCAM2041	BcscR, type III secretion system protein	5.6 ↑
BCAM2042	Type III secretion system protein	5.3 ↑
BCAM2044	Asparagine synthetase	3.2 ↑
BCAM2046	Type III secretion system protein	2.8 ↑
BCAM2048	Type III secretion system protein	6.6 ↑
BCAM2049	BcscL, type III secretion apparatus protein	6.1 ↑

BCAM2050	BcscK, Putative uncharacterized protein	9.6 ↑
BCAM2051	Type III secretion apparatus lipoprotein	3.9 ↑
BCAM2052	Hypothetical protein	3.8 ↑
BCAM2053	Hypothetical protein	10.1 ↑
BCAM2055	Type III secretion outer membrane pore	4.8 ↑
BCAM2165	Beta-lactamase	3.1 ↑
BCAM2400a	Hypothetical protein	5.3 ↑
BCAM2400b	Hypothetical protein	6.4 ↑
BCAM2436	Vanillate monooxygenase., Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	2.8 ↑
BCAM2672	Hypothetical protein	3.2 ↑
BCAM2673	Putative lipoprotein	3.8 ↑
BCAM2729	MerR family regulator protein	2.2 ↑
BCAM2749	Carboxymuconolactone decarboxylase family protein	2.7 ↑
BCAM2750	Hypothetical protein	2.7 ↑
BCAM2752	NAD-dependent epimerase/dehydratase	2.5 ↑
BCAM2753	OsmC family protein	2.4 ↑
BCAM2754	Putative ketoreductase	2.1 ↑
BCAM2775	Putative dioxygenase	2.1 ↑
BCAS0156	Beta-lactamase class C	5.3 ↑
IG2_943874	UDP-glucose dehydrogenase	4.5 ↑

Příloha č. 3b. Seznam genů se změněnou expresí při porovnání izolátu z krve a izolátu ze sputa (kultivovaných ve všech podmínkách) pouze od pacienta B (analýza iv, Tabulka č. 3). Anotace byla ponechána v anglickém jazyce.

Příloha č. 4: Výsledky kvantitativního PCR při porovnávání exprese vybraných genů po izolaci RNA přímo z klinického materiálu od pacienta P

Pacient P				Microarray analýza
Porovnání	CS sputum x 3 měsíce před CS	CS sputum x 8 měsíců před CS	CS sputum x 10 měsíců před CS	A3+B8 x A2+B7
BCAM0079	↑2,9x	=	=	↓13,3x ^b
BCAM0081	↑5,7x	↑7,8x	=	↓4,8x ^b
BCAM0784	↑7,2x	=	=	↑3,8 x ^b
BCAM0860	↑19,7x	↑36,8x	↑19,7x	↑6x ^c
BCAM0863	↑4,6x	↑4,6x	=	↑3x ^c
BCAM1870	↑16,6x	↑5,6x	↑2x	↑3,9x ^c
BCAM1871	↑11,71x	=	=	↑4,5x ^c
BCAM2048	↑48,5x	↑50,2x	↑12,13x	↑4,9x ^c
BCAM2050	↑45,3x	↑45,3x	↑24,3x	↑7,3x ^c
BCAM2329	↑4x	=	=	↓2,9x ^b
BCAM2685	=	=	=	↓5,3x ^a
BCAL3283	↑4,9x	=	=	↓4x ^c
G4822	=	=	=	↑20,2x ^b

Příloha č. 4. Výsledky kvantitativního PCR při porovnávání transkriptomu po izolaci RNA přímo z klinického materiálu od jednoho pacienta (sputum). Šipka nahoru znázorňuje zvýšenou expresi genu u krevního izolátu, šipka dolů znázorňuje sníženou expresi u krevního izolátu. Znak „=“ vyjadřuje stejnou expresi daného genu porovnávaných izolátů. Geny pro T3SS jsou zvýrazněny.

^a Exprese změněna pouze při porovnání izolátu A3 vesrsus A2

^b Exprese změněna pouze při porovnání izolátu B8 vesrsus B7

^c Exprese změněna v obou případech porovnání (A3 vesrsus A2, B8 vesrsus B7)

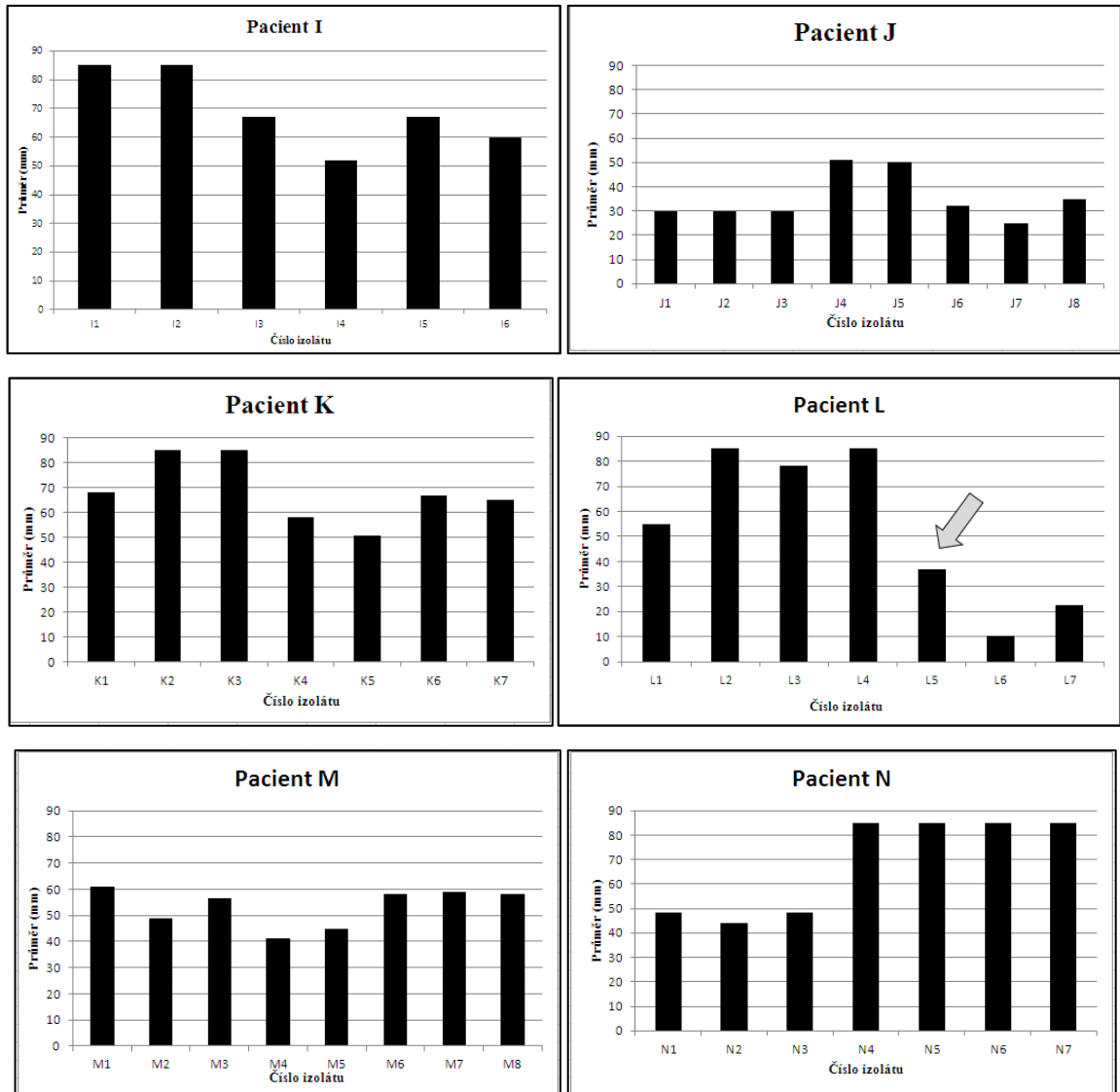
Příloha č. 5a: Seznam ST32 izolátů od pacientů s CF, kteří doposud neprodělali cepacia syndrom

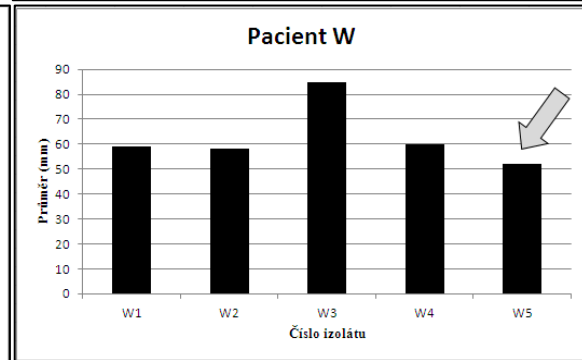
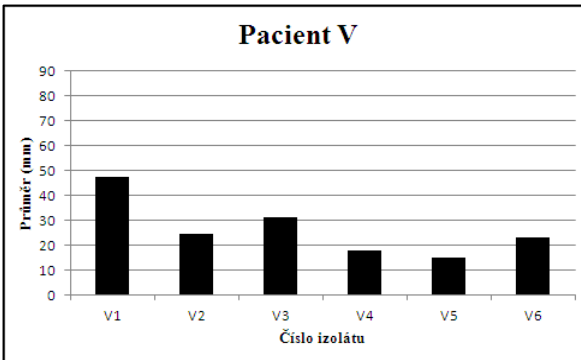
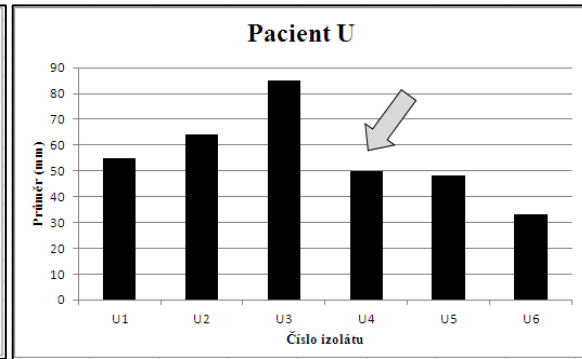
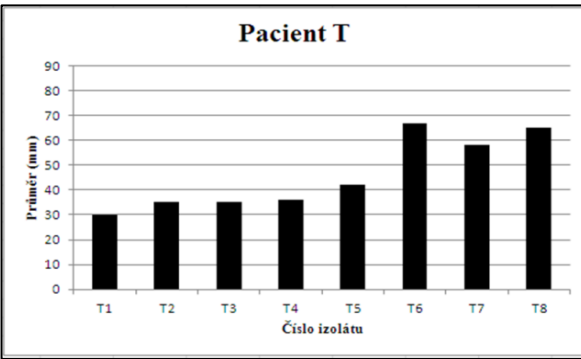
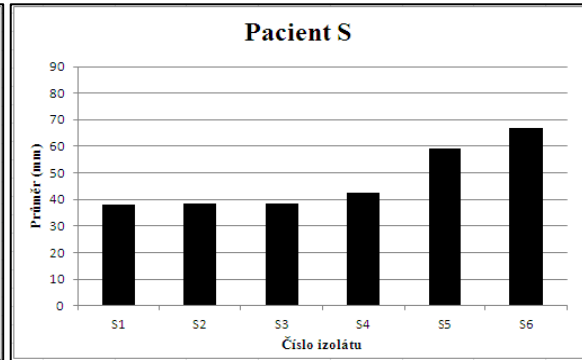
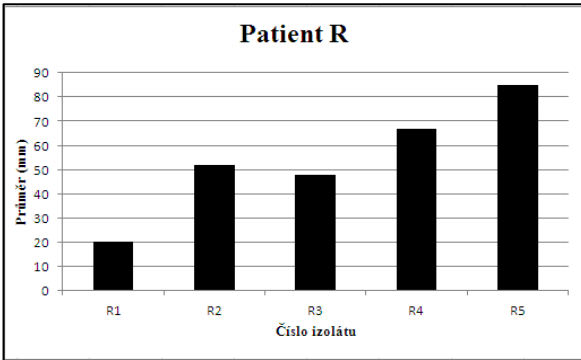
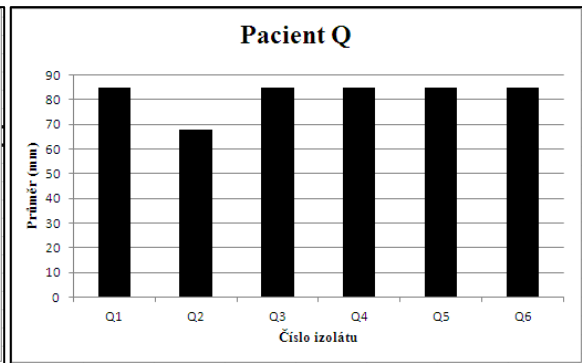
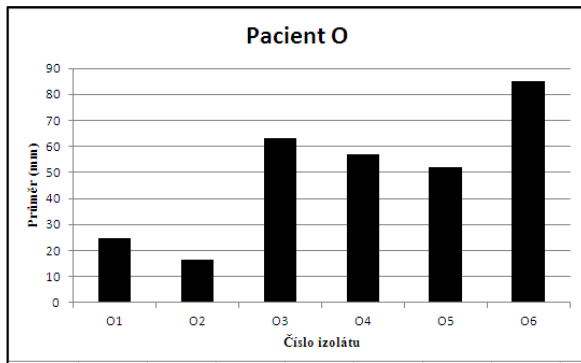
(s výjimkou pacienta P, který v průběhu experimentu podlehl cepacia syndromu)

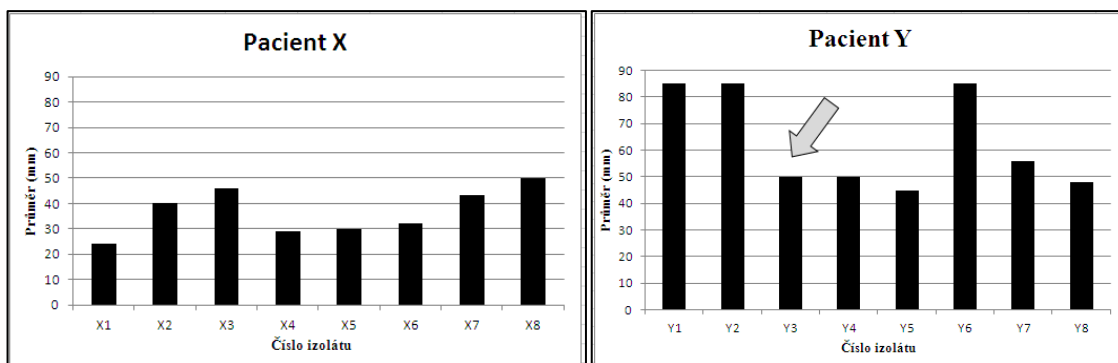
Pacient	1	2	3	4	5	6	7	8
I	4/2002 477	11/2004 2344	9/2008 5918	11/2009 7084	1/2014 12729	3/2015 14841		
J	10/2008 5974	3/2010 7412	4/2011 8735	4/2013 11576	5/2014 113346	1/2015 14507	6/2015 15252	8/2015 15560
K	9/2007 4954	8/2011 9143	8/2013 12019	6/2014 13351	1/2015 14403	5/2015 15248	6/2015 15366	
L	9/2005 3088	9/2010 7902	11/2011 9499	5/2013 11624	10/2014 14025	3/2015 14842	8/2015 15564	
M	2/2005 2590	10/2006 4095	3/2008 5480	2/2010 7355	6/2012 10283	11/2014 14205	5/2015 15283	8/2015 15557
N	2/2006 3439	2/2008 5338	1/2010 7271	3/2011 8613	11/2011 9479	7/2014 13539	12/2014 14356	
O	4/2005 2693	8/2007 4887	11/2009 7014	1/2011 8326	3/2012 10019	10/2013 12291		
P	1/2004 1603	3/2005 3413	5/2007 5420	2/2010 9268	8/2013 11993	7/2014 13539	12/2014 14356	
Q	1/2004 1620	2/2006 2644	3/2008 4689	9/2011 7336	8/2013 11994	5/2014 113263		
R	4/2010 7532	9/2011 9270	7/2013 11880	7/2014 13502	5/2015 15115			
S	2/2010 7356	8/2011 9117	1/2013 11110	5/2014 13345	3/2015 14790	4/2015 14983		
T	11/2006 4112	5/2007 6915	10/2009 8099	10/2011 9400	3/2012 10018	7/2014 13538	1/2015 14458	8/2015 15563
U	5/2007 4685	2/2008 5332	1/2010 7240	11/2011 9593	1/2012 14844			
V	3/2008 5451	10/2010 8076	12/2011 9588	3/2013 11332	10/2014 13989	5/2015 15181		
W	2/2008 5334	11/2009 7061	1/2011 8310	6/2012 10318	2/2014 12842			
X	4/2009 6444	7/2010 7778	9/2011 9271	1/2012 9694	11/2013 12493	10/2014 14111	1/2015 14548	8/2015 15559
Y	10/2007 5060	12/2009 7141	9/2011 9272	7/2013 11877	2/2014 12771	10/2014 14112	1/2015 14551	8/2015 15562

Příloha č. 5a. Seznam ST3 izolátů od pacientů s CF, kteří neprodělali cepacia syndrom, použitých při kontrolním měření schopnosti motility. U každého izolátu je vyznačen datum odběru a jeho ID. Pacient P byl nakonec z kontrolní skupiny vyřazen, jelikož podlehl cepacia syndromu. Bylo u něj provedeno sledování genové exprese vybraných genů po extrakci RNA přímo ze sputa (viz kapitola 3.2.6.) a graf zobrazující hodnoty z měření schopnosti motility je také zobrazen v kapitole 3.2.6.

Příloha č. 5b: Výsledky měření schopnosti motility izolátů od pacientů, kteří neprodělali cepacia syndrom







Příloha č. 5b. Přehled schopnosti motility u izolátů od pacientů I – J, kteří neprodělali cepacia syndrom. Šedá šipka u pacientů L, U, W a Y znázorňuje pokles motility, který by mohl být varovným signálem pro možný blížící se vznik cepacia syndromu.

Publikace č. 1

Gene Expression Profiling of *Burkholderia cenocepacia* at the Time of Cepacia Syndrome: Loss of Motility as a Marker of Poor Prognosis?

Kalferstova L, Kolar M, Fila L, Vavrova J, Drevinek P. J Clin Microbiol. 2015 May;53(5):1515-22.

Cíl publikované práce:

Porovnat expresní profily izolátů bakterií *Burkholderia cenocepacia* ST32 získaných ze sputa s izoláty získanými z krve od pacientů s CF, kteří podlehli cepacia syndromu. Cílem porovnání bylo odhalit ty geny, které by mohly mít spojení s cepacia syndromem. Během této práce se nám podařilo odhalit několik takových genů. Vybrané geny byly následně podrobeny testování na širším panelu izolátů získaných od více pacientů kvantitativním PCR, nebo jednoduchým funkčním testem pro sledování schopnosti motility.

Publikace č. 2

How and why to monitor *Pseudomonas aeruginosa* infections in the long term at a cystic fibrosis centre.

Kalferstova L, Vilimovska Dedeckova K, Antuskova M, Melter O, Drevinek P. J Hosp Infect. 2016 Jan;92(1):54-60. doi: 10.1016/j.jhin.2015.09.010. Epub 2015 Oct 8.

Cíl publikované práce:

Zmapovat a zhodnotit epidemiologickou situaci u bakterií *Pseudomonas aeruginosa* v Centru cystické fibrózy ve Fakultní nemocnici v Motole v období 2005 až 2013. Vytvořit nejrychlejší a finančně nejvýhodnější postup pro sledování epidemiologické situace *P. aeruginosa* u pacientů s CF.