

Abstrakt

V klinické praxi se infekce způsobené perzistentními bakteriemi stali celosvětovým problémem. Mluvíme o subpopulaci buněk, které jsou schopné odolávat letálním dávkám antibiotik a po jejich eliminaci jsou schopny resuscitovat a opět navodit onemocnění. Mezi tyto bakterie patří i oportunistický patogen *Staphylococcus aureus*, který způsobuje různé závažné chronické infekce. Během dlouhodobého přetrvávání v pacientovi získávají perzistentní bakterie adaptační mutace.

Cílem této diplomové práce bylo sledovat míru schopnosti perzistovat u vybraných klinických izolátů, a prokázat vliv adaptačních mutací na míru schopnosti perzistovat jako i blíže molekulárně charakterizovat perzistentní stav pomocí genové exprese. K dispozici jsem měla chronologické izoláty *S. aureus* od pacientů trpících cystickou fibrózou (CF), kdy počáteční byl tzv. primoizolát (izolát odebraný při odhalení CF a před zahájením antibiotické léčby). Další byl odebraný s ročním odstupem a poslední s půlročním odstupem od předchozího. Po následné celogenomové sekvenaci byly zjištěny geny, ve kterých vznikly adaptační mutace.

Metodou stanovení CFU (Colony Forming Units) jsem určila míru schopnosti perzistovat po působení antibiotik. Zjistila jsem, že tato schopnost závisí jak na adaptaci izolátu tak i na adaptačních mutacích. Stanovila jsem, že mutace genu *sigB* může zvyšovat míru schopnosti perzistovat. Pomocí průtokové cytometrie s duálním barvením s DiOC2(3) a TO-PRO-3 jsem určila subpopulaci buněk s membránovým potenciálem, bez potenciálu a mrtvé buňky. Rozdělení do subpopulací bylo rozdílné pro různá antibiotika. Po ciprofloxacinu buňky svůj membránový potenciál ztrácely v menší míře než po působení oxacilinu a vankomycinu. Dále jsem fluorescenčním barvením CTC a DAPI sledovala redoxní potenciál buněk a zjistila jsem, že buňky ztrácejí svůj redoxní potenciál v čase po působení všech třech antibiotik. Stanovila jsem expresi genů, které se dávají do spojitosti s perzistencí (*sigB*, *mazEF*, *agrA*, *rnaIII*). Ukázalo se, že exprese genů *agrA* a *rnaIII* byly ve většině případů potlačeny, což koreluje s faktem, že během chronické infekce mají tyto geny též nižší aktivitu.

Pro vytvoření delece genu *agrA* jsem vytvořila konstrukt používající CRISPR – Cas 9 systém pro úpravu genomu *S. aureus*. Nepodařilo se mi však transformovat plazmid do klinických izolátů a izolovat mutanta s delecí genu *agrA*.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, perzistence, Agr systém, SigB, adaptační mutace, působení antibiotik