

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

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie (NGEMOVI)



Bc. Tamara Balgová

Studium mechanismů perzistence vůči antibiotikům u *Staphylococcus aureus*

Study of persistence mechanisms to antibiotics in *Staphylococcus aureus*

Štúdium mechanizmov perzistencie voči antibiotikám u *Staphylococcus aureus*

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 10.08.2021

.....

Podpis

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať predovšetkým mojej školiteľke, pani RNDr. Irene Lichej, CSc. za venovaný čas a vládny prístup pri vedení tejto práce. Veľmi si vážim jej ochotu kedykoľvek pomôcť ako aj jej cenné rady a pripomienky.

Ďalej ďakujem našej pani laborantke, Lucii Jánskej, za technickú asistenciu a včasnej prípravy všetkého potrebného v priebehu vykonávania našich pokusov.

Chcela by som sa poďakovať aj MVDr. Jozefovi Jandovi, Ph.D. za odbornú pomoc pri práci na prietokovom cytometri a pri vyhodnotení výsledkov z tohto prístroja.

Moje veľké poďakovanie patrí rodičom, rodine a priateľom, ktorý ma počas celého štúdia podporovali.

Táto diplomová práca vznikla v rokoch 2019 – 2021 a bola vypracovaná z finančnej podpory grantu Ministerstva zdravotníctva AZV 17-30460A/2017.

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

Abstract

In clinical practice, infections caused by persistent bacteria have become a worldwide problem. We are talking about a subpopulation of cells that are able to withstand lethal doses of antibiotics and after their elimination are capable of resuscitation and re-induction of the disease. The opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* is one of this bacteria and causes various serious chronic infections. During the long-term persistence in patients, persistent bacteria acquire adaptive mutations.

The aim of this diploma thesis was to monitor the degree of persistence in selected clinical isolates, and at the same time to demonstrate the effect of adaptive mutations on the degree of persistence as well as to molecularly characterize the persistent state by gene expression. I had chronological isolates of *S. aureus* at my disposal, the initial one being the primoisolate, an isolate taken at the diagnostics of cystic fibrosis before the start of antibiotic treatment. Another was taken at a distance of one year and the last with a half-year interval from the previous one. Following whole genome sequencing, genes in which adaptive mutations occurred were identified.

The first method determines the degree of persistence by calculating CFU (Colony Forming Units) after antibiotic treatment. I found that this ability depends mainly on the adaptation of the isolate and the adaptation mutations obtained. I have determined that a mutation in the gene *sigB* may increase the rate of persistence. By flow cytometry and dual dyeing with DiOC₂(3) and TO-PRO-3, I determined the subpopulation of cells with membrane potential, subpopulation of cells without potential and dead cells. The division into subpopulations was different for the selected antibiotics. The loss of membrane potential after ciprofloxacin was not as severe as after oxacillin and vancomycin treatment. Next, I monitored the redox potential of the cells with fluorescent dyes CTC and DAPI and found that the cells lost their redox potential over time after treatment with all three antibiotics. I determined the expression of genes that are associated with persistence (*sigB*, *mazEF*, *agrA*, *rnaIII*). It has been shown that the expression of the genes *agrA* and RNAIII has been suppressed in most cases, which correlates with the fact that these genes also have lower activity during chronic infection.

To create a deletion of the *agrA* gene, I created a construct using the CRISPR - Cas9 system to modify the *S. aureus* genome. However, I was unable to transform the plasmid into clinical isolates and isolate the *agrA* gene deletion mutant.

Key words: *Staphylococcus aureus*, persistence, Agr system, SigB, adaptive mutations, antibiotic treatment

Obsah

Abstrakt

Abstract

Obsah

Zoznam skratiek

1 Úvod	10
2 Prehľad literatúry.....	13
2.1 Perzistencia u baktérií	13
2.1.1 Všeobecné vlastnosti perzistentných buniek	13
2.1.2 Mechanizmy perzistencie	15
2.1.3 Fenomén perzistencie u G ⁺ a G ⁻ baktérií	18
2.2 Mechanizmy perzistencie u <i>S. aureus</i>	19
2.2.1 Small colony variants (SCVs)	19
2.2.2 Bakteriálne L – formy	21
2.3 Vyhliadky do budúcnosti	21
2.4 Regulácia virulencie u <i>S. aureus</i>	22
2.4.1 Agr quorum sensing systém	22
2.4.2 Perzistencia a Agr systém.....	30
2.5 Membránový potenciál u baktérií	30
2.5.1 Spojitosť medzi membránovým potenciálom a perzistenciou	32
2.6 Redoxný stav baktérií.....	33
2.6.1 Redoxný stav a perzistencia u <i>S. aureus</i>	35
3 Materiál a metódy	37
3.1 Materiál	37
3.1.1 Bakteriálne kmene	37
3.1.2 Plazmidy	38
3.1.3 Bakteriofágy	40
3.1.4 Kultivačné médiá.....	40
3.1.5 Použité antibiotiká	41
3.1.6 Enzýmy	41
3.1.7 Chemikálie.....	41
3.1.8 Roztoky.....	42
3.1.9 Primery	44
3.1.10 Komerčné súpravy.....	45
3.1.11. Prístroje a laboratórne vybavenie	45

3.1.12	Programy a internetové odkazy	46
3.2	Metódy	47
3.2.1	Práca s bakteriálnou kultúrou	47
3.2.2	Príprava konzerv pre dlhodobé uchovávanie kmeňov.....	47
3.2.3	Kultivácia bakteriálnej kultúry na pevnom médiu	47
3.2.4	Kultivácia bakteriálnej kultúry v tekutom médiu	47
3.2.5	Krivka hynutia s antibiotikami	48
3.2.6	Meranie membránového potenciálu pomocou prietokového cytometra	49
3.2.7	Meranie redoxného potenciálu pomocou prietokového cytometra	51
3.2.8	Meranie optickej denzity	52
3.2.9	Zber buniek pre izoláciu RNA	52
3.2.10	Práca s bakteriálnou DNA	52
3.2.11	Práca s bakteriálnou RNA	69
4	Výsledky.....	72
4.1	Kritérium výberov kmeňov	72
4.2	Stanovenie kriviek hynutí po pôsobení antibiotík pre chronologické izoláty.....	75
4.3	Vplyv vybraných antibiotík na membránový potenciál v priebehu kriviek hynutí u jednotlivých chronologických izolátov	82
4.4	Vplyv vybraných antibiotík na redoxný potenciál bunky v priebehu kriviek hynutí u jednotlivých chronologických izolátov	90
4.5	Stanovenie expresie génov <i>sigB</i> , <i>mazEF</i> , <i>agrA</i> a <i>rnaIII</i> pomocou metódy RT qPCR u chronologických izolátov pacienta č. 1	101
4.6	Príprava konštruktu pre deléciu génu <i>agrA</i> v jednotlivých chronologických izolátov .	107
5	Diskusia.....	111
6	Súhrn.....	121
7	Zoznam použitej literatúry	122

Zoznam skratiek

Agr systém	Systém, ktorý sa zúčastňuje na regulácii expície génov virulencie (Accessory gene regulator)
AgrA	Hlavný regulátor dvojkomponentového systému AgrC - AgrA
AgrB	Transportér quorum sensing molekuly AIP
AgrC	Histidinová kináza dvojkomponentového systému AgrC – AgrA
AgrD	Prekurzor quorum sensing molekuly AIP
AIP	Auto – indukujúci peptid, quorum sensing molekula
ATB	Antibiotikum
cDNA	DNA, ktorá vznikla reverznou transkripciou RNA
CF	Cystická fibróza
CFU	Jednotka tvoriaca kolónie (colony forming units)
Cip	Ciprofloxacin, fluorchinolonové antibiotikum
CTC	5-kyano-2,3-ditolyltetrazóniumchlorid, fluorescenčná farba
DAPI	4,6-diamidino-2-fenyl indol, DNA špecifická sonda
DioC₂(3)	3,3'-Diethylloxacarboyanin, fluorogenný indikátor membránového potenciálu
FACS	Hodnotenie a triedenie buniek na základe ich odlišnej fluorescence, Fluorescence – activated cell sorting
FC	Prietoková cytometria
FSC	Forward scatter, rozptyl vedený pozdĺž laserového lúča
GFP	Zelený fluorescenčný proteín
HokB	Toxín hok/sok TA systému
MIC	Minimálna inhibičná koncentrácia
MP	Miera schopnosti perzistovať
Obg	GTPáza viažuca (p)ppGpp
OD	Optická denzita
ON	Nočná kultúra
Oxa	Oxacilin, β – laktámové antibiotikum
PSM	Modulíny rozpustné vo fenole (phenol soluble modulins), virulénne faktory <i>S. aureus</i>
(p)ppGpp	Guanosin tetrafosfát (pentafosfát) indukujúci stringentnú odpoveď
qPCR	Kvantitatívna PCR
QS	Quorum sensing
RE	Restrikčný enzým
RM systém	Restrikčno – modifikačný systém
RT	Reverzná transkripcia
RNAlII	Jeden z dvoch transkriptov <i>agr</i> operónu
SarA	Transkripčný regulátor ovplyvňujúci virulénne faktory
SCV	Trpasličie kolónie <i>S. aureus</i> (small colony variants)
SigB	Alternatívny sigma faktor B
SSC	Side scatter, rozptyl vedený v uhle 90 °C oproti laserovému lúču
TA systém	Toxín – antitoxín systém
TO – PRO – 3	Fluorescenčné farbivo, ktoré sa viaže na DNA
Van	Vankomycin, glykopeptidové antibiotikum

1 Úvod

V súčasnej dobe máme rôzne technické vymoženosti, a napriek tomu množstvo prírodných javov sa skúma obťažne a vedomosti o nich stále majú svoje medzery. Medzi takýto jav môžeme zaradiť aj fenomén bakteriálnej perzistencie, ktorý sa ukazuje ako globálny problém a zapríčiňuje zlyhanie liečby a vznik chronických bakteriálnych infekcií.

Perzistentnú subpopuláciu buniek môžu tvoriť zástupcovia ako G^+ tak aj G^- baktérií, aj keď mechanizmy navodzujúce perzistentný stav sa medzi týmito baktériami odlišujú perzisterov charakterizujú rovnaké vlastnosti (Helaine a Ronneau 2019). Perzistery sú subpopuláciou buniek, ktoré sú geneticky identické s rodičovskou populáciou, ale majú pozmenenú fyziológiu vďaka ktorému sú schopné odolávať letálnym dávkam antibiotík. Perzistenciu charakterizuje tzv. dormantný stav bunky, kedy bunka utlmuje svoj metabolizmus, ako aj procesy replikácie, transkripcie a translácie. Bunky v perzistentnom stave sú schopné unikáť pred imunitným systémom hostiteľa a po ukončení antibiotickej liečby sú schopné resuscitácie, kedy znovu nadobudnú virulenčný stav a opäť navodia infekciu (Michiels et al. 2016; Wilmaerts et al. 2019).

Bakteriálna perzistencia bola popísaná už v roku 1944 pánom Hobbyom a Bigerom, avšak objavením sa rezistencie sa dostala do ústrania (Hobby 1944). Zaujímavosťou je, že aj keď perzistentné bunky toleranciu na antibiotiká nemajú geneticky kódované tak ako rezistentné bunky predstavujú aký si predstupeň rezistencie (Michiels et al. 2016). V posledných desiatich rokoch sa upriamil pozornosť aj na perzistenciu a v dnešnej dobe sa s týmto fenoménom zaoberajú vedci z celého sveta.

S. aureus sa zaraďuje medzi patogény, ktoré zapríčiňujú rôzne závažné infekcie vedúce až k smrti pacienta. Táto práca sa zaoberá práve touto G^+ baktériou.

S. aureus ochotne vytvára perzistentnú subpopuláciu, ktorá navodí dlhotrvajúcu chronickú infekciu. Počas chronickej infekcie sa môžu vytvárať SCVs (small colony variants) bunky alebo L – formy buniek, ktoré sú rôznymi formami perzistentných buniek u *S. aureus*. SCV bunky sa vyznačujú pomalým rastom, zníženou expresiou virulenčných faktorov a vyhýbaním sa imunitnému systému, zatiaľ čo L – formy buniek majú neúplnú bunkovú stenu,

ktorá ich chráni pred účinkom antibiotík zameriavajúcej sa na bunkovú stenu (Tuchscherr et al. 2020; Xu et al. 2020). Vznik týchto foriem perzistentných buniek vytvára veľký problém pri liečbe stafylokokových infekcií.

Navodenie perzistentného stavu ako aj jeho priebeh sú komplexné deje, do ktorých sa zapájajú rôzne mechanizmy a bunkové procesy. U *S. aureus* bolo pozorované, že regulátory AgrA, SarA a SigB sú schopné prepínať medzi akútnou a chronickou infekciou. Kým regulátory AgrA a SarA regulujú produkciu virulenčných faktorov, a tým zohrávajú úlohu v akútnej infekcie, alternatívny sigma faktor B zodpovedá za chronickú infekciu inhibíciou expície práve *agr* a *sarA* génov a navodením tak menej agresívnych buniek (Tuchscherr et al. 2015). Mutácie v génoch Agr systému, ktorý je hlavným regulátorom virulenčných faktorov, prispievajú k výraznému zvýšeniu perzistentných buniek (Xu et al. 2017). Rezervoárom perzisterov môžu byť aj biofilmy, ktoré chránia bunky pred nepriaznivými účinkami antibiotík a imunitného systému hostiteľa (Moradali et al. 2017).

Mechanizmy perzistencie sú najlepšie preštudované u *E. coli* a skúmajú sa intenzívne u *Mycobacterium* a *Pseudomonas*. Molekulárna podstata vzniku perzisterov u *S. aureus* zatiaľ nie je príliš preskúmaná.

Chronické infekcie zapríčinené perzistentnými bunkami sú veľkou hrozbou dnešnej doby, preto je potrebné v budúcnosti vytvoriť metódy, ktoré by perzisterov odhalili ako aj popísať gény, dráhy, adaptačné zmeny, ktoré s perzistenciou súvisia.

V tejto práci boli skúmané chronologické izoláty *S. aureus*, ktoré boli odobrané pacientom trpiacich cystickou fibrózou. Celkom som spracovala 7 chronologických izolátov od dvoch rôznych pacientov, kde prvý bol tzv. primoizolát (izolát odobraný v momente diagnózy cystickej fibrózy). Ďalšie dva boli izoláty od rovnakého pacienta odobrané s odstupom približne jedného roka a posledný izolát po ďalšom polroku, teda jeden a pol roka od prvého izolátu (viď kapitola 3.1.1). Príbuznosť bola stanovená MLST genotypizáciou. Stanovením miery schopnosti perzistovať jednotlivých izolátov a vďaka znalosti ich genotypu posúdim ako sa menila ich schopnosť perzistovať v čase a aké molekulárne biologické procesy môžu súvisieť s navodením perzistentného stavu. Práca vznikla so spoluprácou FN Motol, 2. lekárskou fakultou Univerzity Karlovy a MBÚ AV ČR s.r.o.

Ciele mojej diplomovej práce boli nasledujúce:

- 1) Stanoviť mieru schopnosti perzistovať u klinických izolátov *S. aureus* od pacientov trpiacich CF po pôsobení rôznych antibiotík metódou kriviek hynutia a zistiť, či dochádza k zmene v schopnosti perzistovať v rámci chronologických izolátov v čase a porovnať túto schopnosť u izolátov so vznikajúcimi adaptačnými mutáciami.
- 2) Pomocou prietokovej cytometrie sledovať zmeny vitality buniek na základe zmien membránového potenciálu a redoxného potenciálu po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu u vybraných chronologických izolátov *S. aureus*.
- 3) Sledovať zmenu génovej expresie génov, ktoré by mali byť spojené so vznikom perzistentného stavu. Týmito génmi boli: *sigB*, *mazEF*, *agrA* a *rnaIII*.
- 4) Vytvoriť konštrukt pomocou ktorého by sa vydeletoval gén *agrA* a stanoviť vplyv tejto delécie na mieru schopnosti perzistovať vybraných chronologických izolátov po pôsobení nami vybranými antibiotikami.

2 Prehľad literatúry

2.1 Perzistencia u baktérií

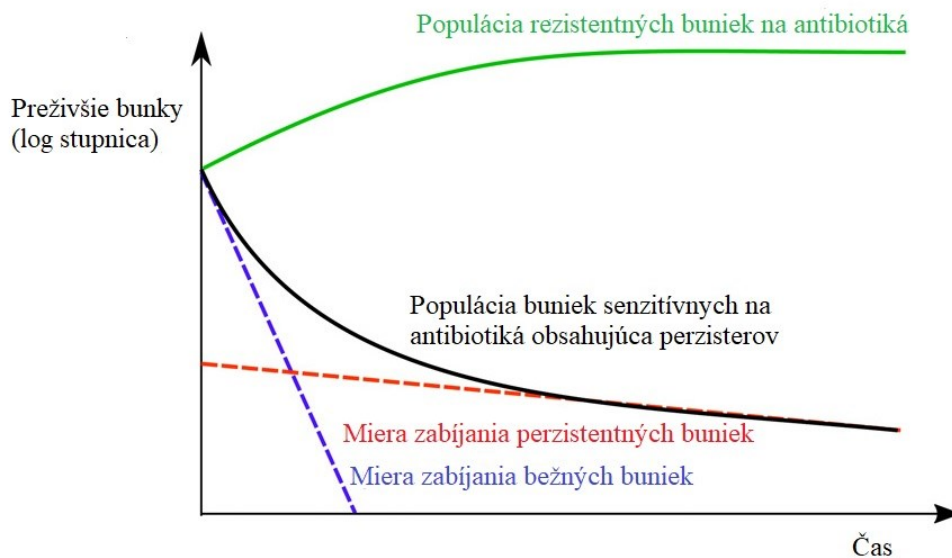
2.1.1 Všeobecné vlastnosti perzistentných buniek

Baktérie sú neustále vystavené rôznym environmentálnym podmienkam, ako napr. hladovanie na živiny, zmeny teplôt, oxidatívny a osmotický stres, zmeny pH ako aj vystavenie bunky ťažkým kovom. Aby bakteriálne bunky boli schopné prežiť v nepriaznivých podmienkach, vytvorili si rôzne mechanizmy a komplexné systémy adaptácií. Po rozoznaní nepriaznivých vonkajších podmienok pomocou regulácie génovej expresie sa fyziologicky adaptujú na dané podmienky (Ron 2013, citované podľa Jung et al. 2019).

Jedna z možností ako sa môže bakteriálna bunka vysporiadať s vplyvom prostredia je perzistencia, stratégia, kedy nepriaznivé podmienky pre rast sa prekoná uvedením časti populácie do dormantného stavu. Perzistentné bunky dočasne tiež odolávajú vplyvu antibiotík. Jedná sa o subpopuláciu buniek, ktoré pochádzajú z geneticky identickej populácie buniek, ale ich fenotyp a fyziologické vlastnosti sú pozmenené. Perzistentné bunky sú schopné navrátiť svoj pôvodný fenotyp, kedy sú senzitívne na antibiotiká a hovoríme o resuscitácii buniek. Keď sú podmienky vhodné baktérie môžu začať rásť a vytvoriť tak novú populáciu. Resuscitácia buniek je pravdepodobne náhodná a je nejasné aké procesy sa na nej podieľajú. Zastúpenie perzistentných buniek v populácii závisí na rýchlosti rastu pôvodného fenotypu a perzisterov a na tom, ako rýchlo sa mení jeden fenotyp na druhý (Michiels et al. 2016; Wilmaerts et al. 2019). Formovanie perzistentných buniek úzko súvisí s fázami bakteriálneho rastu. Počas lag a skoršej exponenciálnej fázy je veľmi nízky počet perzistentných buniek. Ich počet sa dramaticky zvýši v strede exponenciálnej fázy a pokračuje až do stacionárnej fázy (Keren et al. 2004a, citované podľa Michiels et al. 2016).

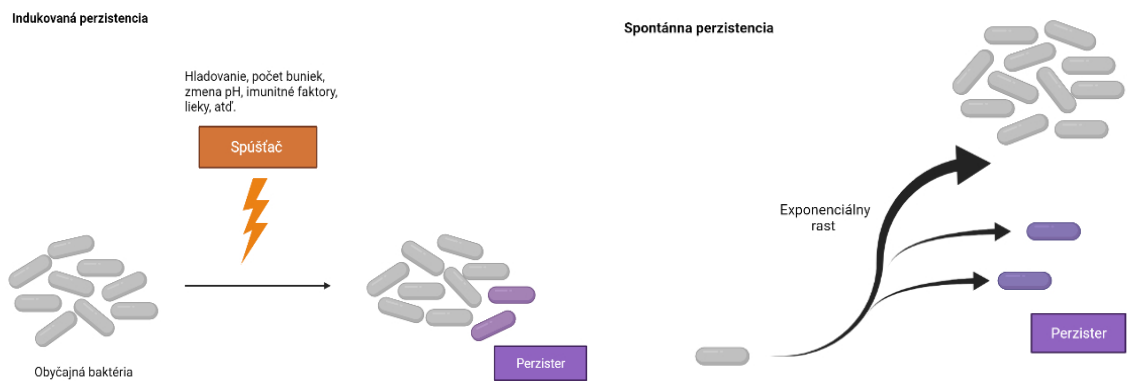
Vlastnosť, ktorá je typická pre perzisterov je tzv. bifázická krivka hynutia (viď obrázok č. 1), kedy po pridaní antibiotika väčšia časť populácie zahynie a počet preživších buniek rýchlo klesá (prvá fáza). Po určitom čase bunky začínajú hynúť pomalšie, a to vďaka subpopuláciám perzisterov, ktoré sú vysoko tolerantné voči antibiotikám (druhá fáza). Je dôležité si uvedomiť, že perzistencia a rezistencia sa navzájom odlišujú. Po obnovení delenia buniek perzistery strácajú schopnosť tolerancie na antibiotiká a táto tolerancia nie je geneticky kódovaná, tým pádom je nededičná, oproti rezistencii, ktorá je geneticky kódovaná a dedičná. Poznáme mnoho spôsobov rezistencie proti antibiotikám, ktoré zabraňujú antibiotikám dosiahnuť svoj cieľ. Naproti tomu perzistery majú pozmenenú fyziológiu, aby sa proti toxicite antibiotík vedeli

ubrániť (Kint et al. 2012; Lewis 2010, citované podľa Michiels et al. 2016). Antibiotiká môžu vytvárať genómové mutácie a bunky, ktoré sú schopné prežiť sa stanú rezistentnými. Tolerancia na antibiotiká a bakteriálna perzistencia napomáhajú k vytváraniu rezistentných kmeňov. Môžeme povedať, že perzistencia hrá kľúčovú úlohu v rezistencii na antibiotiká (Jung et al. 2019).



Obrázok č. 1: Porovnanie kriviek hynutia rezistentnej populácie a senzitivity populácie na antibiotiká, pričom v senzitivity populácii sa nachádzajú perzistery. Miera zabijania buniek nám ukazuje prítomnosť subpopuláciu tolerantných perzisterov (prevzaté a upravené podľa Michiels et al. 2016).

Rozpoznávame dva typy perzisterov, a to indukované, ktoré sa nazývajú perzistery typu I a spontánne, ktoré sa nazývajú perzistery typu II. Indukované perzistery sa vytvárajú pomocou spúšťačov, ktorými sú stresové signály, ako napr. hladovanie, vysoký počet buniek alebo imunitné faktory. Aj keď sa spúšťač odstráni perzistentné baktérie si môžu zachovať svoj fenotyp. Spontánne perzistery vznikajú náhodne z časti populácie počas exponenciálneho rastu, kedy zastavia svoj rast. Spontánne perzistery nie sú tak bežné ako indukované perzistery (viď obrázok č. 2) (Balaban et al. 2019).



Obrázok č. 2: Indukovaná perzistencia (vľavo) vyžaduje spúšťač k tomu, aby sa baktérie stali perzistentmi. Úroveň perzistencie závisí od intenzity a trvania spúšťača. Bežným spúšťačom je napr. hladovanie. Aj keď sa spúšťač odstráni, perzistentné bunky sú schopné si zachovať svoj fenotyp aj po dlhšiu dobu. K spontánnej perzistencii (vpravo) dochádza pri exponenciálnej fázy rastu bakteriálnych buniek. Časť populácie prechádza na perzistentný fenotyp s konštantnou rýchlosťou (prevzaté a upravené podľa Balaban et al. 2019; vytvorené pomocou BioRender.com).

Bakteriálne bunky, aby odolali toxickým účinkom antibiotík môžu prejsť do tzv. dormantného stavu, kedy sa mechanizmy transkripcie, translácie a replikácie utlmia, nedochádza k bunkovému rastu a deleniu. Je nutné si uvedomiť, že nie všetky nerastúce bunky sú perzistery. V niektorých prípadoch si perzistentné bunky zachovávajú transkripčnú, translačnú ako aj metabolickú aktivitu. Z uvedených vyplýva, že perzistentné bunky sa môžu chrániť ako pasívne prechodu do dormantného stavu ako aj aktívne pomocou efektorov perzistencie a efluxných púmp, ktoré nahromadené antibiotiká v bunke odstraňujú (Jun et al. 2019; Michiels et al. 2016; Wilmaerts et al. 2019).

2.1.2 Mechanizmy perzistencie

Bakteriálna perzistencia zahŕňa veľa mechanizmov a procesov, avšak tieto mechanizmy a procesy nie sú úplne pochopené a prebádané. Nasledujúce mechanizmy sú najviac pochopené (viď obrázok č. 3).

2.1.2.1 Toxín – antitoxín systém (TA systém)

TA systém sa skladá z toxínu a antitoxínu, ktorých gény sa zoskupujú v operóne a nachádzajú sa v genóme alebo na plazmide. Poznáme 6 typov TA systému, kde toxínom môže byť proteín alebo RNA. Antitoxín môže byť buď antisense RNA alebo proteín, ktorý rôznymi mechanizmami inaktivuje toxín. Toxín narúša bunkové procesy, ako napr. transkripciu

a transláciu a je stabilný. Naproti tomu antitoxín je nestabilný. Keď nastanú stresové podmienky antitoxín sa degraduje napr. ako výsledok ppGpp signálnej kaskády, toxín sa aktivuje, začne sa hromadiť a inhibuje transkripciu, transláciu alebo replikáciu. Bunka pomocou TA systému sa dostáva do dormantného stavu, vznikajú perzistentné bunky, ktoré prežívajú v prítomnosti antibiotík. Niektoré TA moduly navyše dávajú bakteriálnym bunkám odolnosť voči bakteriofágom. Tento mechanizmus sa nazýva abortívna infekcia (Jung et al. 2019; Page a Peti 2016, citované podľa Habib et al. 2020). Zatiaľ bolo dokázané, že pri vzniku perzistencie sa uplatňujú TA systémy typu I, II a V (Ronneau a Helaine 2019).

2.1.2.2 Druhý posol, (p)ppGpp

Počas stringentnej odpovedi v bakteriálnej bunke sa začne hromadiť druhý posol (p)ppGpp, ktorý inhibuje RNA syntézu v bunkách, ktoré majú nedostatok aminokyselín a navodí nadprodukciu génov, ktoré súvisia so stresom. Akumulácia alarmónu (p)ppGpp inhibuje delenie buniek a to reguláciou replikácie DNA a transkripcie. V biofilmoch vytvorených baktériami *P. aeruginosa* a *E. coli* sa nachádza veľké množstvo perzistentných buniek, ktorých rýchlosť formovania ovplyvňuje koncentrácia (p)ppGpp. Môžeme usúdiť, že druhý posol, (p)ppGpp je esenciálny pre tvorbu perzisterov (Jung et al. 2019).

2.1.2.3 Metabolizmus fosfátu

Aby bakteriálna bunka bola schopná produkovať energiu vo forme adenosín - trifosfátu (ATP) ako aj syntetizovať druhý posol (p)ppGpp je životne dôležité metabolizmus fosfátu. Formovanie perzistentných buniek je spojené s týmto procesom. Bunka znížením energie, tým pádom aj znížením hladiny ATP je schopná odolávať antibiotikám, a to hlavne voči tým, ktoré pôsobia na gyrázu, topoizomerázu alebo RNA polymerázu, ktoré pre svoje mechanizmy vyžadujú ATP. Najvýznamnejší pokles ATP sa zaznamenáva v stacionárnej fázy rastu bunky. Časť rastúcej bakteriálnej populácie sa dostáva do stacionárnej fázy rýchlejšie, kde sa stávajú perzistermi, ktoré produkujú menej ATP. Prechod do včasnej stacionárnej fázy je stochastické, avšak formovanie perzistorov sa zvyšuje s bunkovou denzitou (Conlon et al. 2016; Jung et al. 2016).

2.1.2.4 Reaktívne formy kyslíka (ROS – reactive oxygen species)

Reaktívne formy kyslíka sa prirodzene produkujú počas metabolizmu kyslíka. Prostredie môže vytvárať tlak na bunku prostredníctvom UV žiarenia, teploty alebo antibiotík a hladina ROS sa zvýši, čo môže viesť k poškodeniu DNA, lipidov alebo proteínov a následne až k bunkovej smrti. Reaktívne formy kyslíka však môžu poskytnúť bunke výhody odolávaním na antibiotiká navodením perzistentného stavu. Mechanizmy, ktoré sa na ňom podieľajú však

nie sú úplne známe. Bolo preukázané Wangom a jeho kolektívom (2017), že salicylát indukuje tvorbu ROS, čo vedie k zvýšeniu perzistentných buniek v mechanizmu nezávislom na MarA (aktivátor antibiotikovej rezistencie). Taktiež sa preukázalo zníženie membránového potenciálu a metabolizmu prostredníctvom ROS, čo viedlo k zvýšeniu perzisterov. Je niekoľko mechanizmov, ktorými ROS prispieva k zvýšeniu počtu perzisterov (Trastoy a kol. 2018; Wang a kol. 2017).

2.1.2.5 SOS odpoveď

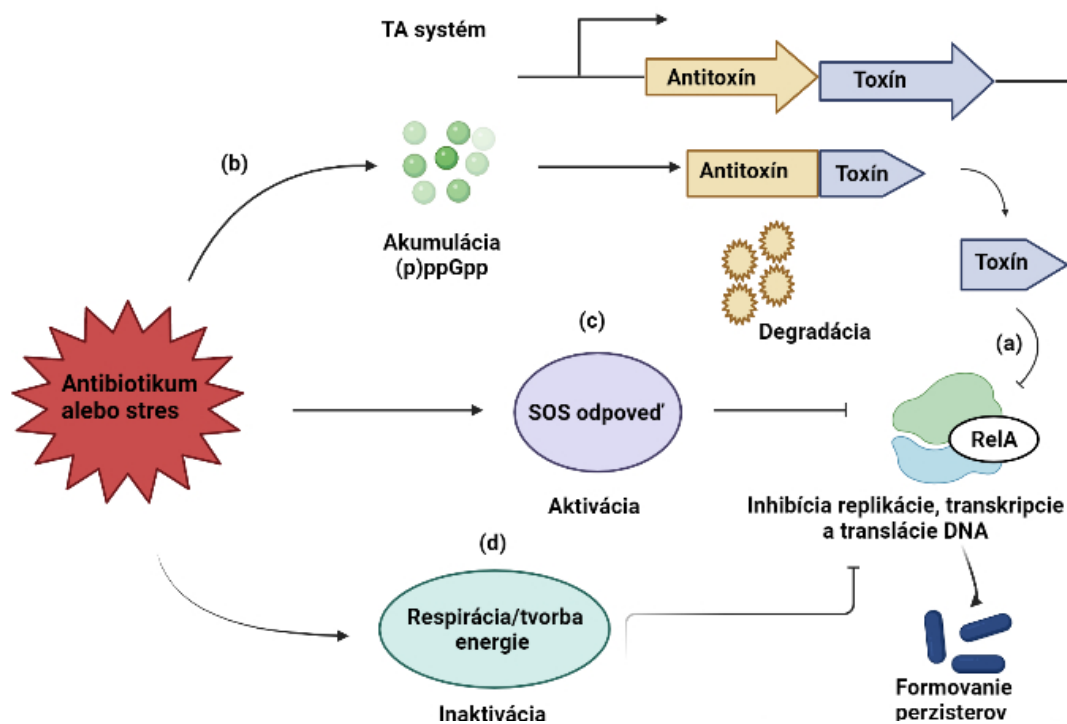
SOS odpoveď alebo tiež známe ako stresová odpoveď sa aktivuje pri poškodení DNA vytvorením jednovláknových zlomov. Pri pokojovom stave bunky sú gény stresovej odpovedi inhibované a začínajú sa exprimovať až po poškodení DNA, ktoré vyvolali stresové podmienky (napr. UV žiarenie, antibiotiká). Pomocou produktov génov SOS odpovedi sa opraví DNA a vzniknú mutácie. SOS odpoveď je spojená s mnohými TA systémami, ktoré sa prispôbujú daným podmienkam. Bolo pozorované, že mutantné kmene v TA systéme, ktoré sú regulované SOS odpoveďou vytvárajú s menšou frekvenciou perzistentné bunky, čo platí aj pre mutanty defektné v SOS odpovedi (Jung et al. 2019).

2.1.2.6 Efluxné pumpy

Efluxné pumpy odstraňujú toxické látky alebo látky nepotrebné pre bunku, aby bakteriálna bunka udržala svoju životaschopnosť. Znižujú intracelulárnu koncentráciu antibiotík a tým pomáhajú perzistentným bunkám odolávať voči antibiotikám. Úloha efluxných púmp v perzistentných bunkách bol potvrdený u nerastúcich a nedeliacich sa bunkách *E. coli*. Funkcia efluxných púmp u perzisterov v ďalších baktériách nie je známy (Trastoy et al. 2018).

2.1.2.7 Quorum sensing systém (QS systém)

Jedná sa o bakteriálny komunikačný systém, vďaka ktorému bunky vedia zmeniť svoje kolektívne správanie podľa potreby na prispôbenia sa prostrediu. Bunky medzi sebou komunikujú pomocou signálnych molekúl, tzv. autoinduktorov. QS systémy regulujú expresiu najrôznejších génov, ako napr. gény virulencie, produkcie toxínov, motility, chemotaxie, produkcie biofilmu a bakteriálnej kompetície. QS systém napomáha bakteriálnym bunkám formovať perzistentné bunky a to ako u G^+ tak aj u G^- baktérií (Trastoy et al. 2018).



Obrázok č. 3: Hlavné mechanizmy formovania perzistentných buniek. (A) TA systém sa skladá z toxínu a antitoxínu. Uvoľnený toxín po degradácii antitoxínu navodzuje tvorbu perzisterov potlačením replikácie, transkripcie a translácie DNA. (B) Antibiotiká alebo environmentálny stres spôsobujú akumuláciu (p)ppGpp, čo vedie k navodeniu degradácie antitoxínu v TA systéme a následnému formovaniu perzistentných buniek. (C) (D) Keď je baktéria vystavená antibiotiku alebo stresu, aktivuje sa SOS odpoveď, zatiaľ čo respirácia bunky a tvorba energie je inaktivovaná, čím sa inhibuje replikácia, transkripcia a translácia DNA (prevzaté a upravené podľa Jung et al. 2019; vytvorené pomocou BioRender.com).

2.1.3 Fenomén perzistencie u G^+ a G^- baktérií

Navodenie perzistentného stavu sa u grampozitívnych (G^+) a gramnegatívnych (G^-) baktérií mierne odlišuje. Jedno z najvýznamnejších rozdielov sú TA systémy, ktoré u G^- baktérií *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* a *Mycobacterium* napomáha k vytváraniu perzistentného stavu, zatiaľ čo u G^+ baktérie, ako je *S. aureus* nebolo až donedávna preukázaný vzťah medzi TA systémom a vzniku perzisterov. U *E. coli* môžeme nájsť niekoľko TA systémov, ktoré majú pozitívny efekt na vytvorenie perzistentných buniek. Medzi tieto TA systémy patria napr. HipAB, MazEF, MqrSA, RelBE, YafNO, GhoST, TisB, HokB a ďalšie. Habib a jeho kolegovia (2020) objavili prvý TA systém typu I (TMCS), ktorý pozostáva z troch komponentov, a to z toxínu, antitoxínu a regulátoru u *S. aureus*. Tento systém selektívne zabíja perzistentné bunky, inhibuje rast bunky a bráni funkcii MDR (multidrug resistance) efluxnej pumpy NorA. Delécia génu *norA*, ktorá vytvára túto efluxnú pumpu znižuje síce rezistenciu na fluorochinolóny, ale zvyšuje prežívanie perzistentných buniek. TA systém TMCS reguluje,

interaguje s touto exfluxnou pumpou a inhibuje ju, čím môže prispievať k zvýšenému prežívaniu perzisterov (Habib a kol. 2020; Helaine a Ronneau 2019).

Na druhej strane QS systémy napomáhajú vytvárať perzistentné bunky ako u G^+ , tak aj u G^- baktérií. Prechod z akútnej infekcie do chronickej záleží na génoch, ktorých expresiu riadi práve QS u baktérie *P. aeruginosa*. Viac ako 10 % génov je regulovaných QS u tejto baktérie. U baktérie *S. aureus* prechod do chronickej infekcie a vytváranie perzisterov tiež záleží na QS. Tento systém navodzuje perzistentný stav aj u ďalších baktérií, ako napr. *E. coli* alebo *B. subtilis* (Bareia et al. 2018; Moradali et al. 2017; Trastroy et al. 2018).

Vytvorenie biofilmu u patogénnych baktérií, ako je napr. *P. aeruginosa* je jedna z možností ako prežiť nepriaznivé podmienky prostredia. V týchto biofilmoch sa nachádza veľké množstvo perzisterov, ktoré sú chránené pred fagocytózou, oxidatívnym stresom ako aj pred antibiotikami (Moradali et al. 2017).

Grampozitívne baktérie vytvárajú až rádovo viac perzistentných buniek voči antibiotikám ako gramnegatívne baktérie. Tento rozdiel pravdepodobne spôsobuje skutočnosť, že G^+ baktérie disponujú s bunkovou stenou, ktorá ich účinnejšie chráni proti nepriaznivým podmienkam naproti G^- baktériám, ktoré bunkovú stenu nemajú (Salcedo – Sora a Kell 2020).

2.2 Mechanizmy perzistencie u *S. aureus*

Tak ako mnohé patogénne baktérie aj *S. aureus* zapríčiňuje chronické infekcie, kedy úspešne uniká imunitnému systému hostiteľa, a tým dokáže v hostiteľovi prežívať dlhší čas. Tento patogén, tým že vytvára subpopuláciu perzistentných buniek, ktoré sú schopné odolávať antibiotikám vytvára chronickú infekciu. Small colony variants (SCVs) sú formou perzistentných buniek u *S. aureus*, avšak nie jedinou (bakteriálne L – formy). Jedná sa o pomaly rastúce bunky, ktoré často nesú mutácie spomaľujúce ich rast v hostiteľovi (Tuchscher et al. 2020).

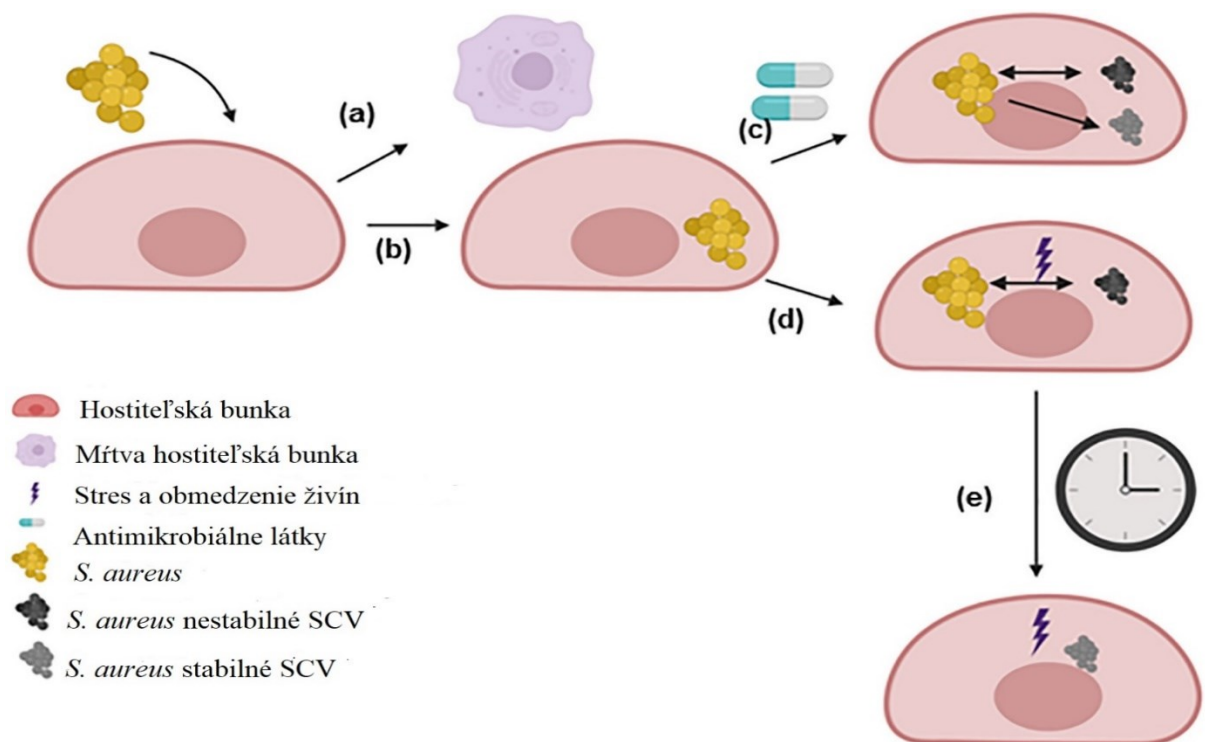
2.2.1 Small colony variants (SCVs)

Táto subpopulácia buniek sa vyznačuje tým, že vytvárajú malé kolónie na agare, majú zníženú produkciu pigmentu ako aj hemolyzínu, taktiež majú znížený membránový potenciál, čo im dáva výhodu proti pozitívne nabitým antimikrobiálnym látkam (Proctor et al. 2006, citované podľa Tuchscher et al. 2020).

Niektoré bunkové procesy, ako napr. transport elektrónov, biosyntéza bunkovej steny, globálne regulačné gény, CO_2 , mastné kyseliny zvyšujú tvorbu SCV. SCV bunky môžeme

rozdeliť na stabilné a nestabilné, pričom nestabilné sa môžu zmeniť na stabilné počas dlhodobého pretrvávania v hostiteľských bunkách (pri pôsobení určitých antimikrobiálnych látok) alebo za určitých stresových podmienok (viď obrázok č. 4) (Tuchscher et al. 2020).

Tieto bunky nie je jednoduché sledovať v laboratórnych podmienkach, nakoľko klinické izoláty sa často menia na rodičovský fenotyp. Všetky stafylokokové kmene sa teoreticky môžu zmeniť na SCV a spôsobiť tak chronickú infekciu. Agr QS systém (viď kapitola 2.4.1) interakciou s rôznymi molekulami znižuje tvorbu virulentných faktorov v SCV, čím napomáha dlhodobému prežívaniu v hostiteľských bunkách (Tuchscher et al. 2020).



Obrázok č. 4: Tvorba SCV v hostiteľských bunkách. Po vniknutí *S. aureus* do hostiteľských buniek môžu nastať dva scenáre, (a) hostiteľská bunka zomrie alebo (b) baktérie v hostiteľských bunkách prežívajú dlhší čas. *S. aureus* používa hostiteľské bunky ako úkryt pred imunitnou odpoveďou a antimikrobiálnymi látkami. Intracelulárne prostredie spúšťa selekciu baktérií, ktoré majú mutácie v génoch metabolizmu. (C) Použitie niektorých antimikrobiálnych látok môžu viesť k tvorbe perzisterov, ktoré môžu, ale nemusia byť SCV. V tomto prípade sú SCV stabilné alebo nestabilné. (D) V hostiteľských bunkách *S. aureus* bojuje proti účinkom stresu (hladovanie, molekuly hostiteľa). Za takýchto podmienok sa vyberajú nestabilné SCV. Táto subpopulácia sa vie rýchlo navrátiť na pôvodný divý fenotyp podľa podmienok prostredia (v bohatom médiu niekoľko nestabilných SCV sa zmení naspäť na divý typ). (E) Dlhodobé pretrvávajúce nestabilných SCV *S. aureus* v stresových podmienkach sa selektujú na stabilné SCV (prevzaté a upravené podľa Tuchscher a kol. 2020, obrázok bol Tuchscherrom a jeho kolektívom vytvorený v BioRender.com).

2.2.2 Bakteriálne L – formy

L – formy baktérií sa vyznačujú neúplnou bunkovou stenou ako aj pozmenenou morfológiou. Mnoho klinicky významných mikrobiálnych druhov je schopné vytvoriť L – formy, keď sú vystavené určitým environmentálnym stresom (Xu et al. 2020).

Tieto bakteriálne formy sa vyznačujú premenlivým tvarom, osmoprotektívnym stavom. Na mäkkom agare tvoria tzv. „fried egg“ kolónie a zoskupujú sa na jedno miesto, preto je ťažké ich rozptýliť. Ich neúplnosť bunkovej steny dáva odolnosť voči antibiotikám, ktorých cieľom je bunková stena (Xu et al. 2020).

Môžu vytvárať ako stabilné tak aj nestabilné L – formy a uvádzajú sa ako sféroplasty alebo protoplasty dôsledku čiastočnej alebo úplnej absencie bunkovej steny. Stabilné L – formy (sú genetickými variantmi) nie sú schopné sa navrátiť na rodičovský typ a nevedia vytvárať bunkovú stenu, preto je možné, aby rástli na médiu bez pridania inhibítorov bunkovej steny. Na druhú stranu nestabilné L – formy (sú fenotypové varianty) sú schopné sa navrátiť na rodičovský typ bunky a vytvárať tak bunkovú stenu. Tento typ L – formy vyžaduje inhibítor bunkovej steny ako aj hyperosmotickú ochranu (Allan et al. 2009, citované podľa Xu et al. 2020).

L – formy môžeme nachádzať u rôznych bakteriálnych druhoch a sú úzko spojené s perzistenciou. L – formy *S. aureus* sú zapojené v mnohých pretrvávajúcich infekčných chorobách, ktorých liečba je veľmi náročná (Xu et al. 2020).

2.3 Vyhliadky do budúcnosti

Bakteriálna perzistencia bola dlhé roky v ústraní a nevenovalo sa mu toľko pozornosti ako rezistencii. Naše poznatky o tomto fenoméne zďaleka nie sú dostatočné. Do formovania perzistentných buniek sa zapája mnoho procesov a mechanizmov, ktoré sa líšia ako u G⁺ a G⁻ baktérií tak aj medzi druhmi.

Stafylokokové infekcie sú v dnešnej dobe veľkým problémom. Tieto infekcie majú náročnú liečbu, ktorá často zlyhá, pretože táto baktéria môže vytvárať subpopuláciu perzistentných buniek, ktorá vedie ku chronickej infekcie a z týchto perzistentných buniek sa navyše môžu formovať SCV bunky ako aj bakteriálne L – formy.

Pre úspešnú liečbu chorôb spôsobených perzistentnými bunkami je potrebné skúmať mechanizmy, dráhy, ktoré sú zapojené do tvorby perzisterov. Fluorescenčné proteíny, časozberná mikroskopia a prietoková cytometria nám umožňujú sledovanie perzisterov *in vivo*

na úrovni jednej bunky. Dôležitým ukazovateľom úspechu alebo zlyhania liečby môže byť hladina ATP v bunkách počas bakteriálnej infekcie (Conlon et al. 2016; Michiels et al. 2016).

Aj keď sa vo všeobecnosti hovorí o bakteriálnej perzistencii, tento jav môžeme pozorovať aj u eukaryotických mikroorganizmoch ako *C. albicans* alebo *S. cerevisiae* a dokonca aj u rakovinových buniek. Podobne ako u bakteriálnej perzistencii aj u rakovinových bunkách sa vytvoria také, ktoré si časom vytvoria odolnosť voči liekom a po skončení chemoterapie sa ochorenie opäť navráti (Michiels et al. 2016).

2.4 Regulácia virulencie u *S. aureus*

Regulácia virulenčných faktorov je komplexná sieť, ktorá interaguje ako s hostiteľom tak aj vonkajším prostredím. Jedným z týchto regulátorov sú dvojkomponentové systémy (TCSs – two component systems), kde vonkajší signál aktivuje membránovo viazanú histidin kinázu jej autofosforyláciou, ktorá následne fosforyluje a aktivuje hlavný regulátor (response regulator). Hlavný regulátor sa následne viaže na DNA a mení expresiu cieľového génu. Väčšina kmeňov *S. aureus* kóduje až 16 dvojkomponentových systémov, avšak len jedna je esenciálna (*WalKR*) a v mnohých kmeňoch sú ostatné dvojkomponentové systémy inaktivované (Matsuo et al. 2010, Somerville a Proctor 2009, Villanueva et al. 2018, White et al. 2014, citované podľa Jenul a Horswill 2019).

Dvojkomponentové systémy *agrAC*, *saeRS* a *arlRS* regulujú veľké množstvo proteínov, ktoré vytvára hostiteľ a sú zapojené aj vo virulencii *S. aureus*. Z týchto systémov je najlepšie preštudovaný systém *agr* (accessory gene regulator) (Jenul a Horswill 2019).

Aby *S. aureus* prežil prostredia hostiteľa pre reguláciu virulencie používa i cytoplazmatické regulátory, ktoré sú spojené s dvojkomponentovými systémami. Medzi najdôležitejšie regulátory patria transkripčné regulátory pochádzajúce z proteínovej rodiny SarA (SarA, Rot, MgrA, a ďalšie) a alternatívne sigma faktory (SigB a SigH) (Jenul a Horswill 2019).

2.4.1 Agr quorum sensing systém

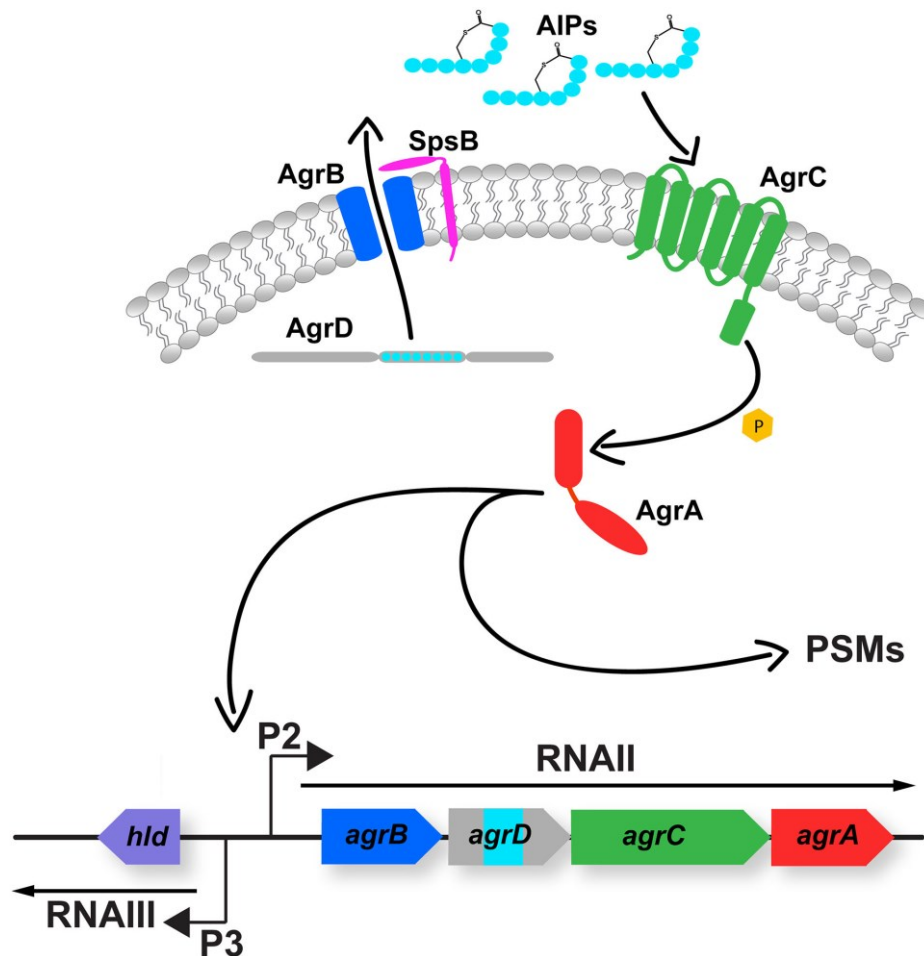
Quorum sensing je komunikácia medzi bunkami počas ktorého bunky vytvárajú difuzívne molekuly, autoinduktory, a tým sú schopné cítiť lokálnu hustotu populácie. Agr systém obsahuje gén, ktorý kóduje prekursor autoindukujúceho peptidu, AIP (autoinducing peptides), ktorý tento systém vníma a tým ho aktivuje (Wang a Muir 2016).

2.4.1.1 Organizácia Agr systému

Agr systém pozostáva z P₂ a P₃ operónu, ktoré sa nachádzajú v bezprostrednej blízkosti a v opačnej transkripčnej orientácii.

Operón P₂ kóduje polycistrónnu RNAII, ktorá obsahuje štyri otvorené čítacie rámce pre *agrBDCA* gény. Prekursorom pre AIP je proteín AgrD, ktorý je proteolyticky štiepený membránovo viazanou peptidázou AgrB a vytvára sa tak intermediát. Aby AIP bol plne maturovaný musí sa podrobiť ďalšiemu štiepeniu po exporte intermediátu do extracelulárneho priestoru. Maturovaný AIP aktivuje dvojkomponentový systém pozostávajúci z membránovo viazanej histidin kinázy, AgrC, a z hlavného regulátora (response regulator), AgrA. AgrC po vnímaní AIP sa autofosforyluje a aktivuje fosforylačnú kaskádu, ktorá vedie k fosforylácii AgrA. Fosforylovaná AgrA sa viaže na promótor P₂ a P₃ a zaháji expresiu RNAII a RNAIII (viď obrázok č. 5) (Jenul a Horswill 2019; Novick et al. 1993, Novick et al. 1995, citované podľa Wang a Muir 2016).

Z operónu P₃, ktorý je závislý na AgrA sa transkribuje RNAIII, ktorý je hlavným efektorom *agr* quorum sensing systému. RNAIII reguluje produkciu virulénnych faktorov. Regulácia môže prebiehať priamo na transkripčnej úrovni, kedy sa mení iniciácia transkripcie alebo na posttranskripčnej úrovni, kedy regulačná RNA interaguje s transkriptom cieľového génu. RNAIII je veľká regulačná RNA, ktorá pozostáva z komplexnej sekundárnej štruktúry, ktorá je bohatá na C vlásenkové štruktúry, vďaka ktorým vie interagovať s cieľovou mRNA. Okrem regulačnej funkcie kóduje i delta hemolysin (exoproteín) (Geisinger et al. 2006, Novick et al. 1993, citované podľa Jenul a Horswill 2019; Wang a Muir 2016).



Obrázok č. 5: Schematické znázornenie molekulárnej organizácie, signálnej biosyntézy a transdukčnej kaskády *agr* quorum sensing systému. Peptid AgrD kóduje signál pre autoindukčný peptid (AIP). AgrD je spracovaný a transportovaný do vonkajšieho prostredia pomocou AgrB a signálnej peptidázy SpsB. Keď extracelulárna koncentrácia AIP dosiahne kritickú hodnotu, signál je vnímaný histidin kinázou AgrC, ktorá sa autofosforyluje. Fosfát sa následne prenesie na AgrA, ktorý sa viaže na promótor P₂ a P₃, ktoré riadia expresiu RNAII a RNAIII. Transkript RNAII obsahuje operón *agrBDCA*, kódujúci primárne aparát na biosyntézu a detekciu AIP. RNAIII je hlavná efektorová molekula Agr systému a poháňa expresiu cieľových génov nachádzajúcich sa downstream. Fosforylované AgrA sa taktiež viaže na promótor pre gény modulínov rozpustných vo fenole (PSM), čo následne vedie ich expresii (prevzaté od Jenul a Horswill 2019).

2.4.1.1.1 Modulíny rozpustné vo fenole (PSM – phenol soluble modulins)

AgrA je schopné regulovať aj gény modulínov rozpustných vo fenole (PSM – phenol soluble modulins), a to priamym naviazaním sa na promótor operónov, ktoré kódujú α – PSM a β – PSM (Queck et al. 2008, citované podľa Jenul a Horswill 2019). Tieto molekuly sú skupinou virulénnych faktorov nachádzajúcich sa v *S. aureus* (Xu et al. 2017). α – skupina PSM pozostáva z 20 aminokyselín a pre mnohé bunky je cytotoxická. Nešpecificky ničí bunkovú membránu. β – skupina PSM pozostáva zo 44 aminokyselín a naproti skupine α nie je cytotoxická (Bojer et al. 2018).

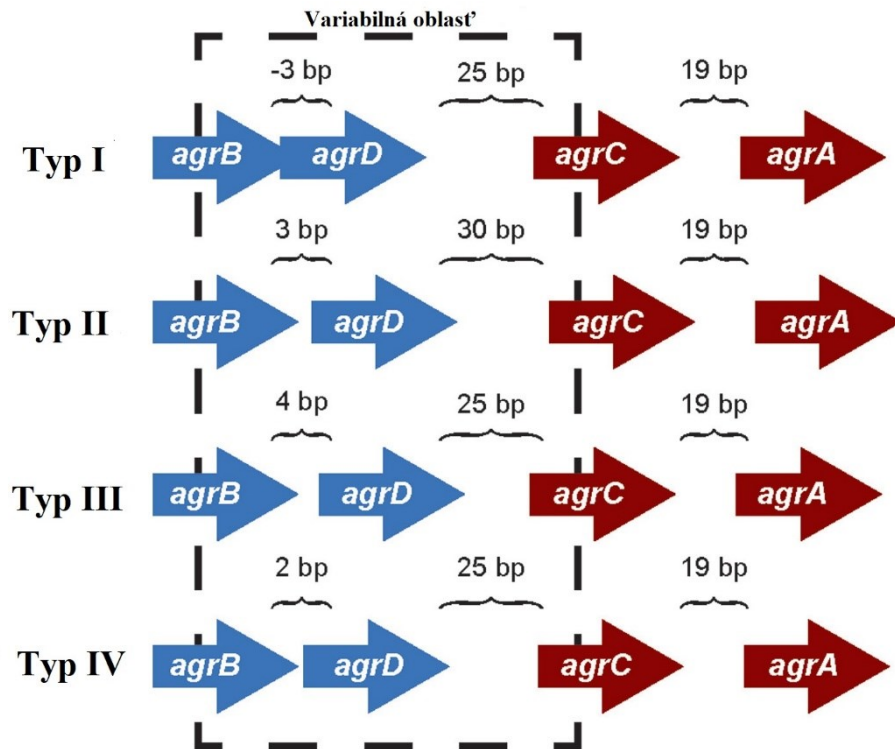
Regulácia formovania perzistentných buniek u *S. aureus* je spojené s Agr systémom, ktorý reprimuje vznik perzisterov a regulácia je na RNAIII závislá nepriamo. Do regulácie sa zapájajú PSM molekuly. Mutácie v Agr systéme, ako delécia génov *agrCA* a *agrD* znižuje expresiu génov zapojených do virulencie a gény, ktoré sú združené s PSM sú silne reprimované. V exponenciálnej aj stacionárnej fázy rastu expresia génov *psm α 1 – 4* a *psm β 1 – 2* je regulovaná AgrCA a RNAIII. Kým AgrCA tieto gény upreguluje, tak RNAIII ich nepriamo cez expresiu modulínov naopak downreguluje. Delécia génov *agrCA*, *psm α 1 – 4* a *psm β 1 – 2* zlepšuje formovanie perzisterov (Xu et al. 2017).

PSM α obmedzuje vznik perzisterov, a to ako toxický peptid produkovaný endogénne alebo pridaný ako súčasť stafylokokového supernatantu. Toto naznačuje, že pôsobí exogénne. Je pravdepodobné, že tieto modulíny interagujú priamo s perzistentnými bunkami a zvyšujú ich citlivosť na antibiotiká. Predpokladá sa, že počas akútnej infekcie PSM obmedzujú množstvo perzistentných buniek zvýšením citlivosti na antibiotiká pomocou modulácie ich membrány. Počas chronickej infekcie sa naopak ich produkcia zníži, čo vedie k vytváraniu perzisterov, ktoré odolávajú antibiotikám (Bojer et al. 2018).

2.4.1.2 Typy Agr systémov

S. aureus je schopný vytvárať štyri typy AIP molekúl podľa ktorých je možné kmene tejto baktérie rozdeliť do štyroch *agr* typov. AIP molekuly charakterizujú rozdielne motívy s rozličnou dĺžkou (Choudhary et al. 2018).

Agr typy majú rozdielne usporiadanie génov v *agr* lokuse ako aj variácie sekvencií nielen *agrD* ale i *agrB* exportéru a *agrC* histidin kinázy a vyznačujú sa prítomnosťou rozličných virulenčných génov. Gény *agrC* a *agrA* sú vzdialené od seba 19 bp. Táto vzdialenosť je vo všetkých štyroch *agr* typoch konzervovaná. Vysoko variabilná oblasť, ktorá jednotlivé typy od seba odlišuje sa rozprestiera od C – terminálneho konca *agrB*, zahrňuje celý *agrD* gén a končí N – terminálnou oblasťou *agrC* (vid' obrázok č. 6) (Dufour et al. 2002, citované podľa Jenul a Horswill 2019; Choudhary et al. 2018).



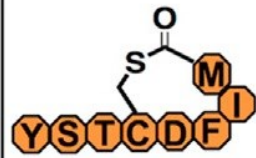
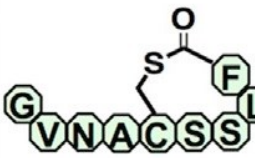
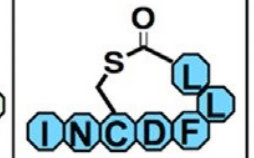
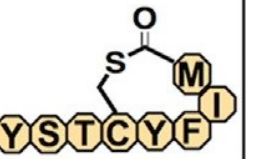
Obrázok č. 6: *agr* lokus v rôznych typoch *agr*. Intergénové vzdialenosti medzi génmi *agrB*, *agrD*, *agrC* a *agrA* sú konzervované v *agr* typoch. Čierna bodkovaná čiara zvyrazňuje variabilnú oblasť v *agr* lokuse (prevzaté a upravené podľa Choudhary et al. 2018).

Aj keď väčšina virulénnych génov je konzervovaná v kmeňoch *S. aureus* je možné nájsť málo rozdielov medzi jednotlivými typmi. Prítomnosť alebo naopak neprítomnosť určitých virulénnych faktorov je závislé na *agr* type daného kmeňa *S. aureus* (Choudhary et al. 2018).

Niektoré kmene typu I a typu II, majú inaktívovaný Agr systém transpozázou alebo prídavným hypotetickým génom vloženým do *agr* lokusu. Inaktivácia Agr systému pravdepodobne dáva bunkám výhodu pri určitých nepriaznivých podmienkach (Choudhary et al. 2018).

Kmene *S. aureus*, ktoré nesú rovnaký *agr* typ, sú schopné aktivovať si navzájom Agr systém, zatiaľ čo kmene, ktoré majú rôzny *agr* typ vo väčšine prípadov silne inhibujú Agr systém iného *agr* typu. Mechanizmus, ktorým sa to docieľa je inhibícia funkcie AgrC receptora,

tento jav nazývame „agr interferencia“ (viď obrázok č. 7) (Ji et al. 1997, citované podľa Jenul a Horswill 2019; Wang a Muir 2016).

	 AIP-I	 AIP-II	 AIP-III	 AIP-IV
agr-I	aktivátor	inhibítor	inhibítor	aktivátor
agr-II	inhibítor	aktivátor	inhibítor	inhibítor
agr-III	inhibítor	inhibítor	aktivátor	inhibítor
agr-IV	aktivátor (slabý)	inhibítor	inhibítor	aktivátor

Obrázok č. 7: Štruktúra a účinnosť AIP zo všetkých štyroch podskupín *S. aureus* (prevzaté a upravené podľa Wang a Muir 2016).

2.4.1.3 Regulácia Agr systému

Agr systém hrá ústrednú úlohu v patogenéze *S. aureus*, preto táto baktéria vyvinula rôzne stratégie, aby sa expresia génov Agr systému rýchlo prispôbila meniacim sa podmienkam, či už ide o environmentálne podnety alebo podnety hostiteľskej bunky (Jenul a Horswill 2019).

2.4.1.3.1 Dvojkomponentový systém ArIRS (autolysis regulated locus)

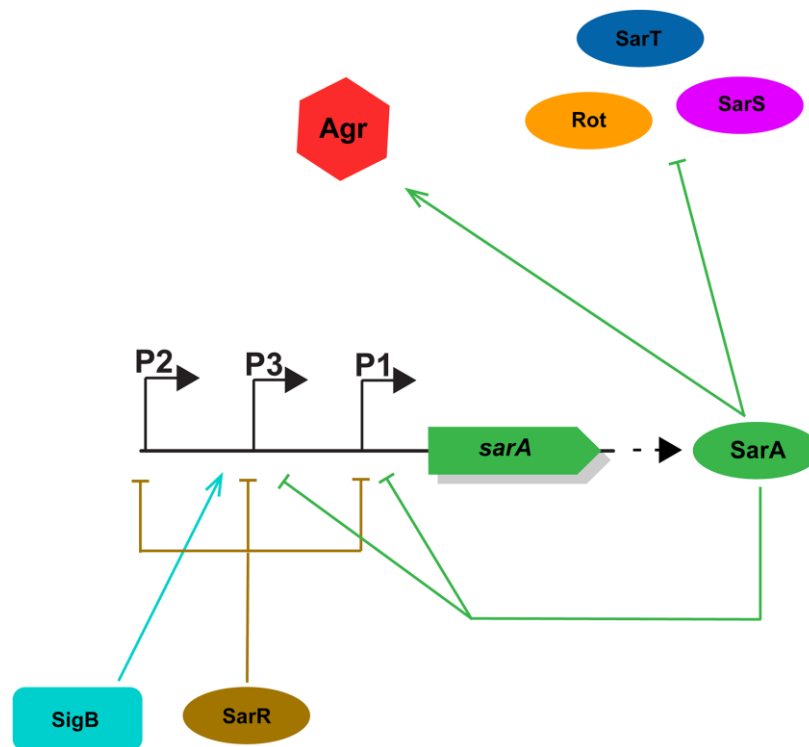
Má negatívny účinok na *agr*, a to downreguláciou expresie RNAII a RNAIII. Pozitívne reguluje serinové proteázy, ktoré sú schopné štiepiť protilátky a blokovat' ich aktivitu. Tento systém je schopný aktivovať gény, ktoré sú zapojené do metabolizmu aminokyselín ako zdroji uhlíka (Fournier et al. 2000, Fournier et al 2001, citované podľa Jenul a Horswill 2019; Jenul a Horswill 2019).

2.4.1.3.2 Proteín CodY

Jedná sa o transkripčný faktor, ktorý reguluje bunkovú odpoveď na obmedzenie živín a metabolický stres. Vníma intracelulárnu koncentráciu GTP a bočné reťazce aminokyselín. Viaže sa na P₁ promótor, ktorý sa nachádza v oblasti génu *agrC*. Tento promótor je slabý a riadi len expresiu génu *agrA*, napriek tomu je *agr* negatívne regulovaný týmto proteínom, keď sa naviaže na P₁ promótor (Jenul a Horswill 2019; Sonenshein 2005, citované podľa Jenul a Horswill 2019).

2.4.1.3.3 Rodina SarA proteínov

- SarA – jej expresia prebieha z troch promótorov a vznikajú tak tri prekrývajúce sa transkripty. Je schopná sa naviazať na vlastný promótor a blokovat' tak RNA polymerázu, čím sa dosiahne represia expresie. Proteín SarR pôsobí ako negatívny regulátor. Viazu sa na všetky tri promótory *sarA* lokusu. Pozitívne je regulovaný alternatívnym sigma faktorom SigB (viď obrázok č. 8). Samotný proteín SarA pozitívne reguluje *agr* naviazaním sa na P₂ promótor a jeho zosilnením. Priamo reguluje i rôzne virulečné faktory (zhrnuté v review Jenul a Horswill 2019).



Obrázok č. 8: Oblasť promótoru *sarA* a regulačná sieť SarA. Expresia génu *sarA* je riadená tromi rôznymi promótorami (P₁, P₂ a P₃). Alternatívny sigma faktor B (SigB) riadi expresiu *sarA* väzbou na promótor P₃. Väzbou SarR na všetky tri promótory sa inhibuje expresia a bráni sa autoregulácii pomocou SarA. SarA je aktivátorom Agr systému a môže tiež fungovať ako negatívny regulátor troch proteínov podobných SarA, a to SarH1, SarT a Rot (prevzaté od Jenul a Horswill 2019).

- SarR – negatívne reguluje expresiu *agr* naviazaním sa na P₂ promótor. Väzba SarR je silnejšia ako SarA, čím ho vytesní a udržuje tak negatívnu reguláciu cez funkciu *agr* (Manna a Cheung 2001, Reyes et al. 2011, citované podľa Jenul a Horswill 2019).
- Rot (repressor of toxins regulatory protein) – reprimuje expresiu génov enterotoxínu B, alfa – toxínu, proteáz a lipázy. Rot je pomocným regulátorom *agr*, nakoľko Rot regulón

a Agr systém sa prekrývajú. V stacionárnej fázy rastu je expresia génu *rot* reprimovaná SarA proteínom, sigma faktorom B a RNAlII. SarA proteín sa priamo viaže na promótor, kým RNAlII blokuje transláciu génu *rot* (zhrnuté v review Jenul a Horswill 2019).

- MgrA – pozitívne reguluje *agr* aktiváciou P₃ promótoru. Tento proteín reguluje efluxné pumpy NorA a NorB, ktoré udeľujú rezistenciu voči rôznym antibiotikám (zhrnuté v review Jenul a Horswill 2019).

2.4.1.3.4 Alternatívny sigma faktor B (SigB)

SigB reguluje expresiu génov proteínov stresovej odpovedi, aby sa bakteriálna bunka vedela prispôbiť daným nepriaznivým podmienkam (Jenul a Horswill 2019).

Operón *sigB* sa skladá z génov *rsbU*, *rsbV* a *rsbW*. Expresia *sigB* je riadená pomocou SigA ako aj samotným SigB. SigA aktivuje expresiu celého operónu, kým SigB aktivuje expresiu *rsbV* a *rsbW*. Rsb (regulation of sigma B) proteíny regulujú aktivitu SigB na posttranslačnej úrovni. Počas kludového stavu je SigB spojený s anti – sigma faktorom RsbW a je inaktívny. Keď nastanú stresové podmienky na anti – sigma faktor sa naviaže anti – anti - sigma faktor RsbV, čím sa SigB uvoľní od RsbW a naviaže sa na holoenzým RNA polymerázy. RsbU sa nachádza v operóne na prvom mieste a je nevyhnutný pre aktiváciu SigB (Giachino et al. 2001, Guldumann et al. 2016, Senn et al. 2009, citované podľa Jenul a Horswill 2019).

SigB priamo aj nepriamo kontroluje približne 200 génov, a to vrátane génov s funkciou virulencie, tvorbou biofilmu, perzistencie, membránovým transportom a rezistenciou na antibiotiká (Guldumann et al. 2016, citované podľa Jenul a Horswill 2019).

V *S. aureus* sa nachádzajú gény pre 3 globálne regulátory, a to *agr*, *sarA* a *sigB*, ktoré navzájom interagujú. *S. aureus* je schopný z akútnej infekcie prejsť na chronickú infekciu, a to vďaka týmto regulátorom. Počas akútnej infekcie je potrebné, aby bolo čím viac buniek, ktoré produkujú virulénne faktory, ktoré sú pre hostiteľskú bunku toxické. V tomto prípade sú aktívne regulátory *agr* a *sarA*. Počas chronickej infekcie je potrebné, aby bakteriálne bunky unikali imunitnej odpovedi hostiteľa, preto je dôležité, aby sa tvorba virulénnych faktorov inhibovalo. SigB inhibuje ako *agr* tak aj *sarA* a napomáha formovaniu perzistentných buniek. SigB taktiež sprostredkuje formovanie tzv. SCV buniek, ktoré sú jednou z foriem perzistentných buniek u *S. aureus*. Bolo dokázané, že delécia génu *sigB* neumožňuje vytvorenie SCV buniek (Tuschcherr et al. 2015).

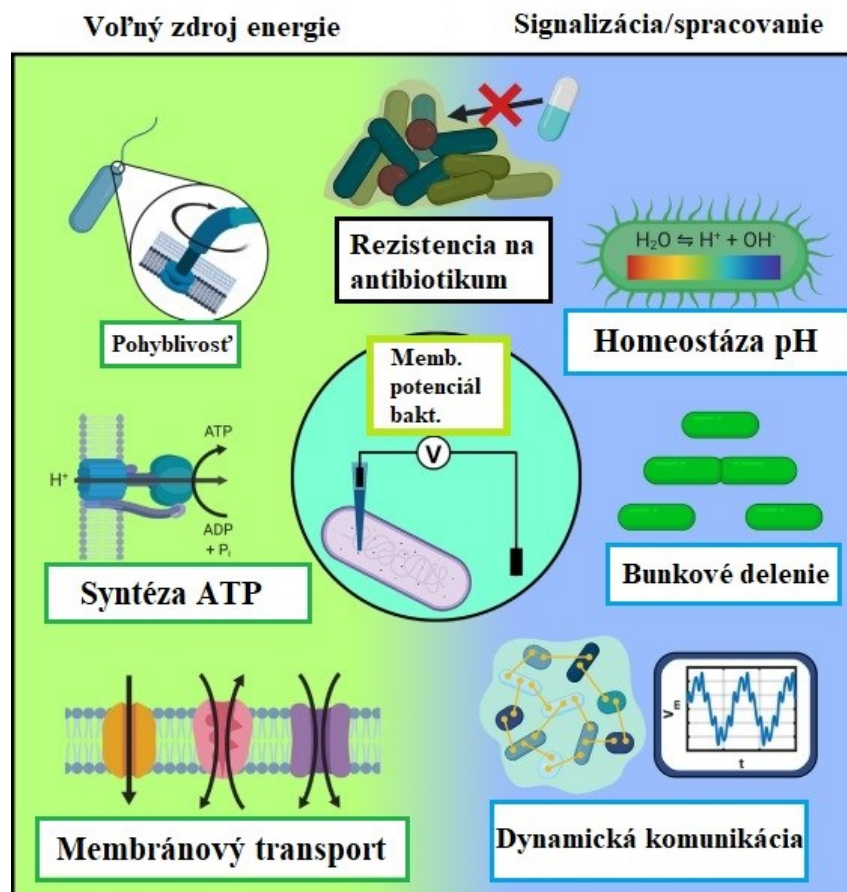
2.4.2 Perzistencia a Agr systém

Genóm *S. aureus* nesie obrovské množstvo génov, ktoré kódujú faktory virulencie ako aj faktory, ktoré mu pomáhajú uniknúť pred imunitou hostiteľa. Práve expresia určitých virulenčných faktorov umožňuje tomuto patogénovi adaptovať sa na definované prostredie hostiteľa. Počas chronickej infekcie môžu nastať spontánne mutácie, ktoré dodávajú odolnosť voči antibiotikám. Tieto mutácie môžu byť výsledkom selekčného tlaku, ktoré spôsobujú rôzne hostiteľské faktory. Mutanty sú schopné lepšie sa vyhýbať imunitnej odpovedi hostiteľa ako rodičovský divý typ. Keď v hostiteľovi dlhodobo pretrváva perzistentný stav vedie to k zmenám v genóme *S. aureus* (Suligoy et al. 2018; Tong et al. 2015, Tuchscher et al. 2010, citované podľa Suligoy et al. 2018).

Mutácie v génoch Agr systému vedú k silnému utlmeniu virulencie a pravdepodobne k tvorby perzistentných buniek. Nefunkčnosť Agr systému môže zvýšiť tvorbu perzisterov prostredníctvom downregulácie PSM α a PSM β . Ako je vidieť z uvedených Agr systém hrá dôležitú úlohu pri tvorbe perzistentných buniek. Zaujímavosťou je, že Agr systém hrá regulačnú úlohu v metabolizme kyseliny sialovej, ktorá sa podieľa na tvorbe perzisterov a L – foriem *S. aureus* (Xu et al. 2017).

2.5 Membránový potenciál u baktérií

Bakteriálna bunka, aby vedela vykonávať ako chemickú tak aj mechanickú prácu potrebuje energiu. Zdrojom tejto voľnej energie je membránový potenciál (transmembránové napätie), čo je elektrochemický gradient prechádzajúci cez vnútornú stranu bakteriálnej membrány. Bakteriálny membránový potenciál je dynamický a reguluje širokú škálu fyziologických ako aj behaviorálnych dejov. Medzi tieto deje patrí napr. homeostáza pH, membránový transport, pohyblivosť, rezistencia na antibiotiká, delenie buniek, komunikácia pomocou elektrického potenciálu a vnímanie životného prostredia (viď obrázok č. 9). Membránový potenciál tvorí časť iónovej hybnej sily (IMF – ion motive force), čo je elektrochemický gradient iónov, ktoré prechádzajú cez membránu (zhrnuté v review Benarroch a Asally 2020).



Obrázok č. 9: Bakteriálne procesy, ktoré sú spájané s membránovým potenciálom. Membránový transport, syntéza ATP, pohyblivosť a rezistencia na antibiotiká sú procesy, ktoré sú poháňané iónovými silami, energiou získanou translokáciou iónov cez membránu. Baktérie tiež využívajú svoj membránový potenciál ako prostriedok na signalizáciu a spracovanie informácií. Depolarizáciou membránového potenciálu baktérie môžu vstúpiť do perzistentného stavu, v ktorom sú odolnejšie voči antibiotikám. Homeostáza pH je riadená protónovými pumpami, ktoré udržiavajú PMF (proton motive force), je teda závislá od membránového potenciálu. Bunkové delenie vyžaduje membránový potenciál na správnu lokalizáciu miesta delenia. Bakteriálny membránový potenciál môže dynamicky reagovať na molekulárne a elektrochemické signály, čo umožňuje medzibunkovú komunikáciu (prevzaté a upravené podľa Benarroch a Asally 2020).

Elektrochemický gradient poskytuje zdroj voľnej energie syntézou ATP, ktoré je následne použité v rôznych biologických procesoch. Syntéza ATP môže byť riadená ako protónovou hybnou silou (PMF – proton motive force) tak aj hybnou silou sodíka (SMF – sodium motive force). Jednou z úloh membránového potenciálu je pomocou hybnej sily protónov, ktoré prenášajú protóny cez cytoplazmatickú membránu vytvárať ATP pomocou ATP syntázy (Häse 2000, Mulkidjanian et al. 2008, citované podľa Benarroch a Asally 2020; Wilmaerts et al. 2019).

Niektoré látky je potrebné transportovať cez membránu proti koncentračnému gradientu v čom pomáha ionová hybná sila. Táto hybná sila má dôležitú úlohu pri príjme glukózy, antibiotík a naopak ako aj pri odstránení antibiotík pomocou efluxu. U baktérií *S. aureus* a *B. subtilis* účinnosť určitých liečiv závisí práve na membránovom potenciáli. Depolarizáciou membrány alebo keď dôjde ku zrúteniu membránového potenciálu sú schopné bunky odolávať antibiotikám a môžu vytvárať i perzistentnú subpopuláciu (Bryan a Kwan 1983, Poolman a Konings 1993, Taber et al. 1987, citované podľa Benarroch a Asally 2020).

Pomocou elektrických interakcií sú schopné bunky navzájom interagovať v rámci biofilmu, avšak táto interakcia, signalizácia nie je obmedzená len na biofilm, ale bunky rôznych bakteriálnych druhov sú schopné takto komunikovať. Takáto forma komunikácie u niektorých mikrobiálnych buniek sa nazýva elektrotaxia (galvanotaxia). Elektrickú signalizáciu bunka nevyužíva len na komunikáciu, ale je schopná vďaka nej vnímať aj prostredie, napr. bunky *B. subtilis* pomocou elektrickej signalizácie môžu kontrolovať osud, kvalitu vyvíjajúcich sa spór (Cortese et al. 2014, Liu et al. 2017, Mycielska a Djamgoz 2004, Sirec et al. 2019, citované podľa Benarroch a Asally 2020).

Zmenou membránového potenciálu sú bakteriálne bunky schopné brániť sa voči nepriaznivým účinkom vonkajšieho prostredia. Baktérie, aby sa ubránili antibiotikám pôsobiace na ribozómy a zvládli ribozomálny stres využívajú prílív horčičkových iónov (Lee et al. 2019, citované podľa Benarroch a Asally 2020).

2.5.1 Spojitosť medzi membránovým potenciálom a perzistenciou

Bakteriálna perzistencia je spojená so zníženým hladiny bunečnej energie, ktorá sa vytvára pomocou membránového potenciálu a ATP syntázy. Narušenie intracelulárnej hladiny ATP alebo vyvolanie kolapsu membránového potenciálu vedie k vytváraniu alebo k zvýšeniu tvorby perzistentných buniek. Znížením energetickej hladiny bakteriálne bunky znižujú aj syntézu DNA, bielkovín a peptidoglykán, čo vedie k zvýšenému prežívaniu pôsobenia antibiotík, ktoré sú zacielené práve na tieto komponenty. Hladina ATP zohráva úlohu aj pri rozpustnosti proteínov a pri kontrole ich kvality. Proteíny sa začnú agregovať, keď sa intracelulárna hladina ATP zníži. V týchto proteínových agregátoch sa nachádzajú aj proteíny, ktoré sú esenciálne pre hlavné bunkové procesy, a pretože sú nedostupné bunky prechádzajú do dormantného stavu a môžu tak prejsť aj do perzistentného stavu (zhrnuté v review Wilmaerts et al. 2019).

Krebsov cyklus vytvára pre bunku energiu. Počas tohto cyklu sa vytvára CO₂, NADH, FADH a ATP. Tieto látky môžu byť donorom elektrónov, ktoré vstupujú do elektrónového transportného reťazca a napomáhajú k vytváraniu membránového potenciálu. Mutácie v génoch Krebsovho cyklu tak môžu zapríčiniť znížený membránový potenciál nedostatkom tvorby donorov elektrónov. Bolo popísané, že inaktívacia génov *sucA* alebo *sucB*, ktoré kódujú podjednotky α – ketoglutarát dehydrogenázy, kľúčového enzýmu Krebsovho cyklu, vedie k zvýšenej tvorbe perzistentných buniek. Rovnaký jav bol popísaný aj pri inaktívácii iných génov kódujúce enzýmy Krebsovho cyklu alebo génu *atpA*, ktorý kóduje F₁ F₀ ATPázu u baktérie *S. aureus*. Mutanty v týchto génoch vykazujú znížený membránový potenciál a vytvárajú vysoké hladiny perzisterov. Bolo charakterizované, že v stacionárnej fázy rastu membránový potenciál hrá dôležitú úlohu pri tvorbe a prežívaní perzistentných buniek (Martínez-Reyes a Chandel 2020; Wang et al. 2018).

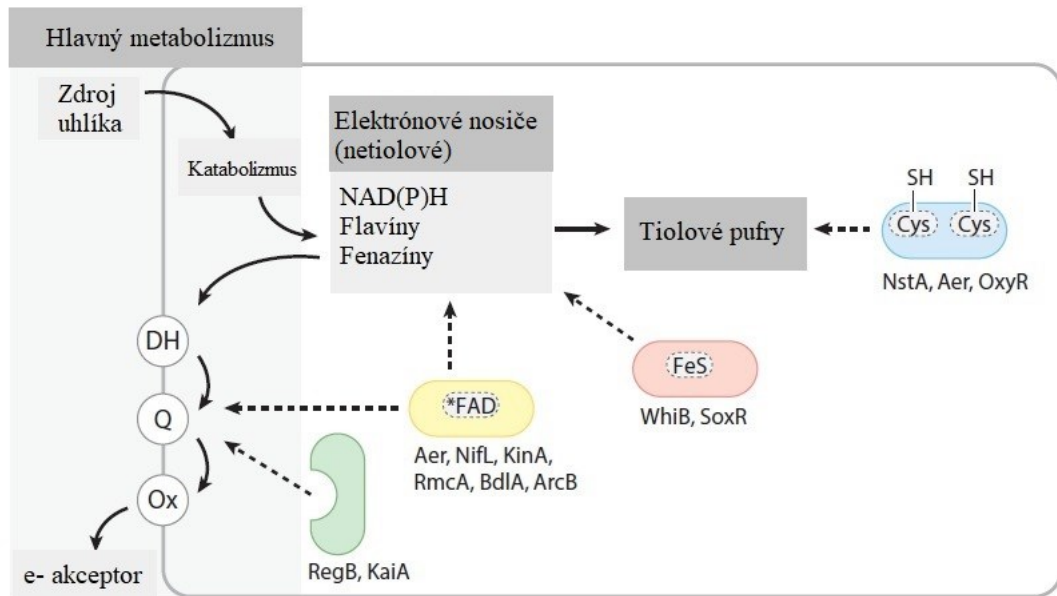
Konzervovaná GTPáza Obg má ústrednú úlohu pri navodení perzistentného stavu u *E. coli*, keď bunka má nedostatok živín. Pre navodenie perzistentného stavu Obg spolu s alarmónom (p)ppGpp aktivujú transkripciu TA modulu typu I *hokB/sokB*. Toxín HokB naruší membránu, čo vedie k jej kolapsu a zníženému membránovému potenciálu a navodí sa stav dormancie. Obg nekontroluje perzistenciu len u *E. coli*, ale aj v oportunistickom patogéne *P. aeruginosa* (Verstraeten et al. 2015).

2.6 Redoxný stav baktérií

Aby bakteriálna bunka bola schopná rásť a bola schopná prežiť je potrebné, aby tvorba ATP bola spojená s prenosom elektrónov. Tieto procesy sú závislé na elektrónových nosičoch, na stabilite proteínových zvyškov a kofaktorov (cysteinové, železo – sírne klastre). Silné oxidanty (O₂, H₂O₂) menia alebo poškodzujú tieto molekuly a navodia oxidatívny stres. Pre správne fungovanie elektrónových prenášačov a proteínov, ktoré sú citlivé na redoxný stav bunka udržiava zmenou metabolizmu cytoplazmatické prostredie vo vyváženom stave, tzv. redoxnej homeostáze (zhrnuté v review Sporer et al. 2017).

Elektróny prechádzajú množstvom bunkových reakcií. Podporujú tvorbu energie a pomáhajú udržiavať tioldisulfidovú homeostázu, ktorá podporuje správnu funkciu bielkovín. Počas tioldisulfidovej homeostázy sú tioredoxín a nízkomolekulové tioly v cytoplazme prítomné predovšetkým v redukovaných formách. Pri takýchto podmienkach v cytoplazmatických proteínoch sa len veľmi neochotne vytvárajú disulfidické väzby medzi cysteinovými zvyškami. Redoxný stav netiolových elektrónových nosičov, akými sú flavíny,

chinóny, nikotínamidadenindinukleotid (fosfát) [NAD (P)+] ako i samotné tioly (glutatión, tioredoxín) prispievajú k celkovému redoxnému stavu bunky (viď obrázok č. 10) (Aslund 1999, Bennett et al. 2009, Gilbert 1990, Holmgren a Fagerstedt 1982, Hwang et al. 1992, Jakob 2004, Leichert a citované podľa Sporer et al. 2017).



Obrázok č. 10: Diagram zobrazuje miesta v bakteriálnej bunke, v ktorých by redox – senzitivne bunky mohli využiť informácie o redoxnom stave bunky. Plné šípky označujú tok elektrónov, prerušované šípky označujú miesta vnímania. Skratky: DH – dehydrogenáza; FAD – flavinadenin dinukleotid; FMN – flavin mononukleotid; NAD(P)H – nikotínamidadenindinukleotid (fosfát), redukovaný; Ox – oxidáza; PAS – proteín s doménou Per-ARNT-Sim; Q – chinón (prevzaté a upravené podľa Sporer et al. 2017).

Počas redoxnej homeostázy v cytoplazme, kedy je dostatočné množstvo donorov elektrónov a oxidačný stres je nízky, cysteinové zvyšky na proteínoch sú v redukovanej forme. Senzorické proteíny, ktoré riadia odpoveď na redoxné zmeny, však disulfidické väzby môžu vytvoriť. Glutaredoxínový systém a tioredoxínový systém zabezpečuje redukciu disulfidových väzieb. V oboch systémoch sa nachádza flavoproteín, ktorý elektróny pochádzajúce z NADPH (redukovaný na NADP^+) používa na redukciu disulfidových väzieb (Meyer et al. 2009, citované podľa Sporer et al. 2017).

Tioly sú redox – aktívne molekuly, ktoré môžu mať vplyv na metabolizmus, génovú expresiu, správanie a vývoj baktérií, keď sa menia redoxné podmienky zmenou ich oxidatívneho stavu. Nízkomolekulové tioly sú schopné redukovať disulfidické väzby cysteinových zvyškov cytosolických proteínov, a tým napomáhajú k vytvoreniu homeostázy. Majú nízky redoxný potenciál a vysokú intracelulárnu koncentráciu, čo z nich robí ideálne

redoxné pufre, ktoré vytvárajú redukčný stav v cytoplazme. Medzi redoxné pufre môžeme zaradiť aj NAD(P)(H), ktorý je donorom aj akceptorom elektrónov a je zapojený ako v anabolických reakciách, tak aj v reakciách vytvárajúce energiu (Antelmann a Helmann 2011, Fahey et al. 1997, Newton et al. 2009, citované podľa Sporer et al. 2017; Sporer et al. 2017).

V chemoorganoheterotrofných baktériách, ktoré využívajú organické zlúčeniny ako zdroj uhlíka, energie a redukčnej sily donory elektrónov ovplyvňujú redoxný stav flavínov a chinónov, ktoré patria medzi redox – aktívne molekuly. Flavíny slúžia ako kofaktory proteínov alebo sa voľne nachádzajú v cytoplazme. Chinóny sprostredkujú prenos elektrónov v bakteriálnych a mitochondriálnych membránach (zhrnuté v review Sporer et al. 2017).

Oxidačný stav elektrónových nosičov môže slúžiť ako signál, ktorý poskytne bunke informáciu o tom aké sú redoxné podmienky. Tieto molekuly môžu slúžiť ako regulačné signály, ktoré riadia správanie baktérií ako na úrovni jednotlivca tak aj na úrovni populácie. Tieto kontrolné mechanizmy sa následne zapájajú do rastu baktérií a interakcie s hosťiteľmi (zhrnuté v review Sporer et al. 2017).

Bunky môžu využiť svoj redoxný stav ako zdroj informácie o prostredí a podľa danej informácie vedú primerane reagovať. Cytoplazmatický tiol – redoxný stav je schopný ovplyvniť metabolizmus. Dráhy, ktoré sú závislé na proteínoch s cysteinovými zvyškami sú ovplyvňované tvorbou alebo zamedzením tvorby disulfidových väzieb. Redoxné zmeny v bunke tiež môžu zapríčiniť i zmenu génovej expície (zhrnuté v review Sporer et al. 2017).

Zmena v dostupnosti donora alebo akceptora elektrónov núti baktérie zmeniť svoj metabolizmus, čím udržiavajú intracelulárny redoxný stav, čo im umožňuje prežitie a rast. Redoxný stav môže kontrolovať bakteriálne správanie, diferenciáciu ako i vývoj spoločenstva (zhrnuté v review Sporer et al. 2017).

2.6.1 Redoxný stav a perzistencia u *S. aureus*

Počas infekcie sa *S. aureus* stretáva s aeróbnym prostredím s nízkym redoxným potenciálom, a to v cytosole hosťiteľskej bunky. *S. aureus* sa adaptoval na toto nepriaznivé prostredie pomocou preprogramovania transkripčných regulátorov, ktoré sú citlivé na redox, ktorými sú AgrA, Rex a SrrA. Transkripčný regulátor Rex reguluje gény zapojené do anaeróbného metabolizmu. SrrA je súčasťou dvojkomponentového systému SrrAB, ktorý reguluje gény zapojené do elektrónového transportného reťazca, anaeróbného metabolizmu, v opravách nitrostatívneho poškodenia. Následkom tohto preprogramovania je navodenie fermentačného metabolizmu, zníženie rýchlosti rastu, rezistencia na určité antibiotiká

a zvýšenie tvorby SCV. Adaptácia na prostredie s nízkym redoxným potenciálom by mohla viesť k vytvoreniu a udržaniu perzistentných buniek ako i k perzistentným infekciám (Christmas et al. 2019; Kinkel et al. 2013).

Aeróbne prostredie s nízkym redoxným potenciálom aké môžeme nájsť v hostiteľskom cytosole potláča/vypína DNA väzbovú schopnosť AgrA. To je pravdepodobne docielené tým, že z redukovaných foriem flavínov a chinónov elektróny putujú na O₂ a vytvárajú sa tak reaktívne formy kyslíka. Tieto reaktívne formy kyslíka následne podporujú tvorbu intramolekulárnych disulfidických väzieb v DNA väzbovej doméne AgrA (Christmas et al. 2019).

Hlavnou súčasťou adaptívnej reakcie *S. aureus* na aeróbne prostredie s nízkym redoxným potenciálom je signalizácia zvýšeného pomeru NADH:NAD⁺ transkripčným regulátorom Rex, čo vedie k derepresii génov, ktoré sú ním regulované (Christmas et al. 2019).

V prítomnosti redukovanej formy glutathionu je možné pozorovať zvýšený výskyt SCV buniek, čo naznačuje tomu, že *S. aureus*, ktorý prežíva intracelulárne v hostiteľskej bunke (aeróbne prostredie, nízky redoxný potenciál) môže byť zdrojom týchto SCV buniek (Christmas et al. 2019).

3 Materiál a metódy

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriálne kmene

V tejto práci som pracovala s nasledujúcimi bakteriálnymi kmeňmi:

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* **RN4220**, ktorý má defektný restričný systém, ale má zachovaný modifikačný systém, preto je vhodný ako prechodný klonovací hositeľ (Nair et al. 2011)
- 7 klinickými izolátmi *S. aureus* z FN Motol s nižšie uvedenými informáciami:

Číslo pacienta	Označenie izolátu	Dátum odberu	Agr typ	Mutácie nami sledované
1.	39A●	18.04.2017	II	Primoizolát
	40A	23.07.2018		Žiadne výrazné mutácie oproti primoizolátu
	41A	04.02.2019		
	63A	25.11.2019		
2.	36A●	28.08.2018	III	<i>sigB</i> 142 R→L (substitúcia na pozícií 142, ktorá vedie k aminokyselínovej zámene arginínu na leucín
	51A	16.09.2019		
	75A	24.02.2020		

Tabuľka č. 1 : Klinické izoláty poskytnuté FN Motol a ich parametri. Označenie ●: primoizolát

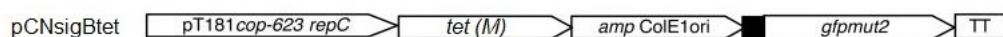
- Kmeňmi *Escherichia coli* :
 - ***E. coli* DH5α**
 - Genotyp: *deoR endA1 gyrA96 hsd R17 (rk-, mk+) recA1 relA1, supE44 thi – 1 (lac ZYA – arg F) U169 φ80lacZ M15 F – λ –*)
 - Charakterizácia: Kmeň *E. coli* DH5α obsahuje rôzne mutácie v génoch. Jedná sa o klonovací kmeň. Jej transformačná účinnosť je daná tým, že je defektný v homológnej rekombinácii a nedochádza k degradácii cudzorodej DNA.
 - Poskytnuté spoločnosťou CLONTECH.

- ***E. coli* K12 IM08B**
 - Genotyp: *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1*, *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG* Δ *dcm*, Ω *Phelp-hsdMS* (CC8-2) Ω *PN25-hsdS* (CC8-1)
 - Charakterizácia: Kmeň *E. coli* IM08B obsahuje *hsdM* a *hsdS* gény zo *S. aureus* NRS384 (sú súčasťou RM systému typu I u tohoto kmeňa), produkty týchto génov umožňujú špecifickú metyláciu DNA podľa *S. aureus*.
 - Poskytnutý výskumným centrom Biocev (Mgr. Gabriela Balíková-Novotná, Ph.D.)
- One Shot™ TOP10 *E. coli*
 - Genotyp: *F-* *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL (StrR)* *endA1 nupG*
 - Charakterizácia: Vyznačujú sa vysokou transformačnou účinnosťou a umožňujú stabilnú replikáciu vysokokopiových plazmidov.
 - Poskytnuté spoločnosťou ThermoFisher Scientific.

3.1.2 Plazmidy

pCNsigBtet – odvodený od plazmidu pCN56, namiesto kazety s erytromycínovou rezistenciou má kazetu pre tetracyklínovú rezistenciu.

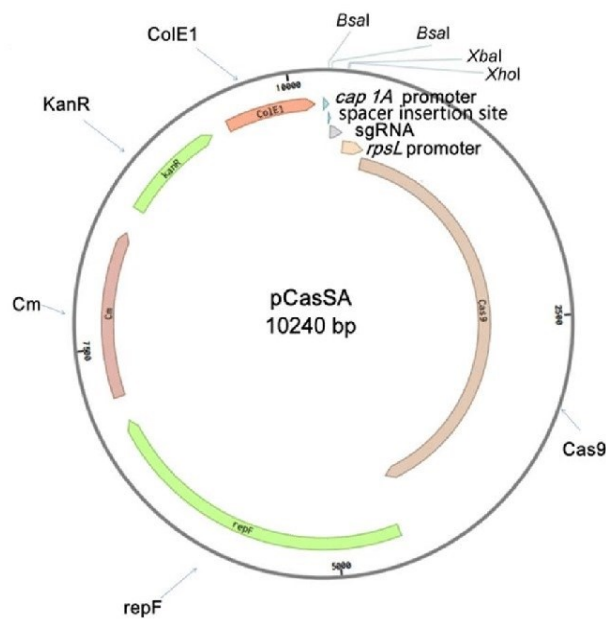
- Jedná sa o vysokokopiový plazmid s veľkosťou 6772 bp s nasledujúcimi komponentmi - TETr (*tetM*), MCS, GFP, TT.
- Plazmid bol vyrobený a poskytnutý Mgr. Hanou Kotkovou (Kotková 2019).
- Mapa:



pT181cop – 623repC je replikačný počiatok *S. aureus*, *tet(M)* kazeta pre tetracyklínovú rezistenciu, *ampColE1ori* replikačný počiatok *E. coli* spojený s kazetou ampicilínovej rezistencie (gen *bla*), ■ je multikópiové miesto (MCS) – miesto pre vloženie inzerty, *gfpmut2* je gén kódujúci GFP a TT je transkripčný terminátor

pCasSA – vysokokopiový plazmid s veľkosťou 10240 bp (10,240 kbp) s nasledujúcimi komponentmi – *cap 1A* promótor, spacer insertion site, sgRNA, *rpsL* promótor, Cas9, *repF*, *Cm*, *KanR*, *ColE1*

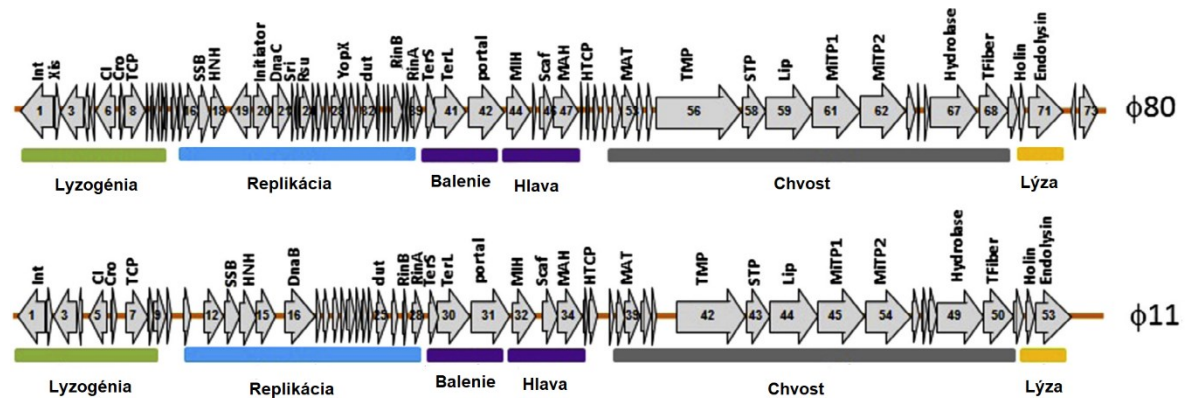
- Plazmid bol poskytnutý Dr. Balíkovou Novotnou z Biocevu.
- Mapa pCasSA:



cap 1A – promótor pre expresiu sgRNA, *rpsL* – promótor pre expresiu proteínu Cas9, *Cas9* – gén pre proteín Cas9, *repF* – termosenzitívny počiatok replikácie *S. aureus* pre odstránenie plazmidu po editácii (úprave), *Cm* – marker pre chloramfenikolovú rezistenciu v *S. aureus*, *KanR* – marker pre kanamycinovú rezistenciu v *E. coli*, *ColE1* – replikačný počiatok *E. coli*, *BsaI*, *XbaI*, *XhoI* – restričné miesta

3.1.3 Bakteriofágy

Bakteriofágy $\phi 11$ a $\phi 80$ – sú to stafylokokové siphovírusy s veľkosťou genómu 39 – 43 kb s 50 – 70 otvorenými čítacími rámcami. Ich genóm pozostáva zo šiestich funkčných modulov, a to z lyzogenie, replikácie DNA, balenia, hlavy, chvosta a lýzy. Patria do séroskupiny B. Majú vysokú transdukčnú efektívnosť a nízku frekvenciu lyzogenie (Xia a Wolz 2013).



Obrázok č. 11: Mapa genómu stafylokokových fágov $\phi 11$ (GenBank NC_004615.1) a $\phi 80$ (GenBank NC_009526.1) (prevzaté a upravené podľa Xia a Wolz, 2013).

3.1.4 Kultivačné médiá

Všetky médiá boli sterilizované v autokláve pri 120 °C a pretlaku vodnej pary 0,15 MPa po dobu 20 minút. Pred sterilizáciou bol pri príprave pevného média pridávaný agar (Oxoid) na konečnú koncentráciu 2 % (w/v).

Kultivačné médium pre *S. aureus*

- BHI médium – 12,5 g extrakt z mozgu, 5 g extrakt z hovädzieho srdca, 10 g pepton, 2 g glukóza, 5 g chlorid sodný, 2,5 g fosforečnan disodný
 - 37 g BHI média (Oxoid) bolo rozpustené v 1 litri destilovanej vody, následne sterilizovaný
- TSB médium – 17 g trypton, 3 g sója, 5 g chlorid sodný, 2,5 g fosforečnan didraselný, 2,5 g glukóza
 - 7,5 g TSB (Sigma) bolo rozpustené v destilovanej vode na objem 250 ml. Pridané bolo príslušné antibiotikum v potrebnej koncentrácii (kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$, tetracyklín 5 $\mu\text{g/ml}$)

Kultivačné médium pre *E. coli*

- LB médium – 10 g trypton, 5 g kvasničný autolyzát, 10 g chlorid sodný

- pH upravené na 7,0 pomocou 1M NaOH. Doplnené destilovanou vodou na objem 1 liter. Pridané antibiotikum v potrebnej koncentrácii (kanamycin 50 µg/ml)

3.1.5 Použité antibiotiká

Názov antibiotika	Skratka antibiotika	Výrobca	Koncentrácia zásobného roztoku (mg/ml)
Ciprofloxacin	Cip	Fluka	25
Chloramfenikol	Cm	Roth	25
Kanamycin	Kan	Fluka	50
Oxacilin	Oxa	Bristol – Myers Squibb	50
Tetracyklín	Tet	Fluka	10
Vankomycin	Van	MP Biomedicals	50

Zásobné roztoky antibiotík boli uchovávané v – 20 °C.

3.1.6 Enzýmy

Enzým	Výrobca
BsaI – HF RE	New England BioLabs
Lyzostafín	Sigma
Proteináza K	ThermoFisher Scientific
Reverzná transkriptáza (Luna® Reverse Transcriptase)	New England BioLabs
RNáza A	ThermoFisher Scientific
One Taq DNA polymeráza	New England BioLabs
T4 DNA ligáza	ThermoFisher Scientific
T4 polynukleotid kináza	ThermoFisher Scientific
XbaI RE	ThermoFisher Scientific
XhoI RE	ThermoFisher Scientific

3.1.7 Chemikálie

Chemikálie	Výrobca
Agaróza – Top Vision Agarose	ThermoFisher Scientific
CaCl ₂	Sigma
CCCP (karbonyl kyanid m – chlorofenylhydrazon)	Sigma
CTC (5-kyano-2,3-ditolyltetrazóniumchlorid)	Sigma
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid)	Roth

DiOC ₂ (3) (3,3'-dietyloxakarbocyaniniodid)	ThermoFisher Scientific
DEPC – H ₂ O	Roth
DMSO	Merck
DNA loading dye	Fermentas
dNTP mix (10 mM)	Fermentas
EDTA	Lachema
Ethanol	Lachema
Ethidium Bromid	Sigma
Gene Ruler, DNA Ladder Mix	Fermentas
Glukóza	Merck
Glycerol	Sigma
Inhibítor RNáz (RiboLock)	ThermoFisher Scientific
Isopropanol	Lachema
Kyselina octová	Lachema
MgSO ₄	Penta
NaCl	Roth
NaOH	BDH
Octan sodný	Lachema
PBS (phosphate buffered saline)	ThermoFisher Scientific
Random hexamer primer	ThermoFisher Scientific
Sacharóza	Penta
SDS (dodecylsírán sodný)	Sigma
S.O.C médium	ThermoFisher Scientific
TO – PRO – 3 (TO – PRO – 3 iodid)	ThermoFisher Scientific
TRI Reagent®	Molecular Research Center, Inc.
Tris HCl	Sigma

3.1.8 Roztoky

Roztok pre krivky hynutia:

- 2 M NaCl – 116,88 g NaCl rozpustiť v 1 l vody, sterilizovať

Roztoky pre prietokovú cytometriu:

- 1x PBS – 5 ml 10x PBS (roztok bol komerčne dodaný k fluorescenčnej próbe TO – PRO – 3 od firmy Molecular Probes) + 45 ml destilovanej vody, filtrované cez 0,2 µm PVDF filter

- Pracovný roztok DiOC₂(3) – 10 µl DiOC₂(3) (zásobný roztok 3 mM) + 190 µl DMSO
- Pracovný roztok TO– PRO – 3 – 1 µl TO – PRO – 3 (zásobný roztok 1 mM) + 1000 µl DMSO
- Pracovný roztok CTC – 10 mg CTC sa rozpustilo v 700 µl destilovanej vody
- Pracovný roztok DAPI – 10 µl DAPI + 90 µl destilovanej vody

Roztoky pre izoláciu plazmidu *E. coli*:

- Roztok 1 – 50 mM glukóza, 10 mM EDTA, 10 mM Tris
- Roztok 2 – 1 M NaOH, 5% SDS, destilovaná voda, pripravované vždy čerstvé
- Roztok 3 – 2 M octan sodný
- Zásobný roztok RNázy A (10 mg/ml)

Roztok pre izoláciu plazmidu *S. aureus*:

- TSM pufoer – 1 ml 0,5 M Tris HCl, 50 µl 2 M MgSO₄, 1,71 g sacharózy, 10 ml destilovanej vody
- Zásobný roztok lyzostafínu (2 mg/ml)

Roztok na prípravu kompetentných buniek *S. aureus*:

- 0,5 M sacharóza – 25,68 g sacharózy rozpustiť v 150 ml destilovanej vody, sterilizované filtráciou 0,2 µm PVDF filtrom

Roztoky pre horizontálnu gélovú elektroforézu:

- 50x TAE pufoer – 36,3 g Tris, 8,57 ml ľadovej kyseliny octovej, 126 ml destilovanej vody, 15 ml 0,5 M EDTA
- 1x TAE pufoer – 20 ml 50x TAE nariediť do 1 l destilovanej vody
- Zásobný roztok ethidium bromidu (1 % roztok vo vode)

Roztok pre transdukciu:

- TopAgar obohatený citrátom – 30 g citronanu draselného, 7 g agaru, TSB médium na 1l média

3.1.9 Primery

3.1.9.1 Primery pre klonovanie

Primer (delécia génu <i>agrA</i>)	Sekvencia	T _m
agrAUPF2	ATT ATC CAA GGT <u>CTA GAG</u> AAA TAC CCG ATG AAG TAA G	67,2 °C
agrAUPR	GTT AAC TGA CTT TAT TAT CTT A ACA TTC ACA TCC TTA TGG CT	66,5 °C
agrADNF	AGC CAT AAG GAT GTG AAT GT TAA GAT AAT AAA GTC AGT TAA CGG C	69,4 °C
agrADNR2	GTA TAT TTT TCT GA <u>CTC GAG</u> ATT TTA GCG TTT AGC AAT CG	67,4 °C
agrAspacerF	GAA ATG TCT ACAA AGT TGC AGC GA	59,3 °C
agrAspacerR	AAA CTC GCT GCA ACT TTG TAG ACA	59,3 °C

Podčiarknutá je časť so sekvenciou pre RE XbaI (TCTAGAG) a XhoI (CTCGAG).

3.1.9.2 Primery pre kvantitatívnu PCR

Primer	Sekvencia	T _m
GyrB	F: ACT GAT GCC GAT GTG GA	52,0 °C
	R: AAC GGT GGC TGT GCA ATA	54,0 °C
SigB	F: GGT TAG TTC ATC GCT CAC TT	53,4 °C
	R: CTG TAA TCG GTG AAA TCA AAA G	54,7 °C
MazEF	F: CTA ATT TTT CTG GTG AGC TAC	54,0 °C
	R: CGA TGA TAA AAT GAA AGA AGT A	50,9 °C
AgrA	F: GCG AAG ACG ATC CAA AAC	53,7 °C
	R: CTT GCT CAA GCA CCT CA	52,8 °C
RNAIII	F: TTC ACT GTG TCG ATA ATC CA	53,2 °C
	R: TGA TTT CAA TGG CAC AAG AT	51,1 °C

3.1.9.3 Primer pre sekvenovanie plazmidu pCasSa

Primer	Sekvencia	T _m
pCasinzertR	AAGATACAGGTATATTTTTCTG	50,9 °C
pCasspacerF	GCAAAATATACAGGGGATTAT	52,0 °C

Všetky uvedené primery od komerčného výrobcu (Eurofinsgenomics) som nariadila množstvom vody uvedenom v príbalovej informácii. Primery použité na sekvenovanie som ešte 20x nariadila na zásobný roztok, ktorý som potom používala v reakciách.

3.1.10 Komerčné súpravy

Kit	Výrobca	Využitie
MagJet Genomic DNA Kit	ThermoFisher Scientific	Izolácia chromozomálnej DNA
Premix One Taq Hot Start	New England BioLabs	PCR
Plasmid DNA Purification (NucleoSpin® Plasmid)	Macherey - Nagel	Izolácia plazmidu
GeneJet Gel Extraction Kit	ThermoFisher Scientific	Extrakcia DNA z gélu
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher Scientific	Izolácia plazmidu
GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit	ThermoFisher Scientific	Prečistenie DNA od enzymatických reakcií a purifikácia PCR produktov
TRI REAGENT® BD	Molecular Research Center	Izolácia RNA
LunaScript® RT SuperMix Kit	New England BioLabs	Prevod RNA na cDNA
Luna® Universal qPCR Master Mix	New England BioLabs	Kvantitatívna PCR

3.1.11. Prístroje a laboratórne vybavenie

Prístroj	Výrobca
Termostat	Memmert
Vzdušná trepačka	N – Biotek, NB 205
DNA/RNA UV Cleaner Box	Boeco Germany
Centrifúgy	
Micro 20	Hettich
Micro 22 R	Hettich
Centra CL3R	IEC
Minispin	Eppendorf
Routina 3800	Hettich
Centrifuge 5430	Eppendorf
Spektrofotometer Helios γ	ThermoFisher Scientific (Thermo Electron Corporation)
NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spektrofotometer	ThermoFisher Scientific
PCR thermocyklér	VWR Doppio
Real – time PCR cycler	Light Cyler 480 Roche
Prietokový cytometer	BC Cytoflex
UV lampa	Vilber Lourmat
Elektroporátor Gene Pulser	BIO – RAD

Zariadenie na elektroforézu (Power Pac 3000)	BIO – RAD
Magnetický stojan	Dynal Biotech
Fotoaparát	Olympus SP – 565UZ
Mikrovlnná rúra	LG
Hlboko mraziaci box (deep freeze)	Schoeller

3.1.12 Programy a internetové odkazy

Cytextpert – program na vyhodnocovanie výsledkov z prietokovej cytometrie

FlowJo – program na vyhodnocovanie výsledkov z prietokovej cytometrie

Chromas, SnapGene – program na vyhodnocovanie výsledkov zo sekvenovania

Light Cycler 480 Software – program na vyhodnocovanie výsledkov z kvantitatívneho PCR

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi> – program na navrhovanie primerov

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> – analýza sekvencií

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> – jednoduchý nástroj na prevod forward
– reverse primerov

<https://biorender.com> – program pre vytvorenie obrázkov

3.2 Metódy

3.2.1 Práca s bakteriálnou kultúrou

S kultúrou som pracovala sterilne, pri naočkovaní čerstvého média som pracovala v UV boxu. *S. aureus* patrí do bezpečnostnej triedy (Biosafety level) 2, je treba s ním preto pracovať opatrne a dodržiavať hygienické pravidlá. Hustotu bakteriálnej populácie (OD) som merala na spektrofotometru Helios γ pri 600 nm.

3.2.2 Príprava konzerv pre dlhodobé uchovávanie kmeňov

Pre dlhodobé skladovanie som bakteriálne kmene uchovávala v 20% glycerolu (v/v) v hlboko mraziacom boxe pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prechodne môžu byť uchovávané na pevných agarových médiách pri teplote $2 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pre prípravu konzerv pre uchovávanie kmeňov som do označenej mikroskúmavky napipetovala 0,250 ml média (pre *S. aureus* BHI médium, pre *E. coli* LB médium) do ktorého som pomocou kľučky resuspendovala biomasu z agarovej misky príslušného bakteriálneho klonu, prípadne som použila už narastenú kultúru v tekutom médiu. Potom som do mikroskúmavky pridala 0,250 ml 40% (v/v) glycerolu a nechala som chvíľu inkubovať pri laboratórnej teplote. Takto pripravenú kultúru som uchovávala v hlboko mraziacom boxe v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Kultivácia bakteriálnej kultúry na pevnom médiu

Pre kultiváciu baktérií na pevnom médiu na Petriho miskách som použila kultivačný agar pre daný bakteriálny kmeň spevnený 2 % agarom. Pre oživenie kultúry z konzervy som bakteriálnu kultúru naniesla a rozotrela na pevnom médiu pomocou sterilného špáradla. Všetky očkovania som uskutočňovala v UV boxu. Petriho misky som následne umiestnila do termostatu a nechala kultivovať pri $34\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 Kultivácia bakteriálnej kultúry v tekutom médiu

Pre kultiváciu baktérií v tekutom médiu som použila BHI médium alebo iné kultivačné médium vhodné pre daný bakteriálny kmeň. Zaočkovanie som uskutočnila pomocou sterilnej bakteriálnej kľučky, ktorou som nabrala veľmi malé množstvo bakteriálnej kultúry z pevného média a preniesla ho do tekutého média. Aby sa práca uskutočňovala sterilne, všetky zaočkovania som uskutočňovala v UV boxu. Kultivácia zaočkovaných bakteriálnych kultúr prebiehala vo vzdušnej trepačke cez noc pri $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri 180 RPM.

3.2.5 Krivka hynutia s antibiotikami

- 1) Najprv som z hlboko mraziaceho boxu vybrala požadovaný klinický izolát a sterilným špáradlom z nej odobrala časť, ktorú som rozotrela na agarovej platne a nechala kultivovať v termostate pri 34 °C cez noc (viď kapitola 3.2.3).
- 2) Z tejto misky som pripravila tekutú kultúru odpovedajúceho izolátu a kultivovala cez noc na vzdušnej trepačke (ON kultúra) (viď kapitola 3.2.4).
- 3) Do štyroch baniek som sterilne naliala 10 ml čerstvého BHI média a nechala vytemperovať na 34 °C.
- 4) Zmerala som OD₆₀₀ nočnej kultúry, a spočítala som odpovedajúce množstvo kultúry k naočkovaniu do 10 ml čerstvého BHI média na počiatočné OD₆₀₀ = 0,05 a s týmto množstvom nočnej kultúry som zaočkovala štyri 100 ml pripravené banky s 10 ml BHI média vytemperovaným na 34 °C (kontrola a tri vybrané antibiotiká).
- 5) V niektorých prípadoch bol zo zbytku nočnej kultúry pripravený a použitý supernatant.
- 6) Takto naočkované kultúry som nechala rásť až do OD₆₀₀ = 0,5 (34°C, 180 RPM) 1 – 2 hodín podľa daného izolátu.
- 7) Po dosiahnutí OD₆₀₀ približne 0,5 som odobrala z kontrolnej kultúry 100 µl do mikroskúmavky pre stanovenie krivky hynutia a 200 µl pre stanovenie parametrov kultúry na prietokovej cytometrii. Tieto vzorky som ďalej spracovala podľa kapitoly 3.2.6.
- 8) K zostávajúcim kultúram som pridala jednotlivé antibiotiká – podľa MIC a koncentrácie zásobných roztokov som vypočítala množstvo antibiotika, ktoré bolo potrebné pridať, tak aby jeho celková koncentrácia odpovedala 100x MIC.
- 9) Ďalej som odoberala v hodinových intervaloch vzorky na stanovenie CFU a stanovenie OD₆₀₀ nasledujúcim spôsobom:
 - a) Pre stanovenie OD som odobrala 200 µl kultúry do kyvety, pridala som 1800 µl 2 M NaCl (poprípade dH₂O) a zmerala som OD₆₀₀ kultúry.
 - b) Pre stanovenie CFU som odobrala 100 µl kultúry do mikroskúmavky a pridala som 900 µl 2 M NaCl.
 - c) Mikroskúmavky som scentrifugovala (3200 x g, 5 min., laboratórna teplota).

- d) U scentrifugovaných mikroskúmavkách som odobrala supernatant (900 µl) a pridala som 900 µl 2 M NaCl.
- e) Vytvorila som dekadickú riediacu radu v počte riedení odpovedajúcich OD₆₀₀.
- f) Jednotlivé riedenia som vysiala na pevné BHI médium metódou kvapkového výsevu: 10 µl daného riedenia som napipetovala do matrice na pevné BHI médium.
- g) Pretože baktérie v kvapkových výsevoch občas nevyrastli pristúpila som ku klasickému stanoveniu CFU: 100 µl určitého riedenia som napipetovala na pevné BHI médium a sterilne som rozotrela hokejkou.
- h) Takto pripravené agarové platne som nechala kultivovať v termostate pri 34 °C.
- i) Narastené kolónie na miskách som vyhodnotila po 24 až 48 hodinách kultivácie.

3.2.5.1 Krivka hynutia s antibiotikami a so supernatantom

- 1) Pre prípravu tekutej kultúry vybraného klinického izolátu som postupovala podľa bodov 1 – 4 v kapitole 3.2.5.
- 2) Nočnú kultúru vybraného klinického izolátu som preliala do 15 ml skúmavky a scentrifugovala pri 4000 x g po dobu 10 min. pri laboratórnej teplote. Následne som odobrala supernatant a pomocou membránového filtra s 0,2 µm pórmí som ho prefiltrovala, aby supernatant neobsahoval žiadne bunky.
- 3) Z takto prefiltrovaného supernatantu som odobrala 200 µl a napipetovala na Petriho misku s pevným BHI médium a sterilne rozotrela hokejkou. Takto pripravené Petriho misky som nechala uschnúť pri laboratórnej teplote.
- 4) Následne som vzorky spracovala rovnakým spôsobom ako to bolo uvedené v kapitole 3.2.5 body 6 – 9.

3.2.6 Meranie membránového potenciálu pomocou prietokového cytometra

- 1) Príprava vzoriek pre prietokovú cytometriu prebiehala súčasne so stanovením CFU pre krivky hynutia a uskutočňovala sa paralelne pri rovnakej kultivácii (viď kapitola 3.2.5 body 1 – 7).
- 2) Pre prípravu vzoriek na prietokovú cytometriu som odoberala z každej kultúry 200 µl do mikroskúmaviek v rovnakých intervaloch ako pre krivky hynutia.

- 3) Mikroskúmavky som scentrifugovala (3200 x g, 5 min., laboratórna teplota), odobrala som supernatant a pridala som 200 μ l PBS (1:10 nariadený a prefiltrovaný zásobný roztok PBS) a 4 μ l DiOC₂(3) (1:20 v DMSO nariadený 3 mM roztok DiOC₂(3)) a krátko zvortexovala.
- 4) Inkubovala som vzorky 15 minút v termostate pri 34 °C, po uplynutí času som vzorky premiestnila na ľad v uzavretej nádobe pre ochranu pred svetlom. Každú hodinu som kroky 2 až 4 opakovala po dobu štyroch hodín.
- 5) Krátko pred meraním na prietokovom cytometri som k bunkám pridala 2 μ l TO – PRO – 3 (1:1000 v DMSO nariadený 1 mM roztok TO – PRO – 3) a zvortexovala.
- 6) Vzorky som zmerala na prietokovom cytometri CytoFLEX S (Beckman Coulter, vybavený 4 lasermi a 13 fluorescenčnými detektormi), ktorý je súčasťou servisného pracoviska PrF UK sekcie Biológie:
 - a) DiOC₂(3) som analyzovala na prístroji použitím excitácie pri 488 nm (modrý laser), TO – PRO – 3 som excitovala pri 638 nm (červený laser). Zelenú fluorescenciu DiOC₂(3) som detegovala s použitím bandpass filtru 525/40 nm (APD gain 500), červenú fluorescenciu DiOC₂(3) pri 610/20 nm (APD gain 200) a červenú fluorescenciu TO – PRO – 3 som detegovala pri 660/10 nm (APD gain 376).
 - b) Rýchlosť prietoku vzorky cytometrom bola 11 μ l/min a v každom vzorku bolo zaznamenaných 10 000 udalostí.
 - c) Vzorky som merala pri nasledujúcej kompenzácii:
 - i. Z kanálu Dioc – red som odčítala 8% intenzity Dioc – green, z Dioc – green 5% Dioc – red.
 - d) Pre identifikáciu jednotlivých subpopulácií boli pripravené kontrolné vzorky odobrané pred pridaním antibiotík a spracované rovnakým spôsobom ako ostatné vzorky:
 - i. Pre nerespirujúce bunky som pridala k bunkám pred farbením 2 μ l 500 μ M CCCP.
 - ii. Aby boli bunky permeabilizované zahrievať som ich v termobloku po dobu 10 min pri 90 °C.
 - iii. Posledné boli živé nefarbené bunky, ktoré som vôbec nefarbila ani tepelne neupravovala.

3.2.7 Meranie redoxného potenciálu pomocou prietokového cytometra

- 1) Príprava vzoriek pre prietokovú cytometriu prebiehala súčasne so stanovením CFU pre krivky hynutia a uskutočňovala sa paralelne pri rovnakej kultivácii (viď kapitola 3.2.5 body 1 – 7).
- 2) Pre prípravu vzoriek na prietokovú cytometriu som odoberala z každej kultúry 200 μ l do mikroskúmaviek v časoch t_0 , t_{30} , t_1 , t_2 , t_3 a t_4 .
- 3) Mikroskúmavky som scentrifugovala (3200 x g, 5 min., laboratórna teplota), odoberala som supernatant a pridala som 200 μ l PBS (1:10 nariadený roztok PBS) a 5 μ l CTC (10 mg CTC rozpustené v 700 μ l dH₂O – 50 mM, vo vzorke 1,25 mM CTC) a krátko zvortexovala.
- 4) Umiestnila som vzorky na 30 minút do termostatu, po uplynutí času som vzorky premiestnila na ľad v uzavretej nádobe pre ochranu pred svetlom. Kroky 2 až 4 som opakovala v časových intervaloch t_{30} , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 .
- 5) Krátko pred meraním na prietokovom cytometri som k bunkám pridala 2 μ l DAPI (10 mg/ml zásobný roztok 10x nariadený – vo vzorke 10 μ g/ml DAPI) a zvortexovala.
- 6) Vzorky som zmerala na prietokovom cytometri CytoFLEX S (Beckman Coulter, vybavený 4 lasermi a 13 fluorescenčnými detektormi), ktorý je súčasťou servisného pracoviska PrF UK sekcie Biológie:
 - a) CTC som analyzovala na prístroji použitím excitácie pri 488 nm (modrý laser), DAPI som excitovala pri 356 nm (fialový laser) a zelený fluorescenčný proteín (GFP – green fluorescent protein) som excitovala pri 395 nm (fialový laser). Zelenú fluorescenciu GFP som detegovala s použitím bandpass filtru 525/40 nm (APD gain 500), červenú fluorescenciu CTC pri 610/20 nm (APD gain 200) a modrú fluorescenciu DAPI som detegovala pri 450/45 nm.
 - b) Rýchlosť prietoku vzorky cytometrom bola 11 μ l/min a pri každom meraní bolo zaznamenaných 10 000 udalostí.
 - c) Vzorky som merala pri nasledujúcej kompenzácii:
 - i. Z kanálu Dioc – red som odčítala 6,3 % intenzity Dioc – green, z Dioc – green som odčítala 5 % intenzity Dioc – red.
 - d) Pre identifikáciu jednotlivých subpopulácií boli pripravené kontrolné vzorky odobrané pred pridaním antibiotík a spracované rovnakým spôsobom ako ostatné vzorky:
 - i. Pre nerespirujúce bunky som pridala k bunkám pred farbením 2 μ l 500 μ M CCCP.

- ii. Aby boli bunky permeabilizované pridala som k nim 60 μ l 96% ethanolu.
- iii. Posledné boli živé nefarbené bunky, ktoré som vôbec nefarbila a okrem PBS som k nim nepridávala ďalšie roztoky.

3.2.8 Meranie optickej denzity

K stanoveniu hustoty bakteriálnej populácie v tekutom BHI médiu som používala metódu merania optickej denzity kultúry pomocou spektrofotometru Helios γ . Na meranie som nastavila vlnovú dĺžku svetla 600 nm (OD_{600}). Ako blank som používala dH_2O alebo BHI médium. Objem pre meranie bolo 2 ml. Boli použité jednorazové plastové kvety.

3.2.9 Zber buniek pre izoláciu RNA

- 1) Pri kultivácii buniek som postupovala podľa bodu 1 – 5 ako v návodu pre krivky hynutia (viď kapitola 3.2.5), s tým rozdielom, že som pracovala s dvojnásobným množstvom bakteriálnej kultúry (20 ml BHI média v 200 ml banke).
- 2) Po dosiahnutí $OD_{600} = 0,5$ som pridala ATB v koncentrácii 100x MIC a následne od tohto času v stanovených časových intervaloch som odoberala 2 ml kultúry do mikroskúmaviek s objemom 2 ml.
- 3) Pri každom odbere som mikroskúmavky centrifugovala (3200 x g, 5 min., laboratórna teplota), odobrala som supernatant a pelet som ihneď zmrazila v tekutom dusíku.
- 4) Takto pripravené bunky som uchovávala v hlboko mraziacom boxe pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izolácie RNA.

3.2.10 Práca s bakteriálnou DNA

3.2.10.1 Izolácia plazmidu *E. coli*

- 1) Klasický spôsob izolácie plazmidu
 - a. Jednotlivé narastené kultúry kultivované cez noc (pripravené do cca 3 ml LB média s prídavkom príslušného antibiotika) som prepipetovala (preliala) do mikroskúmaviek a centrifugovala som ich (3200 x g, 10 min., laboratórna teplota).
 - b. Odoberala som supernatant a bunky som resuspendovala v 100 μ l roztoku 1 (viď kapitola 3.1.7).
 - c. Do každej skúmavky som pridala 5 μ l RNázy A.

- d. Ďalej som k bunkám pridala 200 μ l roztoku 2 (vid' kapitola 3.1.7), ktorý som pripravila vždy čerstvý (1 ml 1 M NaOH, 1 ml 5% SDS, 3 ml sterilnej dH₂O), premiešala opatrným prevracaním miskroskúmvky a vložila do ľadu na 5 min.
- e. Nakoniec som pridala 150 μ l roztoku 3 (vid' kapitola 3.1.7), premiešala opatrným prevracaním mikroskúmvky a vložila do ľadu.
- f. Mikroskúmvky som centrifugovala pri 14000 x g, 10 min., 4 °C.
- g. Opatrne som odsala supernatant do novej mikroskúmvky a pridala som 350 μ l isopropanolu (0,7 násobok objemu odobraného supernatantu), dala do mrazničky a nechala stáť 30 min.
- h. Potom som mikroskúmvky opäť centrifugovala pri 14000 x g, 10 min., 4 °C.
- i. Odobrala som supernatant a pridala 250 μ l 75% ethanolu (v/v) a znovu centrifugovala (vid' bod h.).
- j. Izolovaný plazmid som nechala usušiť, aby v ňom neboli zbytky ethanolu, pri laboratórnej teplote po dobu 30 min.
- k. Plazmid som nakoniec rozpustila v deionizovanej vode.

2) Izolácia plazmidu použitím Plasmid DNA Purification (NucleoSpin® Plasmid) kit (Macherey – Nagel)

- a. Jednotlivé narastené kultúry kultivované cez noc (pripravené do 3 ml LB média s príslušným antibiotikom) som prepipetovala (preliala) do mikroskúmviek a centrifugovala pri 3200x g, 5 min., pri laboratórnej teplote.
- b. Odobrala som supernatant a pridala 250 μ l resuspendačného roztoku (Buffer A1) a 2 μ l RNázy A, resuspendovala som pomocou vortexovania.
- c. Potom som pridala 250 μ l lyzačného roztoku (Buffer A2) a obsah skúmvky som premiešala otočením 6 – 8x. Skúmvku som nechala stáť pri laboratórnej teplote po dobu 5 min.
- d. Nakoniec som pridala 350 μ l neutralizačného roztoku (Buffer 3) a skúmvku som opäť premiešala otočením 6 – 8x, kým modré sfarbenie nezmizlo a nezostal bezfarebný obsah skúmvky.
- e. Skúmvku som centrifugovala pri 11000 x g, 5 min., pri laboratórnej teplote.

- f. Supernatant som preniesla do špeciálnej kolónky (NucleoSpin Plasmid Column), ktorá je súčasťou kitu a ktorú som umiestnila do mikroskúmavky.
- g. Kolónku s mikroskúmavkou som centrifugovala pri 11000 x g, 1 min., pri laboratórnej teplote a odstránila som supernatant.
- h. Pridala som 600 µl premývacieho roztoku (Buffer A4) a opäť som kolónku centrifugovala (11000 x g, 1 min., laboratórna teplota). Odstránila som supernatant z mikroskúmavky.
- i. Centrifugovala som prázdnu kolónku s mikroskúmavkou pri 11000 x g, 5 min., pri laboratórnej teplote.
- j. Kolónku som premiestnila do novej sterilnej mikroskúmavky a pridala do nej 50 µl elučného pufru (Buffer AE), nechala som ju stáť 5 min. pri laboratórnej teplote.
- k. Mikroskúmavku s kolónkou som centrifugovala (11000 x g, 1 min., laboratórna teplota), do mikroskúmavky sa uvoľnil vyizolovaný plazmid.

3.2.10.2 Izolácia plazmidu *S. aureus*

- 1) Jednotlivé narastené kultúry kultivované cez noc (pripravené do cca 10 ml TSB média s príslušným antibiotikom) som preliala do 15 ml skúmavky a centrifugovala som pri 4000 x g, 10 min., pri laboratórnej teplote.
- 2) Odstránila som supernatant a bunky som resuspendovala v 300 µl TSM pufru (viď kapitola 3.1.8) s prídavkom 3 µl RNázy A a 2,5% (v/v) pracovným roztokom lyzostafínu o koncentrácii 2 mg/ml. Resuspendované bunky som preniesla do 2 ml mikroskúmaviek.
- 3) Bunky som inkubovala 15 min. pri 37 °C.
- 4) Ďalej som k bunkám pridala 600 µl roztoku 2 (viď kapitola 3.1.7), ktorý som pripravila čerstvý (1 ml 1 M NaOH, 1 ml 5% SDS, 3 ml sterilnej dH₂O), premiešala opatrným prevracaním skúmavky a vložila do ľadu na 5 min.
- 5) Nakoniec som pridala 450 µl roztoku 3 (viď kapitola 3.1.7), premiešala opatrným prevracaním skúmavky a vložila do ľadu na 5 min.
- 6) Skúmavky som centrifugovala pri 14000 x g, 10 min., 4 °C.

- 7) Opatrne som odsala supernatant do nových mikroskúmaviek a pridala som 750 μ l isopropanolu (0,7 násobok objemu odobraného supernatantu) a dala do mrazničky a nechala stáť 30 min.
- 8) Potom som mikroskúmavky opäť centrifugovala pri 14000 x g, 10 min., 4 °C.
- 9) Odobrala som supernatant a pridala 350 μ l 75% ethanolu (v/v) a znovu centrifugovala (viď bod 8).
- 10) Izolovaný plazmid som nechala usušiť, aby v ňom neboli zvyšky ethanolu, pri laboratórnej teplote po dobu 30 min.
- 11) Plazmid som nakoniec rozpustila v deionizovanej vode.

3.2.10.3 Izolácia chromozómovej DNA *S. aureus* pomocou MagJet Genomic DNA kit (ThermoFisher Scientific)

- 1) Jednotlivé narastené kultúry kultivované cez noc (pripravené do cca 3 ml BHI média) som prepipetovala (preliala) do mikroskúmaviek a centrifugovala som ich pri 3200 x g, 10 min. pri laboratórnej teplote.
- 2) Odobrala som supernatant a bunky som resuspendovala v 40 μ l TSM pufru (viď kapitola 3.1.7) s prídavkom 2,5% (v/v) pracovným roztokom lyzostafínu o koncentrácii 2 mg/ml, a resuspendovala pomocou vortexu. Mikroskúmavky som následne nechala inkubovať pri 37 °C po dobu 15 min.
- 3) Po inkubácii som pridala 200 μ l Digestion Solution a 20 μ l proteínázy K a obsah skúmavky som premiešala vortexovaním. Následne som skúmavky dala inkubovať pri 56 °C na dobu 30 min.
- 4) Po inkubácii som pridala 20 μ l RNázy A, obsah skúmavky som premiešala vortexovaním a nechala stáť pri laboratórnej teplote po dobu 10 min.
- 5) Následne som pridala 300 μ l lyzačného pufru (Lysis Buffer), obsah skúmavky som premiešala vortexovaním a lyzát som preniesla do mikroskúmavky, ktorá obsahovala 400 μ l isopropanolu a 25 μ l magnetických guľôčok, všetko som dôkladne premiešala pomocou vortexovania.
- 6) Mikroskúmavky som umiestnila do magnetického stojanu a počkala cca 3 min., kým magnet pritiahol magnetické guľôčky s adsorbovanou chromozómovou DNA a následne som odstránila supernatant.

- 7) Vybrala som z magnetického stojanu mikroskúmavky a pridala som 800 μ l premývacieho pufru 1 (Wash Buffer 1), obsah skúmaviek som premiešala vortexovaním a mikroskúmavky som vrátila do magnetického stojanu a počkala som cca 3 min a potom som odstránila supernatant.
- 8) Vybrala som z magnetického stojanu mikroskúmavky a pridala som 800 μ l premývacieho pufru 2 (Wash Buffer 2), obsah skúmaviek som premiešala vortexovaním a mikroskúmavky som vrátila do magnetického stojanu a počkala som cca 3 min. a potom som odstránila supernatant.
- 9) Predchádzajúci krok som zopakovala ešte raz.
- 10) Vybrala som mikroskúmavky z magnetického stojanu a pridala som 150 μ l elučného pufru (Elution Buffer), obsah skúmavky som zvortexovala a inkubovala pri 72 °C po dobu 5 min. Po inkubácii som vrátila mikroskúmavky do magnetického stojanu a počkala cca 3 min.
- 11) Supernatant obsahujúci vyizolovanú chromozomálnu DNA som prepipetovala do čistých sterilných mikroskúmaviek.

3.2.10.4 Vytvorenie fragmentu (inzertu) pre deléciu génu *agrA*

- 1) Pre vytvorenie fragmentu pre deléciu génu *agrA* som použila primery, ktoré majú navzájom sa prekrývajúce oblasti (viď kapitola 3.1.8.1).
- 2) Pre vytvorenie upstream časti fragmentu som do 0,2 ml mikroskúmavky napipetovala:
 - Pufor pre One Taq DNA polymerázu (5x konc.) 10 μ l
 - dNTP mix (10 mM) 1 μ l
 - *agrAUPF2* (forward primer, 10 μ M) 1 μ l
 - *agrAUPR* (reverse primer, 10 μ M) 1 μ l
 - Templát (chromozomálna DNA) v množstve 1 ng – 1 μ l
 - One Taq DNA polymerázu 0,25 μ l
 - Deionizovanú vodu doplnenú na celkový objem 50 μ l
- 3) Skúmavku som krátko centrifugovala (short spin), dala do termocykléra a nastavila som daný program:

Krok PCR	Teplota	Čas	
Úvodná denaturácia	95 °C	3 min.	
Denaturácia	95°C	30 s	Opakovanie 15x (pre nasadnutie nástavcov)
Nasadnutie primerov	53 °C	30 s	
Elongácia	68 °C	1 min.	
Denaturácia	95 °C	30 s	Opakovanie 35x
Nasadnutie primerov	62 °C	30 s	
Elongácia	68 °C	1 min.	
Konečná elongácia	68 °C	5 min.	
Chladenie vzoriek	4 °C	∞	

4) Pre vytvorenie downstream časti fragmentu som do 0,2 ml mikroskúmavky napipetovala:

- Pufor pre One Taq DNA polymerázu (5x konc.) 10 µl
- dNTP mix (10 mM) 1 µl
- agrADNF (forward primer, 10 µM) 1 µl
- agrADNR2 (reverse primer, 10 µM) 1 µl
- Templát (chromozomálna DNA) v množstve 1 ng – 1 µl
- One Taq DNA polymerázu 0,25 µl
- Deionizovanú vodu doplnenú na celkový objem 50 µl

5) Skúmavku som krátko centrifugovala (short spin), dala do termocykléra a nastavila som daný program:

Krok PCR	Teplota	Čas	
Úvodná denaturácia	95 °C	3 min.	
Denaturácia	95°C	30 s	Opakovanie 15x (pre nasadnutie nástavcov)
Nasadnutie primerov	53 °C	30 s	
Elongácia	68 °C	1 min.	
Denaturácia	95 °C	30 s	Opakovanie 35x
Nasadnutie primerov	62 °C	30 s	
Elongácia	68 °C	1 min.	
Konečná elongácia	68 °C	5 min.	
Chladenie vzoriek	4 °C	∞	

6) Pre vytvorenie celkového fragmentu som do 0,2 ml mikroskúmavky napipetovala:

- Pufor pre One Taq DNA polymerázu (5x konc.) 10 μ l
- dNTP mix (10 mM) 1 μ l
- Templát (upstream a downstream časť fragmentu) v množstve 1 ng – 1 μ l
- One Taq DNA polymerázu 0,25 μ l
- Deionizovanú vodu doplnenú na celkový objem 50 μ l

7) Skúmavku som krátko centrifugovala (short spin), dala do termocykléra a nastavila som daný program:

Krok PCR	Teplota	Čas	
Úvodná denaturácia	95 °C	3 min.	
Denaturácia	95 °C	30 s	Opakovanie 15x
Nasadnutie primerov	62 °C	30 s	
Elongácia	68 °C	1 min.	
Konečná elongácia	68 °C	5 min.	
Chladienie vzoriek	4 °C		

8) Následne som k reakcii pridala primery,

- agrAUPF2 (forward primer, 10 μ M) 1 μ l
- agrADNR2 (reverse primer, 10 μ M) 1 μ l

a pokračovala som v reakcii s rovnakým protokolom ďalších 30 cyklov.

9) Po úspešnom vytvorení celkového fragmentu pre deléciu génu *agrA* som vzniknutý PCR produkt purifikovala pomocou kitu GeneJet Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (viď kapitola 3.2.10.7).

3.2.10.5 Vnesenie spaceru do plazmidu pCasSA

3.2.10.5.1 Fosforylácia primerov a príprava spaceru

1) Primery agrAspacerF a agrAspacerR (viď kapitola 3.1.8.1) bolo potrebné najprv nafosforylovať. Fosforylačnú reakciu som namiešala v 0,5 ml mikroskúmavke s nasledujúcimi komponentmi:

- Forward primer (50 μ M) 15 μ l
- Reverse primer (50 μ M) 15 μ l
- T4 DNA ligáza pufor (10x konc.) 5 μ l
- T4 polynukleotid kináza 1 μ l
- Deionizovaná voda 14 μ l
- Celkový objem reakcie 50 μ l

- 2) Mikroskúmavku som krátko centrifugovala (short spin) a inkubovala pri 37 °C po dobu 1 hodiny.
- 3) K nafosforylovaným primerom som pridala 1,25 μ l 2 M NaCl a inkubovala 3 min. pri 95 °C v termobloku. Následne som vybrala blok s mikroskúmavkou a nechala som ju schladieť pri laboratórnej teplote po dobu 2 hodín.
- 4) Takto pripravené nafosforylované a spojené (hybridizované) primery som ešte 20x nariedila pomocou deionizovanej vody.

3.2.10.5.2 Golden gate ligácia spaceru

- 1) Pre spojenie nafosforylovaného spaceru a plazmidu pCasSA som použila Golden gate ligáciu. Do malej mikroskúmavky (0,2 ml) som napipetovala:

- Plazmid pCasSA (20 fmol) 1 μ l
- Nafosforylovaný spacer (20x nariedený) 4 μ l
- Pufor pre T4 DNA ligázu (10x konc.) 1 μ l
- T4 DNA ligáza 0,5 μ l
- RE BsaI 0,5 μ l
- Polyetylén glykol 1 μ l
- Deionizovaná voda 2 μ l
- Celkový objem reakcie 10 μ l

- 1) Mikroskúmavku som krátko centrifugovala (short spin) a vložila do termocykléra na nasledujúci program:

Krok ligácie	Teplota	Čas	
Zahrievanie	37 °C	2 min.	Opakovanie 45x
Zahrievanie	16 °C	5 min.	
Zahrievanie	65 °C	10 min.	Deaktivácia ligázy
Zahrievanie	80 °C	20 min.	Deaktivácia RE
Chladenie	10 °C	∞	

- 2) Ligačnú reakciu som natransformovala do kompetentných buniek *E. coli* DH5 α (viď kapitola 3.2.10.14) a transformačnú zmes som vysiala na LB médium s ATB (50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu). Z narastených klonov som vyizolovala plazmid (viď kapitola 3.2.10.1).
- 3) Úspešnosť ligácie som overila pomocou PCR reakcie a sekvenovania.

3.2.10.6 Štiepenie plazmidu pCasSA + spacer a inzertu pomocou restriktčných enzýmov

I. Štiepenie plazmidu pCasSA + spacer

- 1) Pre štiepenie plazmidu som do 1,5 ml mikroskúmavky napipetovala:
 - Pufor pre RE XbaI (Tango Buffer 10x konc.) 5 μl
 - Plazmid v množstve 1 μg
 - RE XbaI 2 μl
 - Deionizovanú vodu doplnenú na celkový objem 50 μl
- 2) Mikroskúmavku som krátko centrifugovala (short spin) a nechala inkubovať pri 37 °C po dobu 2 hodín.
- 3) Po uplynutí 2 hodín som do reakcie pridala 5 μl 10x konc. Tango Buffer a 2 μl RE XhoI a inkubovala som ďalej pri 37 °C po dobu ďalších 2 hodín.
- 4) Naštiepený plazmid som purifikovala pomocou kitu GeneJet Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (viď kapitola 3.2.10.7) a správnosť štiepenia som overila pomocou horizontálnej agarózovej elektroforézy.

II. Štiepenie inzertu

- 1) Pre štiepenie inzertu som do 1,5 ml mikroskúmavky napipetovala:
 - Pufor pre RE XbaI (Tango Buffer 10x konc.) 2 μl
 - Inzert v množstve 300 ng
 - RE XbaI 1 μl
 - Deionizovanú vodu doplnenú na celkový objem 20 μl
- 2) Mikroskúmavku som krátko centrifugovala (short spin) a nechala inkubovať pri 37 °C po dobu 1 hodiny.
- 3) Po uplynutí 1 hodiny som do reakcie pridala 2 μl 10x konc. Tango Buffer a 1 μl RE XhoI a inkubovala som ďalej pri 37 °C po dobu ďalších 2 hodín.

- 4) Naštiepený inzert som purifikovala pomocou kitu GeneJet Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (viď kapitola 3.2.10.7).

3.2.10.7 Prečistenie naštiepených PCR produktov a naštiepeného plazmidu

Naštiepený fragment pre deléciu génu *agrA* a naštiepený plazmid som prečistila pomocou kitu GeneJet Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (ThermoFisher Scientific). Postupovala som podľa priloženého návodu.

- 1) Objem PCR produktu ako aj naštiepeného plazmidu som upravila na 200 μ l pomocou deionizovanej vody.
- 2) Pridala som k nim 100 μ l Binding Buffer a dôkladne premiešala pomocou pipety.
- 3) Následne som k nim pridala 300 μ l 96% ethanolu a premiešala pomocou pipety.
- 4) Obsah skúmaviek som preniesla do špeciálnej kolónky (DNA Purification Micro Column), ktorá je súčasťou kitu a ktorú som umiestnila do mikroskúmavky.
- 5) Kolónku s mikroskúmavkou som centrifugovala pri 14000 x g, 2 min., pri laboratórnej teplote a odstránila som supernatant.
- 6) K PCR produktu som pridala 200 μ l Prewash Buffer a opäť som kolónku centrifugovala (14000 x g, 2 min., laboratórna teplota). Odstránila som supernatant z mikroskúmavky. Tento krok sa vynecháva pri purifikácii plazmidu.
- 7) Následne som pridala k PCR produktu aj k plazmidu 700 μ l premývacieho pufru (Wash Buffer) a centrifugovala kolónku (14000 x g, 2 min., laboratórna teplota).
- 8) Opakovala som bod 7.
- 9) Centrifugovala som prázdnu kolónku s mikroskúmavkou pri 14000 x g, 5 min., pri laboratórnej teplote.
- 10) Kolónku som premiestnila do novej sterilnej mikroskúmavky a pridala do nej 15 μ l elučného pufru (Elution Buffer) pre plazmid a 10 μ l elučného pufru pre PCR produkt, nechala som ju stáť 5 min. pri laboratórnej teplote.
- 11) Mikroskúmavku s kolónkou som centrifugovala (14000 x g, 2 min., laboratórna teplota), do mikroskúmavky sa uvoľnil purifikovaný plazmid a PCR produkt (fragment pre deléciu *agrA* génu).

3.2.10.8 Ligácia restriktčného fragmentu do plazmidu pCasSA + spacer

1) Do 0,2 ml mikroskúmavky som napipetovala:

- Naštiepený plazmid v množstve 400 ng
- Naštiepený fragment v množstve 20 ng
- Pufor pre T4 DNA ligázu (10x konc.) 2 μ l
- T4 DNA ligázu 3 μ l
- Deionizovanú vodu doplnenú na celkový objem 20 μ l

2) Mikroskúmavku som krátko centrifugovala (short spin) a vložila do termocykléra na nasledujúci program:

Krok ligácie	Teplota	Čas	Opakovanie 20x
Zahrievanie	16 °C	50 min.	
Zahrievanie	20 °C	3 min.	
Zahrievanie	24 °C	5 min.	
Zahrievanie	37 °C	1 min.	
Chladenie	4 °C	∞	

3) Po skončení ligačného programu som deaktivovala T4 DNA ligázu pri 65 °C po dobu 10 min.

4) Ligačnú reakciu som natransformovala do kompetentných buniek *E. coli* DH5 α (viď kapitola 3.2.10.14) a transformačnú zmes som vysiala na LB médium s ATB (50 μ g/ml kanamycinu). Z narastených klonov som vyizolovala plazmid (viď kapitola 3.2.10.1).

5) Úspešnosť ligácie som overila pomocou PCR reakcie a sekvenovania.

3.2.10.9 Horizontálna agarózová elektroforéza

Príprava 1% (w/v) gélu pre elektroforézu:

- 1) Do 70 ml (50 ml) 1x TAE som pridala 0,7 g (0,5 g) agarózy a zamiešala v banke.
- 2) Gél som povarila v mikrovlnnej rúre, až kým sa agaróza v banke úplne nerozpustila.
- 3) Chvíľu som nechala zmes vychladnúť a behom toho som do banky pridala 2,5 μ l ethidium bromidu.
- 4) Banku som zamiešala a jej obsah som vyliala do formičky na gél.

- 5) Do vybraného miesta som umiestnila hrebienok a gél nechala stuhnúť.
- 6) Tuhý gél som premiestnila do vaničky na horizontálnu elektroforézu s TAE pufrom.
- 7) Pripravila som si vzorky na elektroforézu:
 - a. V jamkách mikrotitračnej doštičky som zmiešala 2 μl markeru (GeneRuler DNA Ladder Mix) a 3 μl DNA loading dye.
 - b. Pre vlastné vzorky som zmiešala 3 – 5 μl DNA a 3 μl DNA loading dye.
 - c. Všetky vzorky som napipetovala do jamiek v gélu.
 - d. Pre separáciu molekúl v gélu som použila jednosmerné napätie o veľkosti 4 V/cm^2 .

3.2.10.10 Izolácia fragmentu z horizontálnej agarózovej elektroforézy

Izolácia fragmentu z horizontálnej agarózovej elektroforézy som uskutočnila pomocou kitu GeneJet Gel Extraction Kit. Postupovala som podľa priloženého návodu.

- 1) Gél obsahujúci požadovaný fragment som pomocou čistého skalpela vyrezala čo najbližšie k fragmentu a umiestnila som ho do predom zvaženej mikroskúmavky.
- 2) Určila som hmotnosť vyrezaného gélu a pridala som rovnaké množstvo objemu (1:1 – objem : hmotnosť) väzbového pufru (Binding Buffer).
- 3) Nechala som gélovú zmes inkubovať pri 60 °C po dobu 10 min. a párkrát som zmes premiešala, kým sa gél úplne nerozpustil.
- 4) Keď bol daný fragment menší ako 500 bp pridala som k rozpustenému gélu isopropanol (rovnaké množstvo v akom bol gélový rez rozpustený).
- 5) Preniesla som 800 μl rozpusteného gélu do priloženej kolónky (GeneJet purifikačná kolónka). Kolónku som umiestnila do mikroskúmavky a centrifugovala som (12000 x g, 5 min., laboratórna teplota).
- 6) Pridala som 700 μl premývacieho pufru (Wash Buffer), centrifugovala (12000 x g, 3 min., laboratórna teplota) a odstránila som supernatant.
- 7) Ešte raz som centrifugovala prázdnu kolónku s mikroskúmavkou po dobu 5 min. (viď bod 6).

- 8) Kolónku som preniesla do novej mikroskúmavky a pridala som do kolónky 25 μ l elučného pufru (Elution Buffer), nechala som ju stáť pri laboratórnej teplote po dobu 5 min. a následne som centrifugovala (12000 x g, 2 min., laboratórna teplota).
- 9) Do mikroskúmavky sa mi pri centrifugácii uvoľnil požadovaný DNA fragment.

3.2.10.11 Sekvenácia DNA

Sekvenovanie prebehlo na servisnom pracovisku biologickej sekcie PrF UK v laboratóriu sekvenovania. Pre sekvenovanie bol pridaný špecifický primer navrhnutý na tieto účely (viď kapitola 3.1.9). Vzorka bola pripravená podľa návodu laboratória.

3.2.10.12 Príprava kompetentných buniek *E. coli*

- 1) Do 25 ml LB média som pridala 250 μ l 20% glukózy (w/v) a 125 μ l 2 M $MgSO_4$ (výsledná koncentrácia $MgSO_4$ v LB médiu je 10 mM a glukózy 0,2%).
- 2) Do pripraveného média z bodu 1 som naočkovala 0,25 ml kultúry kultivovanej cez noc (viď kapitolu 3.2.4).
- 3) Kultúru som nechala rásť pri trepaní (180 RPM, 37 °C) do OD_{600} v rozmedzí 0,3 – 0,4.
- 4) Potom som bunky preliala do predchladenej centrifugačnej kyvety a schladila na ľade po dobu 20 min.
- 5) Následne som bunky centrifugovala (3200 x g, 10 min., 4 °C) a odsala supernatant.
- 6) Potom som bunky resuspendovala v 0,25 ml LB s prídavkom glukózy a $MgSO_4$ (viď bod 1).
- 7) K takto resuspendovaným bunkám som pridala 2,5 ml uchovacieho média (36% glycerín, 12% PEG 8000, 12 mM $MgSO_4$ v LB médiu, pH 7, sterilizovaný filtráciou).
- 8) Objem v centrifugačnej kyvete som rozdelila po 200 μ l do popísaných a predchladených mikroskúmviek a uchovávala v hlboko mraziacom boxe pri teplote – 80 °C.

3.2.10.13 Príprava kompetentných buniek *S. aureus*

Pre prípravu kompetentných buniek *S. aureus* som použila postup uvedený v metódach pre genetickú manipuláciu *S. aureus* (Schneewind a Missiakas 2014).

- 1) Pripravila som kultúru kultivovanú cez noc (viď kapitolu 3.2.4) z kmeňov, ktoré som následne použila pri elektroporácii.
- 2) Túto kultúru som zriedila 1:100 do 25 ml vytemperovaného TSB média.

- 3) Nechala som kultivovať do OD₆₀₀ približne 0,5 (34 °C, 180 RPM).
- 4) Kultúru som potom zliala do centrifugačnej kyvety a centrifigovala (5000 x g, 15 min., 4 °C).
- 5) Odstránila som supernatant a pelet som resuspendovala v 10 ml vychladenej sterilnej 0,5 M sacharózy (pripravené v deionizovanej vode).
- 6) Centrifigovala som pri 8000 x g, 10 min., pri 4 °C.
- 7) Od tohto bodu som pracovala s bunkami na ľade.
- 8) Odstránila som supernatant a potom som rozpustila bunkový pelet v 5 ml vychladenej 0,5 M sacharózy.
- 9) Opäť som centrifigovala pri 8000 x g, 10 min., pri 4 °C.
- 10) Opakovala som krok 8 a 9.
- 11) Nakoniec som bunky resuspendovala v 250 µl vychladenej 0,5 M sacharózy.
- 12) Objem v centrifugačnej kyvete som rozpipetovala po 100 µl do označených a predom vychladených mikroskúmaviek a uchovávala pri – 80 °C.

3.2.10.14 Transformácia plazmidu do kompetentných buniek *E. coli*

- 1) Kompetentné bunky (vid' kapitola 3.2.10.12) som premiestnila z hlboko mraziaceho boxu do krabice s ľadom. K bunkám na ľadu som napipetovala príslušné množstvo plazmidu (0,1 – 1 µg plazmidovej DNA).
- 2) Nechala som stáť na ľade po dobu 20 min.
- 3) Potom som mikroskúmavku umiestnila na 2 min. do termobloku rozohriaty na 42 °C.
- 4) Mikroskúmavku som potom umiestnila na 10 min. na ľad.
- 5) Potom som pridala 1 ml čerstvého LB média a nechala bunky rásť pri 37 °C po dobu 1 hodiny.
- 6) Následne som bunky zamiešala na vortexe a vysiala 200 µl na LB médium s ATB, zvyšok v mikroskúmavke som scentrifigovala (4000 x g, 5 min., laboratórna teplota), odobrala som supernatant, aby zostalo 200 µl, a toto množstvo som opäť zamiešala na vortexe a vysiala na ďalšie LB médium s ATB.
- 7) Transformanty som nechala cez noc rásť v termostate pri 34 °C.

3.2.10.15 Transformácia plazmidu do kompetentných buniek One Shot™ TOP10 *E. coli*

- 1) Kompetentné bunky (komerčne dodané) som premiestnila z hlboko mraziaceho boxu do krabice s ľadom. K bunkám na ľade som napipetovala príslušné množstvo plazmidu (0,1 – 1 µg plazmidovej DNA) a jemne premiešala.
- 2) Nechala som stáť na ľade po dobu 30 min.
- 3) Potom som mikroskúmavku umiestnila na 1 min. do termobloku rozohriaty na 42 °C.
- 4) Mikroskúmavku som potom umiestnila na 5 min. na ľad.
- 5) Potom som pridala 450 µl vytemperovaného S.O.C média (dodaný s kompetentnými bunkami) a nechala bunky rásť pri 37 °C v termobloku s trepačkou po dobu 1 hodiny.
- 6) Následne som bunky zamiešala na vortexe a vysiala 100 µl na LB médium s ATB, zvyšok v mikroskúmavke som scentrifugovala (4000 x g, 5 min., laboratórna teplota), odobrala som supernatant, aby zostalo 100 µl, a toto množstvo som opäť zamiešala na vortexe a vysiala na ďalšie LB médium s ATB.
- 7) Transformanty som nechala cez noc rásť v termostate pri 34 °C.

3.2.10.16 Elektroporácia plazmidu do kompetentných buniek *S. aureus*

Pre elektroporáciu *S. aureus* som použila postup uvedený v metódach pre genetickú manipuláciu *S. aureus* (Schneewind a Missiakas 2014).

- 1) Kompetenté bunky *S. aureus* (viď kapitolu 3.2.10.3) som na ľade nechala čiastočne rozmraziť a potom som k nim napipetovala 1 µl vyzolovaného plazmidu (množstvo by malo odpovedať 0,1 – 1 µg plazmidovej DNA).
 - a. Pri editácii genómu pomocou CRISPR – Cas9 systému sa ku kompetentným bunkám napipetuje 10 µl vyzolovaného plazmidu (množstvo by malo odpovedať 1 – 2 µg plazmidovej DNA).
- 2) Obsah mikroskúmavky (cca 100 µl) som napipetovala do elektroporačnej kyvety (1 mm = 0,1 cm), stále som ich uchovávala na ľade.
- 3) Elektroporátor som nastavila na nasledujúce parametre:

Napätie – 2,5 kV, Odpor – 100 Ω, Kapacita – 25 µF

 - a. Pri editácii genómu pomocou CRISPR – Cas9 systému som elektroporátor nastavila na nasledujúce parametre:

Napätie – 2,1 kV, Odpor – 100 Ω , Kapacita – 25 μ F

Po nastavení som aplikovala na kyvetu s bunkovou suspenziou elektrický pulz.

- 4) Okamžite som do kyvety pridala 1 ml TSB média, bunky som preniesla do mikroskúmavky a nechala 1 hodinu rásť pri 34 °C.
 - a. Pri editácii genómu pomocou CRISPR – Cas9 systému som obsah mikroskúmavky nechala rásť 2 hodiny pri 30 °C.
- 5) Po jednej hodine som bunky zamiešala na vortexe a vysiala 100 μ l na TSB médium s príslušným ATB, zvyšok v mikroskúmavke som scentrifugovala (4000 x g, 5 min., laboratórna teplota), odobrala som supernatant, aby zostalo 100 μ l, a toto množstvo som opäť zamiešala na vortexe a vysiala na ďalšie TSB médium s ATB, na ktorom som selektovala.
- 6) Bunky som nechala rásť na TSB médiu s príslušným ATB cez noc v termostate pri 34 °C.
 - a. Pri editácii genómu pomocou CRISPR – Cas9 systému som bunky nechala rásť na TSB médiu s príslušným ATB cez noc v termostate pri 30 °C.

3.2.10.17 Transdukcia plazmidu pCNSigBtet do vybraných kmeňov *S. aureus*

Pre transdukciu *S. aureus* som použila postup uvedený v metódach pre genetickú manipuláciu *S. aureus* (Schneewind a Missiakas 2014).

I. Príprava fágového lyzátu

- 1) Pripravila som kultúru kultivovanú cez noc v 10 ml TSB média s prídavkom 5 mM CaCl₂ z donorového kmeňa.
- 2) Kultúru kultivovanú cez noc som nariedila 1:100 v 10 ml TSB média s prídavkom 5 mM CaCl₂ a nechala som inkubovať vo vzdušnej trepačke pri 34 °C, 180 RPM, kým nedosiahla optickú densitu OD₆₀₀ = 0,4 (približne 10⁸ buniek/ml).
- 3) Do sterilných skúmaviek som napipetovala 0,5 ml zásobného fágového lyzátu (bakteriofág Φ 80) a 0,5 ml bunkovej kultúry (multiplicita infekcie – 1:1 – baktérie : fágový lyzát).
- 4) Skúmavky som nechala stáť 30 min. v termostate pri 34 °C.

- 5) Pripravila som si 10 ml TSB média s prídavkom 5 mM CaCl₂ a po uplynutí 30 minút som obsah skúmavky vyliala do média a nechala inkubovať vo vzdušnej trepačke pri 34 °C, 180 RPM po dobu 3 hodín. Následne som cez noc nechala bunky úplne zlyzovať pri laboratórnej teplote.
- 6) Na ďalší deň som lyzát centrifugovala pri 3000 x g, 10 min. pri laboratórnej teplote, opatrne som dobrala supernatant a sfilterovala pomocou 0,2 μm PVDF filtrom.
- 7) Prefiltrovaný lyzát som uchovávala pri 4 °C.
- 8) Pri príprave fágového lyzátu z bakteriofága $\Phi 11$ som postupovala rovnakým spôsobom.

II. Transdukcia plazmidu do recipientného kmeňa

- 1) Pripravila som kultúru kultivovanú cez noc v 3 ml TSB média s prídavkom 5 mM CaCl₂ z recipientného kmeňa.
- 2) Kultúru kultivovanú cez noc som nariedila 1:100 v 5 ml TSB média s prídavkom 5 mM CaCl₂ a nechala inkubovať vo vzdušnej trepačke pri 34 °C, 180 RPM, kým nedosiahla optickú densitu OD₆₀₀ – 0,4.
- 3) Pripravila som si potrebný počet sterilných skúmaviek s 2,5 ml TopAgaru obsahujúci citrát a nechala vytemperovať na 45 °C.
- 4) Aby som dostala správny pomer fágových častíc a bakteriálnych buniek bolo potrebné, aby som fágový lyzát nariedila. Použila som dekadickú riediacu radu. Je dôležité, aby multiplicita infekcie bola 1:10 (fágove častice : baktérie).
- 5) K 0,5 ml bunkovej kultúry som pridala 0,5 ml postupne riedeného fágového lyzátu a nechala som inkubovať v termostate pri 34 °C po dobu 30 min.
- 6) Po inkubácii som obsah skúmavky zmiešala s TopAgarom a vyliala na TSB médium s ATB (5 μg/ml tetracyklínu). Počkala som, kým TopAgar stuhne a následne som misky kultivovala cez noc v termostate pri 34 °C.

3.2.11 Práca s bakteriálnou RNA

3.2.11.1 Izolácia RNA

- 1) K peletu bakteriálnych buniek (vid' kapitola 3.2.9) som pridala 1 ml izolačného kitu TRI Reagent® a pomocou vortexovania som bunky úplne zlyzovala.
- 2) Vzorky som nechala 5 min. stáť pri laboratórnej teplote a následne som k nim pridala 0,2 ml chloroformu a 15 sekúnd som ich intenzívne premiešavala, kým som nedostala homogénnu zmes. Túto zmes som nechala 15 min. stáť pri laboratórnej teplote a následne som ju scentrifugovala pri 12000 x g, 15 min., pri 4 °C.
- 3) Po centrifugácii som dostala 3 fázy. V hornej vodnej fáze sa nachádzala RNA, v interfáze a v tretej organickej fáze sa nachádzala DNA a proteíny.
- 4) Hornú bezfarebnú vodnú fázu som opatrne preniesla do čistej mikroskúmavky (RNase free), pridala som k nej 0,5 ml isopropanolu a nechala stáť pri laboratórnej teplote po dobu 10 min.
- 5) Vzorky som centrifugovala pri 12000 x g, 8 min., pri 4 °C a následne som opatrne odstránila supernatant.
- 6) K RNA peletu som pridala 1 ml 75% ethanolu a zortexovala. Následne som vzorky centrifugovala pri 7500 x g, 5 min., pri 4 °C.
- 7) Odstránila som ethanolový supernatant a pelet som nechala vyschnúť na vzduchu po dobu 5 min.
- 8) K peletu som následne pridala 0,5 µl RiboLocku a 50 µl RNase free vody a nechala inkubovať pri 40 °C po dobu 15 min.
- 9) Nakoniec som zmerala koncentráciu získanej RNA pomocou NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spektrofotometr.
- 10) Vzorky som skladovala v hlboko mraziacom boxe pri teplote – 80 °C.

3.2.11.2 Prevod RNA na cDNA

Pre prevod RNA na cDNA som použila LunaScript® RT SuperMix Kit. Tento kit obsahuje reverznú transkriptázu, Luna® Reverse Transcriptase, inhibítor RNázy, random hexamer a poly – dT primery ako aj modré farbivo.

- 1) Do PCR mikroskúmavky som napipetovala 4 µl LunaScript RT SuperMix (5x koncentrovaný), variabilné množstvo vyizolovaného RNA (vid' kapitola 3.2.11.1). Množstvo RNA templátu odpovedalo 1 µg celkovej RNA v reakcii. Celkový objem reakcie bol 20 µl. Kde to bolo potrebné reakciu som doplnila beznukleázovou vodou.
- 2) Na termocykléry som si nastavila nasledujúci program:

▪ Nasadnutie primerov	25 °C	2 min.
▪ Syntéza cDNA	55 °C	10 min.
▪ Tepelná inaktivácia enzýmu	95 °C	1 min.
- 3) Koncentráciu a čistotu cDNA som zmerala pomocou NanoDropu.

3.2.11.3 Kvantitatívna polymerázová reakcia (qPCR)

- 1) Pre kvantitatívnu RT PCR som použila komerčný kit Luna Universal qPCR Master Mix. Do 1,5 ml mikroskúmaviek som pripravila premixy – jeden s referenčnými primermi *gyrB*, ďalšie so sledovanými primermi pre gény *sigB*, *mazEF*, *agrA*, *rnaIII*.

- Pre jednu reakciu mal premix nasledujúce zloženie:

• Komerčný kit Luna (2x konc.)	10 µl
• Primer F (10 µM)	1 µl
• Primer R (10 µM)	1 µl
• <u>Beznukleázová voda</u>	<u>3 µl</u>
Celkový objem	15 µl

- 2) Premixy som rozpipetovala do 384 jamkovej doštičky pre qPCR po 15 µl a do každej jamky som pridala 5 µl cDNA templátu v technických duplikátoch (v prípade kontrolnej reakcie 5 µl beznukleázovej vody).
- 3) Doštičku som zalepila fóliou a krátko scentrifugovala na Centrifúge 5430 (Eppendorf).
- 4) Doštičku som vložila do Real – time PCR cycleru ROCHE LC480, kde som spustila nasledujúci program:

Krok PCR	Teplota	Čas	
Úvodná denaturácia	94 °C	15 min.	
Denaturácia	95 °C	10 s	Opakovanie 45x
Nasadenie primerov	52 °C	10 s	
Predlžovanie primerov	68 °C	25 s	
High resolution melting analýza: Denaturačná analýza (krivka)			
Kontinuálne zvyšovanie teploty na 72 °C (4,8 °C / s)			
Chladienie doštičky na	4 °C	∞	

4 Výsledky

4.1 Kritérium výberov kmeňov

Cieľ: Vybrať taký kmeň S. aureus, ktorý má kumulatívne mutácie a Agr typ iný ako I a taký kmeň, ktorý nesie mutáciu v géne sigB.

Pre nadchádzajúce experimenty som vybrala chronologické izoláty *S. aureus* pacienta č. 1, ktoré mali iný Agr typ ako I (diplomová práca Anety Valtovej sa zaoberala izolátmi, ktoré mali Agr typ I) a mal kumulatívne mutácie, a izoláty *S. aureus* pacienta č. 2, ktoré niesli mutáciu v géne *sigB*.

V tabuľke č. 2 a č. 3 sú uvedené kumulatívne mutácie, ktoré vznikli počas chronickej infekcie. Izoláty boli osekvenované v MBÚ AV ČR a následnú analýzu mutant a zistenie kumulatívnych mutácií mal na starosti RNDr. Jaroslav Nunvář, Ph.D.

Referenčná poloha	Zmena nukleotidu	Efekt proteínu	Zmena aminokyseliny	Prístup k proteínu	Produkt	39A	40A	41A	63A
1051321	T→C			Intergénové	Downstream only		x		
1947748	G→A	Substitúcia	A→T	WP_000842277.1	Energy coupling factor transporter S component ThiW		x		
484086	(T)6→(T)5			Intergénové	Upstream from WP_001177186.1 (hypothetical protein) and WP_001822491.1 (transcriptional regulator)			x	
1159628	T→C	Žiadny		Pseudogén	Glutamate synthase			x	
1791418	C→T	Substitúcia	T→I	WP_000791581.1	Fibrinogen-binding protein				x
1810287	T→C	Žiadny		WP_000340465.1	Bacillithiol biosynthesis cysteine-adding enzyme BshC				x

Tabuľka č. 2: Kumulatívne mutácie pacienta č. 1 (izoláty 39A, 40A, 41A a 63A), ktoré vznikli počas chronickej infekcie.

Referenčná poloha	Zmena nukleotidu	Ďvekt proteínu	Zmena aminokyseliny	Přístup k proteínu	Produkt	36A	51A	75A
639414	C→T	Substitúcia	V→I	WP_000737654.1	Metal ABC transporter substrate-binding protein	x	x	x
894127	G→T	Źiadny		WP_000558764.1	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	x	x	x
1623592	G→T	Substitúcia	R→S	WP_000108671.1	tRNA (N(6)-L-threonylcarbamoyladenosi(37)-C(2))-methylthiotransferase MtaB	x	x	x
1813357	C→A	Substitúcia	A→S	WP_000411087.1	D-alanine aminotransferase			
1314674	G→T			Intergénové	Upstream from WP_000805733.1 (DUF961 domain-containing protein)			
381267	G→T	Źiadny		WP_000052781.1	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	x		
1042054	A→G	Źiadny		WP_000030814.1	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	x		
1395013	G→T	Substitúcia	E→D	WP_000673098.1	Aminoacyltransferase FemB			
347632	(T)7→(T)6	Frame Shift		WP_000077311.1	Bifunctional homocysteine S-methyltransferase/methylenetetrahydrofolate reductase		x	x
355991	T→C	Źiadny		WP_000400841.1	mRNA interferase PemK		x	x
480551	A→G	Substitúcia	I→V	WP_099119600.1	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase		x	x
487692	A→G	Substitúcia	N→S	WP_000154240.1	Transcription-repair coupling factor		x	x
650847	T→C	Źiadny		WP_000817954.1	ABC transporter ATP-binding protein		x	x
915068	A→G	Substitúcia	T→A	WP_000172367.1	ATP-dependent helicase/deoxyribonuclease subunit B		x	x
953869	A→G	Źiadny		WP_001180271.1	ABC transporter permease		x	x
957185	T→C	Źiadny		WP_001794171.1	IS5/IS1182 family transposase		x	x
988921	C→T	Substitúcia	T→I	WP_001794169.1	Serine protease		x	x
1042336	G→A	Substitúcia	V→I	WP_000238673.1	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase		x	x
1442345	T→C			Intergénové	Upstream from WP_000342154.1 (serine protease)		x	x
2394576	T→C	Substitúcia	I→M	WP_000999194.1	Acyl-CoA dehydrogenase		x	x
2619206	G→T			Intergénové	Upstream from WP_001793880.1 (hypothetical protein)		x	x
2802561	T→C	Źiadny		WP_000565312.1	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8C		x	x
2178485	C→A	Substitúcia	R→L	WP_001041107.1	RNA polymerase sigma factor SigB	x	x	x

Tabuľka č. 3: Kumulatívne mutácie pacienta č. 2 (izoláty 36A, 51A a 75A), ktoré vznikli počas chronickej infekcie.

4.2 Stanovenie kriviek hynutí po pôsobení antibiotík pre chronologické izoláty

Cieľ: Stanoviť krivky hynutia po pôsobení troch vybraných antibiotík a určiť podľa nich mieru schopnosti perzistovať u jednotlivých chronologických izolátov.

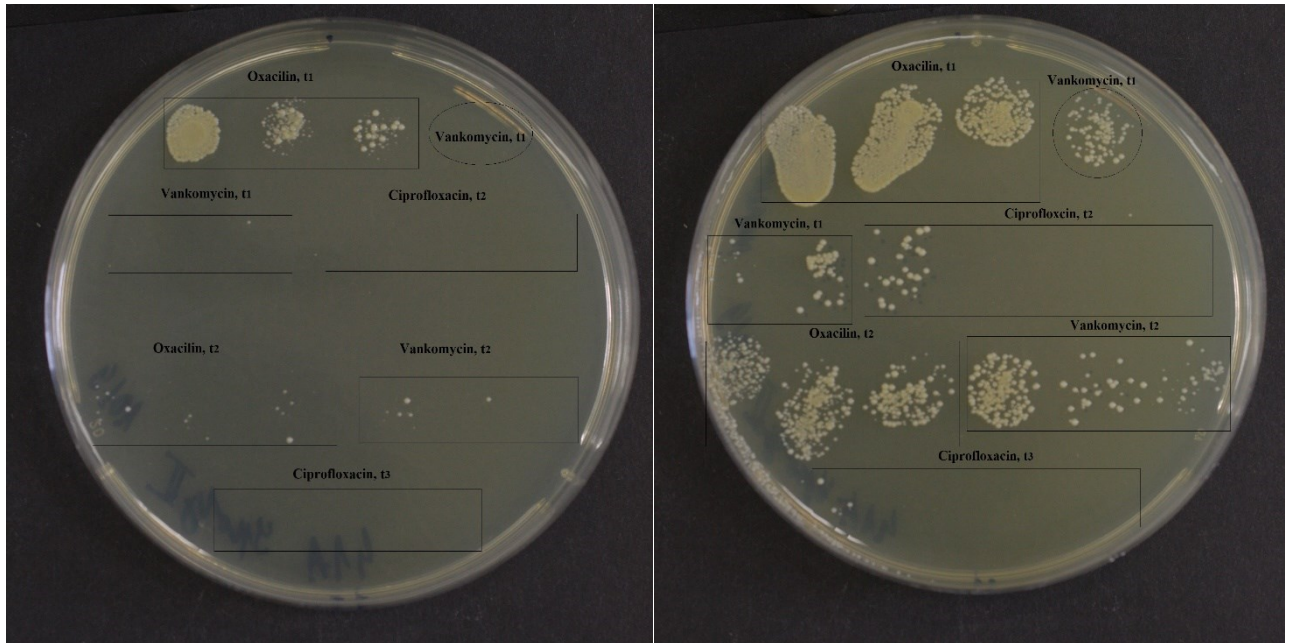
Aby som jednotlivé pokusy, kde boli kultúry vystavené antibiotikám, vedela uskutočniť, bolo potrebné poznať MIC klinických izolátov, ktorými som v pokusoch pracovala. Stanovenie MIC klinických izolátov sa uskutočnil vo FN v Motoli a výsledky mi boli následne poskytnuté. Hodnoty MIC jednotlivých klinických izolátov sú zaznamenané v tabuľke č. 4.

Pacient	Izolát	Ciprofloxacín (mg/l)	Oxacilín (mg/l)	Vankomycín (mg/l)
1.	39A	0,25	0,125	2
	40A	0,25	0,125	2
	41A	0,5	0,125	2
	63A	0,25	0,125	2
2.	36A	0,5	0,5	2
	51A	0,5	0,5	2
	75A	0,5	0,5	2

Tabuľka č. 4 : Hodnoty MIC jednotlivých klinických izolátov.

V tejto časti diplomovej práce som stanovila krivky hynutia v časovom intervale od 1 do 4 hodín, kedy bola kultúra v exponenciálnej fázy rastu a bola vystavená pôsobení rôznych antibiotík, ktoré mali koncentráciu 100x MIC. Rovnako ako pri predchádzajúcich diplomových prácach H. Kotkovej (Kotková 2019) a A. Valtovej (Valtová 2020) som použila metódu kvapkového výsevu na agarovú platňu v štyroch riedeniach (10^{-1} – 10^{-4}). Postupovala som podľa bodov, ktoré sú uvedené v kapitole 3.2.5. Niektoré nižšie riedenia u jednotlivých klinických izolátov vyrastali veľmi zle alebo nevyrastali vôbec, preto som pristúpila k metóde celoplošného rozteru. Pri tejto metóde som pre každé antibiotikum v každej hodine vysiala jedno riedenie. Zároveň sme sa rozhodli otestovať, či vplyv supernatantu z nočnej kultúry vybraných klinických izolátov, u ktorého sme predpokladali, že obsahuje molekuly QS systému zlepši schopnosť vyrastania z perzistentného stavu. Pri neskorších chronologických izolátov som preto používala filtráciou sterilizovaný supernatant jednotlivých klinických izolátov (viď kapitola 3.2.5.1), pretože pri porovnaní výsledkov z prietokového cytometra úplný úbytok buniek sme nepozorovali. Použitie supernatantu pomohol bunkám vyrásť z perzistentného stavu aj pri nízkych riedeniach. Miera schopnosti perzistovať pri použití supernatantu bolo

jedno až o dva rády väčšie oproti výsevom, kde supernatant použitý nebol. Toto porovnanie je možné vidieť na obrázku č. 12. Pokusy som robila v biologických triplikátoch, v niektorých prípadoch v duplikáte a ojedinele v jednom replikáte.



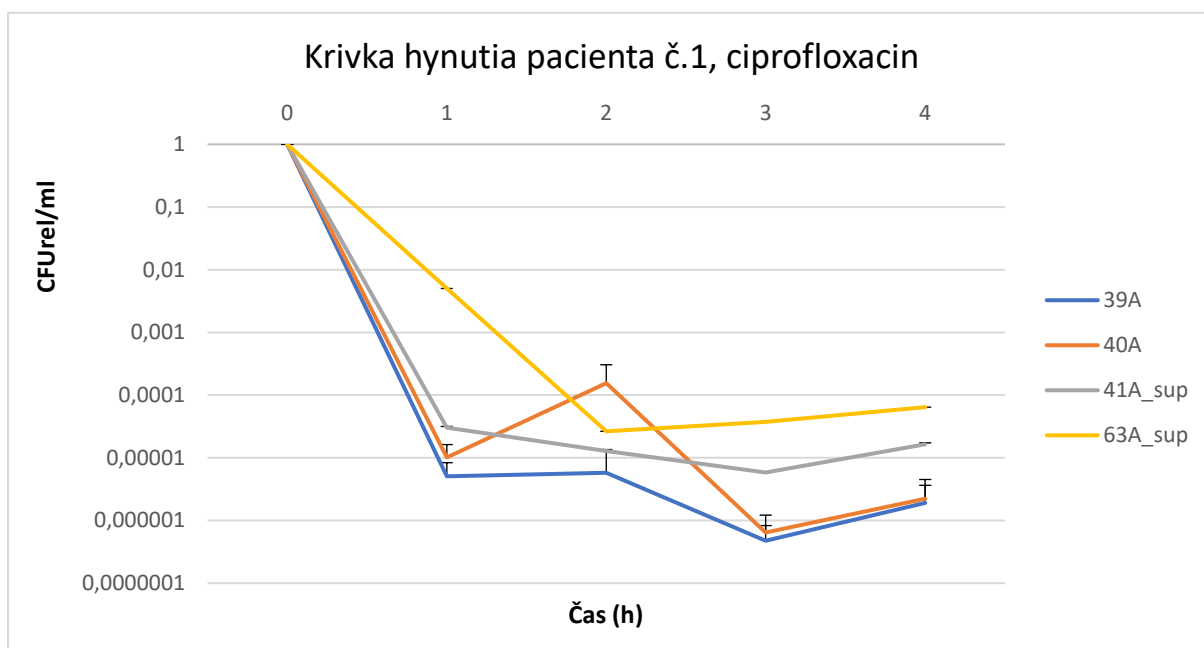
Obrázok č. 12: Schopnosť vyrastanie z perzistentného stavu izolátu 41A bez pridania supernatantu na agarovú platňu a s pridaným supernatantom. Na obrázkoch môžeme vidieť kvapokvý výsev pre všetky tri antibiotiká v riedeniach $10^{-1} - 10^{-4}$ v časoch $t_1 - t_3$. Bunky boli inkubované 24h v termostate pri $34\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na obrázku vľavo môžeme vidieť agarovú platňu bez pridania supernatantu. Bunky vyrastali veľmi neochotne z perzistentného stavu oproti obrázku vpravo, kde na agarovú platňu bol pridaný supernatant a bunky preukázateľne vyrástli už po 24h.

Aby som biologické triplikáty a duplikáty vedela porovnávať, hodnoty CFU z jednotlivých odberov som vzťahla na CFU kontroly (čas t_0 pred pridaním antibiotík podľa vzorca:

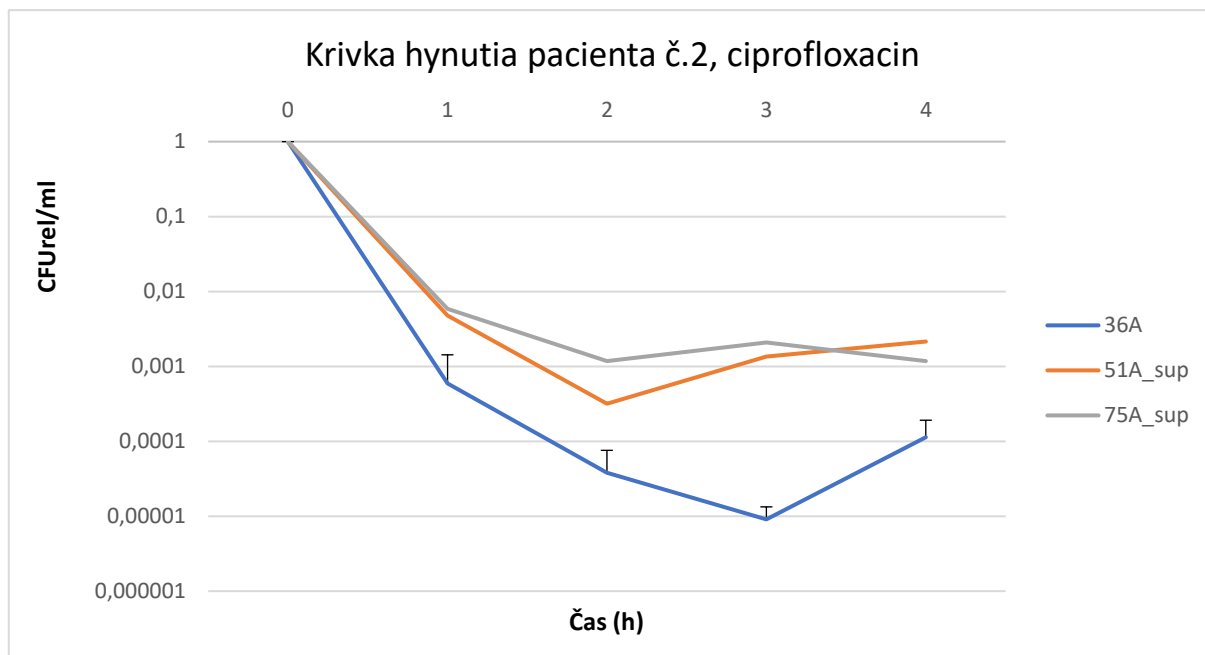
$$CFU_{rel} = \frac{CFU(t_{1-4})}{CFU_{t_0}}$$

Antibiotiká, ktoré som používala pre stanovenie kriviek hynutí sa bežne používajú na liečbu stafylokokových infekcií u pacientov trpiacich cystickou fibrózou. Tieto antibiotiká pôsobia rozličným mechanizmom. Používala som nasledujúce antibiotiká - fluorochinolonové antibiotikum ciprofloxacín (zo zásobného roztoku 25 mg/ml som použila $10\text{ }\mu\text{l}$ pre izoláty 39A, 40A a 63A; $20\text{ }\mu\text{l}$ pre izoláty 41A, 36A, 51A a 75A), oxacilin patriaci medzi β – laktamové antibiotiká (zo zásobného roztoku 50 mg/ml som použila $2,5\text{ }\mu\text{l}$ pre izoláty 39A, 40A, 41A a 63A; $10\text{ }\mu\text{l}$ pre izoláty 36A, 51A a 75A) a vankomycin, ktoré je glykopeptidové antibiotikum (zo zásobného roztoku 50 mg/ml som použila $40\text{ }\mu\text{l}$ pre každý izolát).

Pre prehľadnosť uvádzam iba krivku hynutia pre antibiotikum ciprofloxacín chronologických izolátov pacienta č.1 ako aj pacienta č. 2 pre ilustráciu jeho priebehu. V grafoch môžeme pozorovať charakteristickú bifázickú krivku (viď grafy č. 1 a č. 2). Keď bol rozdiel v stanovení CFU bez a pri pridaní supernatantu, boli v grafoch použité výsledky so supernatantom.

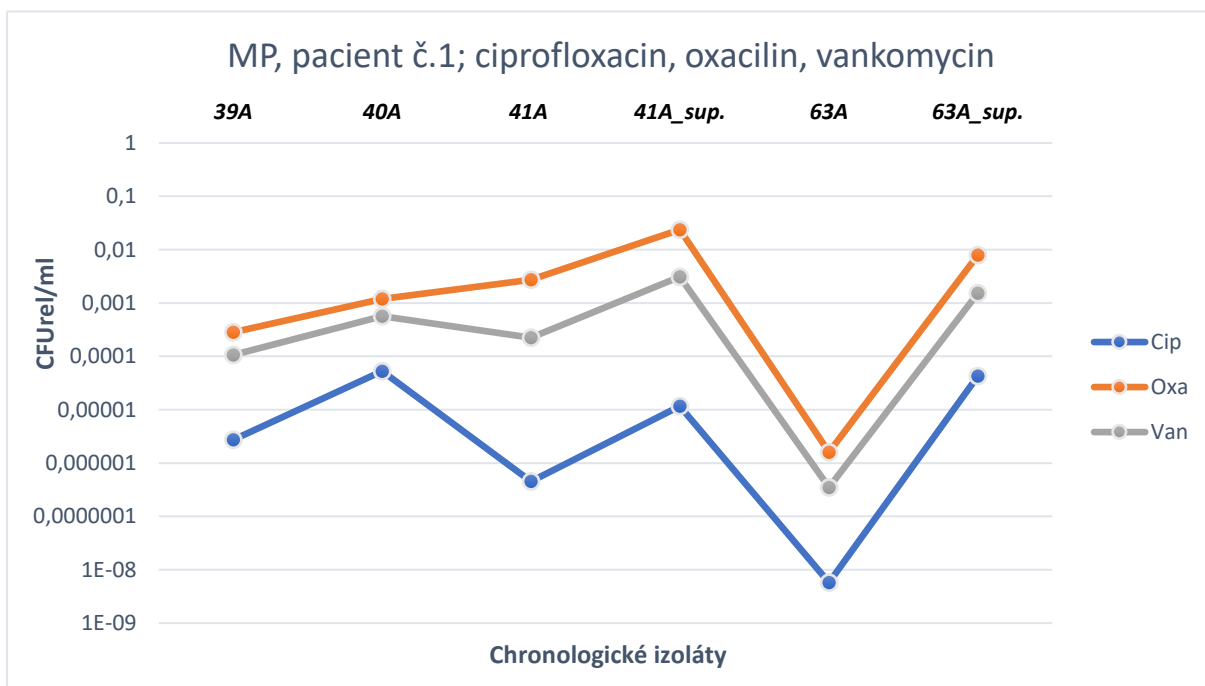


Graf č. 1: Krivka hynutia u izolátov 39A, 40A, 41A a 63A po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu. Graf znázorňuje relatívny počet preživších buniek v každej hodine v priebehu pôsobenia antibiotika. Hodnoty na ose y sú vynesené logaritmicky pri základe 10. Chybové úsečky označujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov (39A, 40A) a z dvoch biologických duplikátov (41A, 63A). U izolátov 41A a 63A pri stanovení CFU sa použili výsledky, keď bol pridaný sterilný supernatant na kultivačnom médiu (sup).

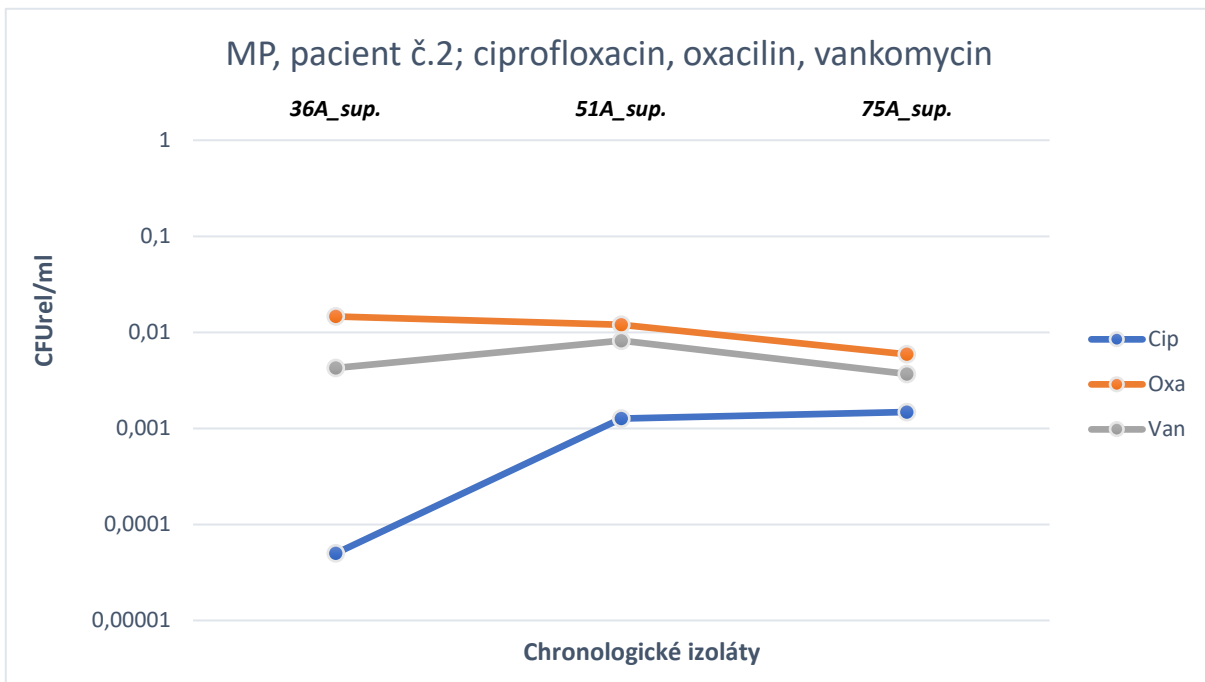


Graf č. 2: Krivka hynutia u izolátov 36A, 51A a 75A po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu. Graf znázorňuje relatívny počet preživších buniek v každej hodine v priebehu pôsobenia antibiotika. Hodnoty na ose y sú vynesené logaritmicky pri základe 10. Chybové úsečky označujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických replikátov (36A). Výsledky izolátov 51A a 75A pochádzajú z jedného biologického replikátu. U izolátov 51A a 75A pri stanovení CFU sa použili výsledky, keď bol pridaný sterilný supernatant na kultivačnom médiu (sup).

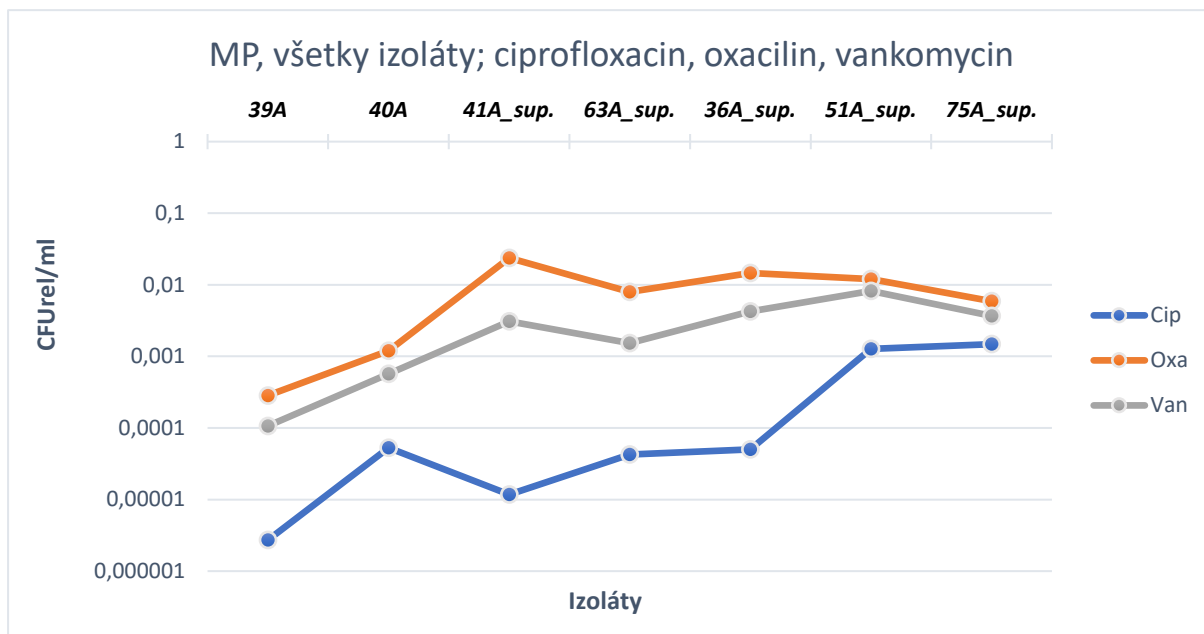
Aby som mohla porovnať, ako sa zmenila schopnosť jednotlivých izolátov perzistovať v čase, stanovila som mieru schopnosti perzistovať jednotlivých klinických izolátov z druhej bifázickej časti krivky hynutia, kedy počet preživších buniek už neklesá a porovnávala som ich medzi sebou. Do spoločného grafu som vynesla chronologické izoláty pacienta č.1 (viď graf č. 3) a do ďalšieho grafu som vynesla chronologické izoláty pacienta č.2 (viď graf č. 4) a nakoniec som do spoločného grafu vynesla všetky študované chronologické izoláty (viď graf č. 5). Pre porovnanie zmeny schopnosti perzistovať jednotlivých izolátov je možné vynieť chronologické izoláty jednotlivých pacientov do spoločného grafu pre každé antibiotikum zvlášť.



Graf č. 3: Miera schopnosti perzistovať (MP) izolátov 39A, 40A, 41A a 63A po pôsobení 100x MIC ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomicinu. Graf znázorňuje relatívny počet preživších buniek po pôsobení jednotlivých antibiotík. Hodnoty na osi y sú vynesené logaritmicky pri základe 10. V grafe je možné vidieť rozdiel v miere schopnosti perzistovať u izolátov 41A a 63A, keď sa pri stanovení CFU použili výsledky, kedy bol pridaný sterilný supernatant na kultivačnom médiu (sup).



Graf č. 4: Miera schopnosti perzistovať (MP) izolátov 36A, 51A a 75A po pôsobení 100x MIC ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomicinu. Graf znázorňuje relatívny počet preživších buniek po pôsobení jednotlivých antibiotík. Hodnoty na osi y sú vynesené logaritmicky pri základe 10. Hodnoty použité v grafe boli získané z experimentov, kde pri stanovení CFU bol použitý sterilný supernatant na kultivačnom médiu (sup).



Graf č. 5: Miera schopnosti perzistovať (MP) všetkých mnou študovaných izolátov po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomicínu. Graf znázorňuje relatívny počet preživších buniek po pôsobení jednotlivých antibiotík. Hodnoty na osi y sú vynesené logaritmicky pri základe 10.

V mojej diplomovej práci som skúmala izoláty, ktoré mali Agr typ II a neniesli žiadne mutácie v *agr* operóne (pacienta č. 1) a izoláty, ktoré mali Agr typ III, neniesli žiadne mutácie v *agr* operóne, ale niesli mutáciu v géne *sigB* (pacient č. 2). Izoláty, ktoré mali Agr typ I skúmala moja predchodkyňa.

Izoláty mutáciou v géne *sigB* nesú substitučnú mutáciu v tomto géne na pozícii 142, ktorá vedie k aminokyselinovej zámene arginínu na leucín. Arginín ako pôvodná aminokyselina je konzervovaná vo všetkých známych genómoch *S. aureus*. Vytvorenie tejto mutácie je pravdepodobne škodlivé, preto sa vyskytuje len zriedkakedy.

Produkt génu *sigB* zodpovedá za obecnú stresovú odpoveď u *S. aureus*. Jeho vplyv na perzistenciu je pravdepodobne nepriamy a je tu možnosť prepojenia cez Agr systém, ktorý je súčasťou SigB regulónu (Xu et al. 2017). Avšak štúdie dokázali, že mutanty v sigma faktore B ($\Delta sigB$), vytvárajú v menšej miere perzistentné bunky ako divoký kmeň *S. aureus* (Moisan et al. 2006). Mutácia v géne *sigB* by mohla zvyšovať schopnosť perzistencie a v chronologických izolátoch 51A a 75A sa vytvorili i ďalšie mutácie počas pretrvávania v organizme pacienta.

Chronologické izoláty pacienta č. 1 a pacienta č. 2 sa navzájom ďalej odlišujú v mutáciách, ktoré sa vytvorili počas dlhodobej infekcie u pacientov trpiacich cystickou fibrózou (viď tabuľka č. 3 v kapitola 4.1). Jediná významná je frame shift mutácia u pacienta č. 2 v géne kódujúci metyléntetrahydrofolát reduktázu, ktorá je súčasťou dráhy premeny

tetrahydrofolátu v jedno uhlíkovom metabolizme. Vplyv tejto mutácie na perzistentný stav však zatiaľ nebola popísaná. U ostatných proteínov sú iba mutácie so zámenou, ich vplyv je špekulatívny (sú malé a nedajú sa odhadnúť).

Pri zrovnaní pôsobenia jednotlivých antibiotík som dospela k nasledujúcemu.

Po pôsobení ciprofloxacínu chronologické izoláty 40A, 41A a 63A majú o rád vyššiu mieru schopnosť perzistovať oproti primoizolátu 39A (viď graf č. 3). Chronologické izoláty 51A a 75A majú až o dva rády vyššiu mieru schopnosť perzistovať ako primoizolát 36A (viď graf č. 4). Chronologické izoláty pacienta č. 1 majú o jeden až o dva rády nižšiu mieru schopnosť perzistovať oproti chronologickým izolátom pacienta č. 2. Tento rozdiel je pravdepodobne daný tým, že chronologické izoláty pacienta č. 2 nesú mutáciu v géne *sigB*.

Po oxacilínu miera schopnosti perzistovať pre izoláty 40A, 41A a 63A sa zvýšila o jeden až o dva rády oproti primoizolátu (viď graf č. 3). Miera schopnosť perzistovať u chronologických izolátov pacienta č. 2 sa v čase nemenila. Všetky tri izoláty majú zrovnateľnú schopnosť perzistovať (viď graf č. 4).

Ako vyplýva z kriviek hynutí pre vankomycín, schopnosť perzistovať chronologických izolátov pacienta č. 1 sa v čase zvýšila o jeden až dva rády oproti primoizolátu (viď graf č. 3). Všetky tri chronologické izoláty pacienta č. 2 mali tiež zrovnateľnú schopnosť perzistovať (viď graf č. 4).

Pri všetkých chronologických izolátov vznikalo najmenej prezisterov po pôsobení ciprofloxacínu a najviac perzisterov vznikalo po pôsobení oxacilínu. Po pôsobení vankomicínu vznikalo o niečo menej perzisterov ako po pôsobení oxacilínu, ale rozdiel nebol tak veľký (viď graf č. 5).

Z výsledkov vyplýva, že zmeny v miere schopnosti perzistovať u chronologických izolátov pacienta č. 1 boli viditeľné, a to tak, že schopnosť perzistovať sa v čase zvýšila. U chronologických izolátov pacienta č. 2 v miere schopnosti perzistovať neboli také rozdiely v dlhšom časovom intervale, len pri ciprofloxacínu bola miera schopnosti perzistovať o rád vyšší oproti primoizolátu.

U chronologických izolátov pacienta č. 1 sa v čase zvyšuje schopnosť pretrvávajúť v perzistentnom stave. Obecné je možné povedať, že chronologické izoláty pacienta č. 2 majú vyššiu schopnosť perzistovať o jeden až dva rády a to hlavne pri antibiotiku ciprofloxacín.

Počas stanovovania kriviek hynutí som si všimla, že chronologické izoláty pacienta č. 2 dosahujú hodnotu $OD_{600} = 0,5$ za dlhšiu dobu ako izoláty pacienta č. 1, preto som stanovila ich rýchlosť rastu a dobu zdvojenia. Hodnoty doby zdvojenia sú vynesené v tabuľke č. 5.

Číslo pacienta	Izolát	Doba zdvojenia ($T_{1/2}$), min.
1	39A	30,7
	40A	30,5
	41A	31,3
	63A	31,3
2	36A	40,7
	51A	53,1
	75A	43,4

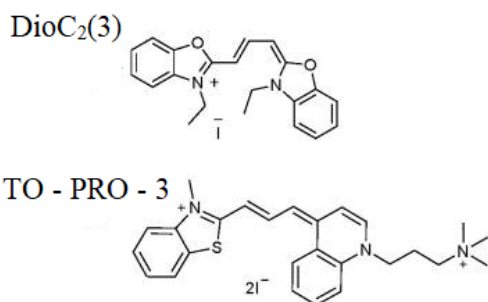
Tabuľka č. 5: Doba zdvojenia študovaných klinických izolátov. Doba zdvojenia bola vypočítaná zo smernice priamky (k) zo semilogaritmickeho vynesenia hodnôt pre OD ($\text{Log}_2(\text{OD} \cdot 1000)$) proti času (t), podľa vzorca - $T_{1/2} = 1/k$.

Izoláty pacienta č. 1 mali skoro rovnaké doby zdvojenia, oproti tomu izoláty pacienta č. 2 mali o niečo dlhší čas zdvojenia. Izoláty pacienta č. 2 nesú mutáciu v géne *sigB*. Mutácia v géne *sigB* ako pravdepodobne aj ďalšie mutácie zapríčínajú pomalšiu rastovú rýchlosť a dlhšiu dobu zdvojenia.

4.3 Vplyv vybraných antibiotík na membránový potenciál v priebehu kriviek hynutí u jednotlivých chronologických izolátov

Cieľ: Pozorovať vplyv vybraných antibiotík na formovanie subpopulácie s nižším membránovým potenciálom a túto subpopuláciu kvantifikovať voči mŕtvym bunkám a bunkám so zachovaným membránovým potenciálom.

K pozorovaniu membránového potenciálu som použila kombináciu dvoch fluorescenčných farieb, a to fluorescenčnú farbu TO – PRO – 3 pre meranie permeability buniek a DioC₂(3) (3,3'-diethyloxakarbokyanin jodid) pre meranie polaritu buniek. TO – PRO – 3 je cyanínové farbivo viažuce sa na nukleové kyseliny, ktoré nie je schopné preniknúť do cytoplazmy bunky, keď je membrána intaktná. Pri poškodení bunkovej membrány je však farbivo schopné preniknúť do bunky a viazať sa na DNA (McAuley et al. 2018). DioC₂(3) je karbocyanínová fluorescenčná farba, hromadí sa na hyperpolarizovaných membránach a preniká do lipidovej dvojvrstvy. Vykazuje zelenú fluorescenciu vo všetkých bakteriálnych bunkách, avšak v bunkách, ktoré udržiavajú svoj membránový potenciál sa začne hromadiť a molekuly DioC₂(3) začnú asociovať, čím sa jeho fluorescencia posúva k červenému spektru (Hammer a Heel 2012). Z pomeru zelenej/červenej fluorescencie je možné určiť zmenu membránového potenciálu u meraných buniek oproti kontrolným vzorkám. Kombinácia TO – PRO – 3 s DioC₂(3) umožňuje odlíšiť bunky bez membránového potenciálu s neporušenou membránou a bunky bez potenciálu s permeabilizovanou membránou.



Obrázok č. 13: Chemická štruktúra molekúl DioC₂(3) a TO – PRO – 3, ktoré som použila pri meraní membránového potenciálu buniek na prietokovom cytometri (upravené a prevzaté z McAuley et al. 2018).

V tomto experimente som analyzovala chronologické izoláty *S. aureus* pacienta č. 1 (39A, 40A, 41A a 63A) a pacienta č. 2 (36A, 51A a 75A). V jednotlivých časoch kriviek hynutia – 1, 2, 3 a 4 hodiny od pridania antibiotika ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu som bunky odoberala, centrifugovala a resuspendovala v PBS. Potom som ich podľa návodu zafarbila a zmerala (postup a podmienky merania vid' kapitola 3.2.6). Meranie sa uskutočnili buď v biologickom triplikáte, duplikáte alebo ako jedno meranie.

Pre rozlíšenie jednotlivých subpopulácií bolo potrebné, aby som si pripravila pre každý izolát v čase t_0 kontrolné vzorky. Kontrolné vzorky pozostávali z buniek s permeabilizovanou membránou (zahriatie buniek na 90 °C po dobu 15 min.), so skratovaným membránovým potenciálom ale s neporušenou membránou (pridanie 500 μ M CCCP – ničí membránový potenciál odstránením protónového gradientu) a nefarbené bunky bez pridania antibiotika pre kontrolnú respirujúcu a intaktnú populáciu.

Výsledky som najprv vyhodnocovala v programe Cytexpert, pre stanovenie pomeru zelenej a červenej fluorescence som použila program FlowJo. V programe FlowJo som vo vnesení FSC voči SSC vhodne odlišila subpopuláciu buniek od zvyškov membrán a proteínov, aby som testovala v nasledujúcich vneseniach iba bunky. Bunky som následne analyzovala vo vnesení Dioc ratio voči TO – PRO – 3 (Novo et al. 2000). Pomer Dioc ratio som stanovila nasledujúcim spôsobom:

$$Dioc\ ratio = \frac{Zelená\ fluorescence\ DioC_2(3)}{Červená\ fluorescence\ DioC_2(3)}$$

Z uvedeného vzťahu vidíme, že bunky s vyšším membránovým potenciálom, ktoré majú spektrum fluorescence posunutý do červenej oblasti spektra, budú mať menšiu hodnotu Dioc ratio ako bunky s nižším membránovým potenciálom, u nich bude táto hodnota väčšia.

Podľa kontrolných vzoriek som odlišila tri subpopulácie buniek, a to nasledujúce - bunky s membránovým potenciálom a intaktné, bunky bez membránového potenciálu a intaktné a bunky bez membránového potenciálu a permeabilizované. O štvrtej subpopulácie, ktorá by mala predstavovať bunky s membránovým potenciálom, avšak permeabilizované, som neuvažovala, pretože z hľadiska fyziológie nie je takýto stav možný. Následne som vo vyššie uvedenom vynesení (Dioc ratio proti TO – PRO – 3) aplikovala rozdelenie do troch subpopulácií pre časy t_1 – t_4 po pridaní antibiotík ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu.

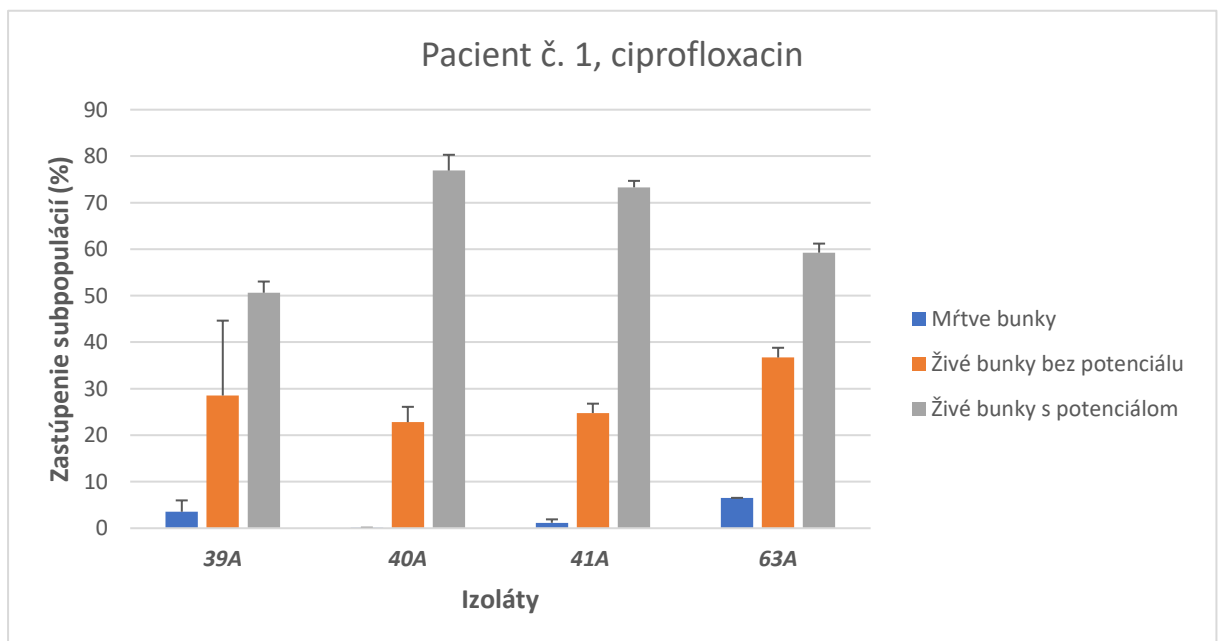
Aby som mohla zastúpenie subpopulácií rozlíšiť medzi jednotlivými chronologickými izolátmi, vynesla som výsledky do grafov (viď grafy č. 6a – 6c, 7a – 7c, 8a – 8c).

U chronologických izolátov pacienta č. 1 (39A, 40A, 41A a 63A) po pôsobení antibiotika ciprofloxacín aj v čase t_4 prevládala subpopulácia živých buniek so zachovaným membránovým potenciálom nad subpopuláciou živých buniek, ktoré svoj membránový potenciál stratili. Oproti primoizolátu (39A) izoláty, ktoré boli odobrané s odstupom času (40A, 41A a 63A) majú väčšie percento zastúpenia živých buniek so zachovaným membránovým potenciálom (viď graf č. 6a). Po pôsobení antibiotík oxacilínu a vankomycínu, ktoré pôsobia na bunkovú stenu dochádzalo k strate membránového potenciálu pri všetkých chronologických izolátov. Po pôsobení týchto antibiotík aj v čase t_4 som pozorovala väčšie percento zastúpenie živých buniek so strateným membránovým potenciálom u izolátov 40A, 41A a 63A oproti primoizolátu 39A. Určité percento živých buniek so zachovaným membránovým potenciálom som pozorovala hlavne u primoizolátu (39A) a izolátu 40A, zatiaľ čo u izolátov 41A a 63A zastúpenie tejto subpopulácie bola zanedbateľná (viď grafy č. 6b a č. 6c).

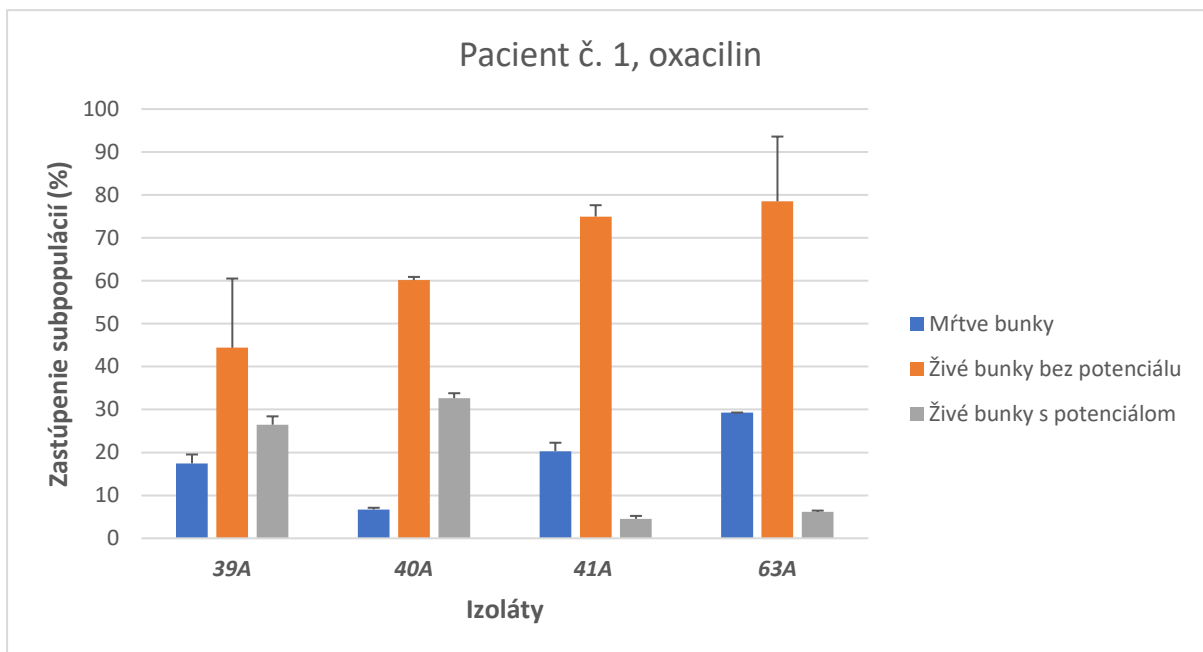
Tak ako pri chronologických izolátov pacienta č. 1, tak aj u chronologických izolátov pacienta č. 2 (36A, 51A a 75A) po pôsobení ciprofloxacínu prevládala subpopulácia živých buniek so zachovaným membránovým potenciálom u izolátov 36A a 75A. Izolát 75A mal približne rovnaké percentuálne zastúpenie subpopulácie živých buniek so zachovaným membránovým potenciálom ako primoizolát (36A). Zaujímavé je, že u izolátu 51A v prvej hodine prevládala subpopulácia buniek so zachovaným membránovým potenciálom a odstupom času začala prevládať subpopulácia buniek so strateným membránovým potenciálom, avšak v rámci populácie bolo stále celkom vysoké percento subpopulácie buniek so zachovaným membránovým potenciálom (viď graf č. 7a). Aj keď výsledky izolátu 51A pre antibiotikum ciprofloxacín mierne odlišujú od izolátov 36A a 75A v populácii buniek 51A je stále zastúpenie subpopulácie so zachovaným membránovým potenciálom. Meranie izolátu

51A sa uskutočnilo iba raz a je možné, že nastali chyby pri meraní, ktoré mohli viesť k tejto odchýlke výsledku. Po pôsobení oxacilínu približne v rovnakom percentuálnom zastúpení prevládala subpopulácia živých buniek so strateným membránovým potenciálom u všetkých štyroch chronologických izolátov (viď graf č. 7b). V prípade vankomycínu stále prevládala subpopulácia živých buniek so strateným membránovým potenciálom, avšak u izolátov 51A a 75A bolo väčšie percento mŕtvych buniek oproti primoizolátu (36A) a mali aj menšie zastúpenie živých buniek so strateným membránovým potenciálom (viď graf č. 7c).

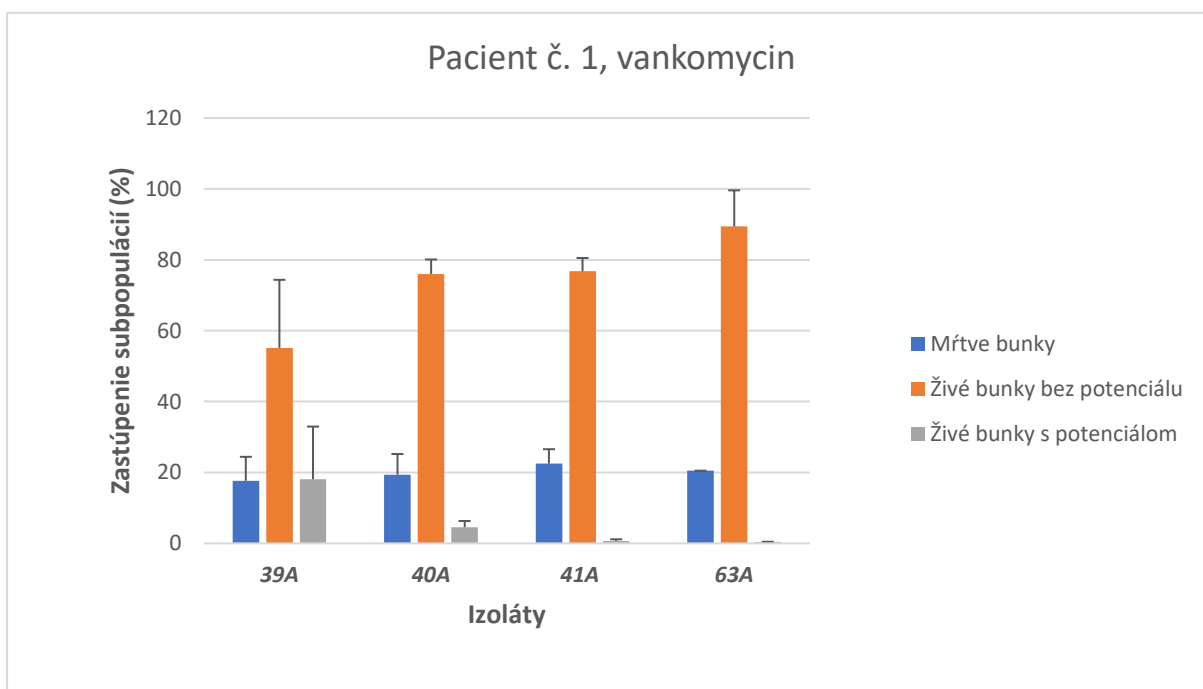
Pre porovnanie subpopulácií medzi chronologickými izolátmi som zvolila čas t_4 , pretože od času $t_1 - t_4$ zastúpenie subpopulácií sa výrazne nemenilo a v čase t_4 sa subpopulácie ustálili. Z vynesenej grafy je možné usúdiť, že na fyziologický stav buniek má skôr väčší vplyv použité antibiotikum ako genetická podstata samotného izolátu. Keď sa porovnajú chronologické izoláty pacienta č. 1 (39A, 40A, 41A a 63A) a pacienta č. 2 (36A, 51A a 75A) môžeme vidieť, že zastúpenie subpopulácií pre jednotlivé antibiotiká sú podobné (viď grafy č. 8a, 8b a 8c). Niektoré adaptačné mutácie izolátov, ako napr. mutácie v Agr systéme, by mohli prispievať k zmene v zastúpení subpopulácií (Valtová 2020). Vytvorením cielených mutantov v Agr systéme by sme mohli dospieť k presnejším záverom vplyvu mutácií v Agr systéme.



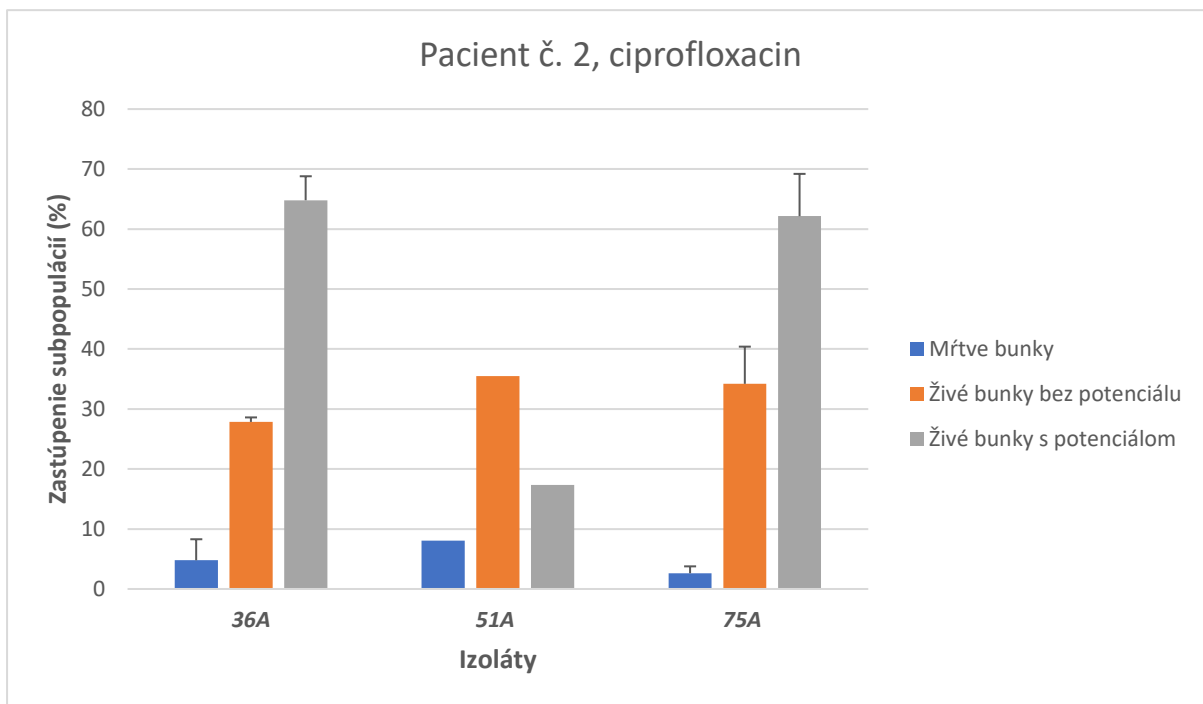
Graf č. 6a: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácii (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC ciprofloxacinu u chronologických izolátov pacienta č. 1. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A). Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A).



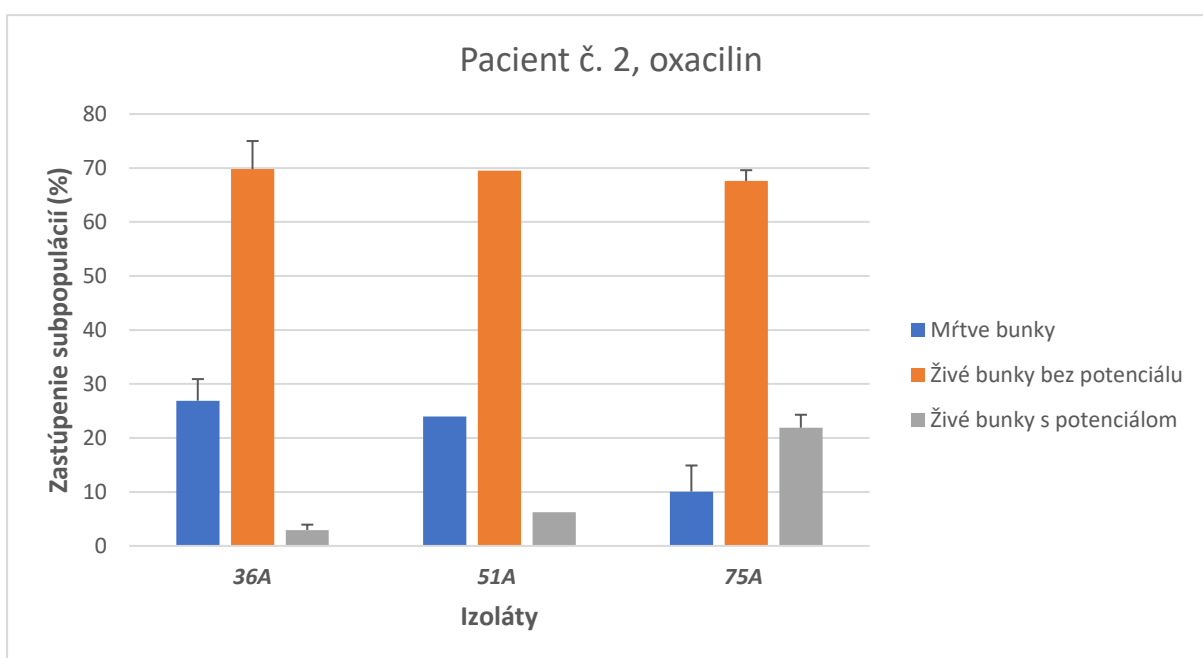
Graf č. 6b: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácii (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC oxacilinu u chronologických izolátov pacienta č. 1. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A). Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A).



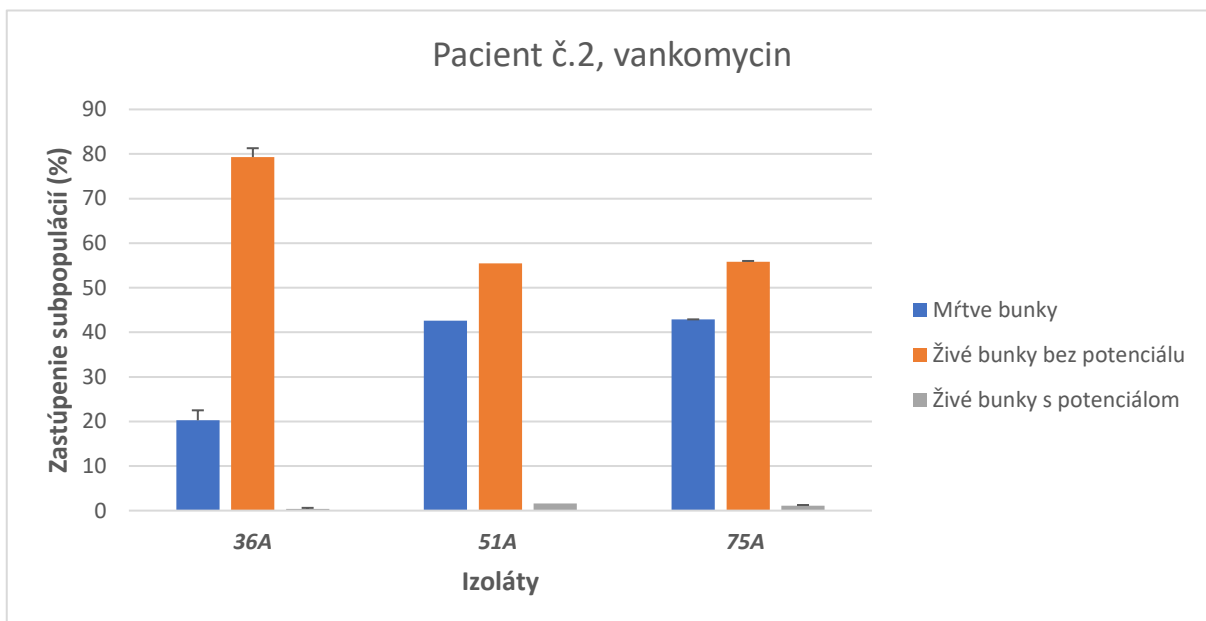
Graf č. 6c: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácii (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC vankomycínu u chronologických izolátov pacienta č. 1. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A). Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A).



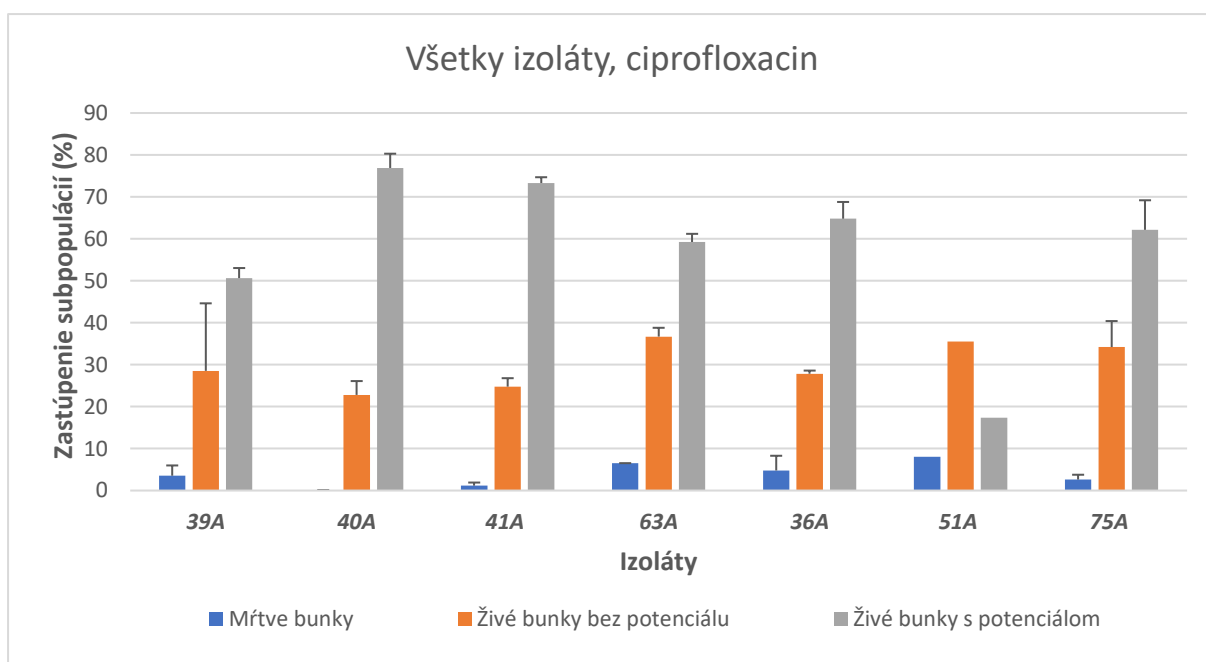
Graf č. 7a: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácii (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu u chronologických izolátov pacienta č. 2. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A). Izolát 51A bol meraný len raz. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A).



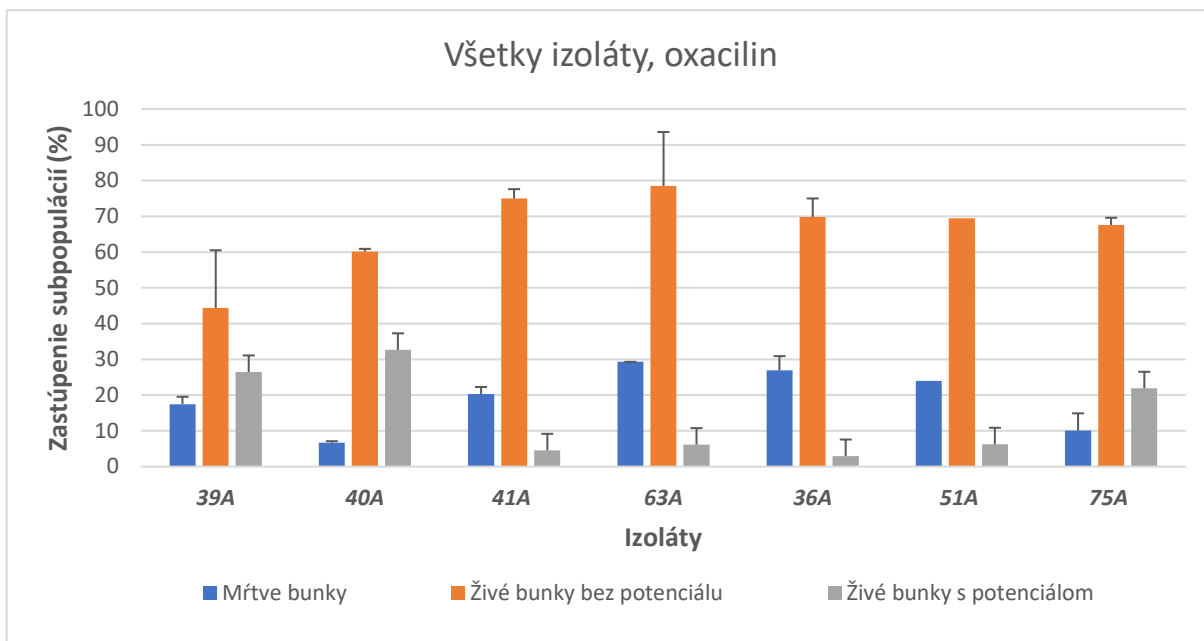
Graf č. 7b: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácii (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC oxacilínu u chronologických izolátov pacienta č. 2. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A). Izolát 51A bol meraný len raz. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A).



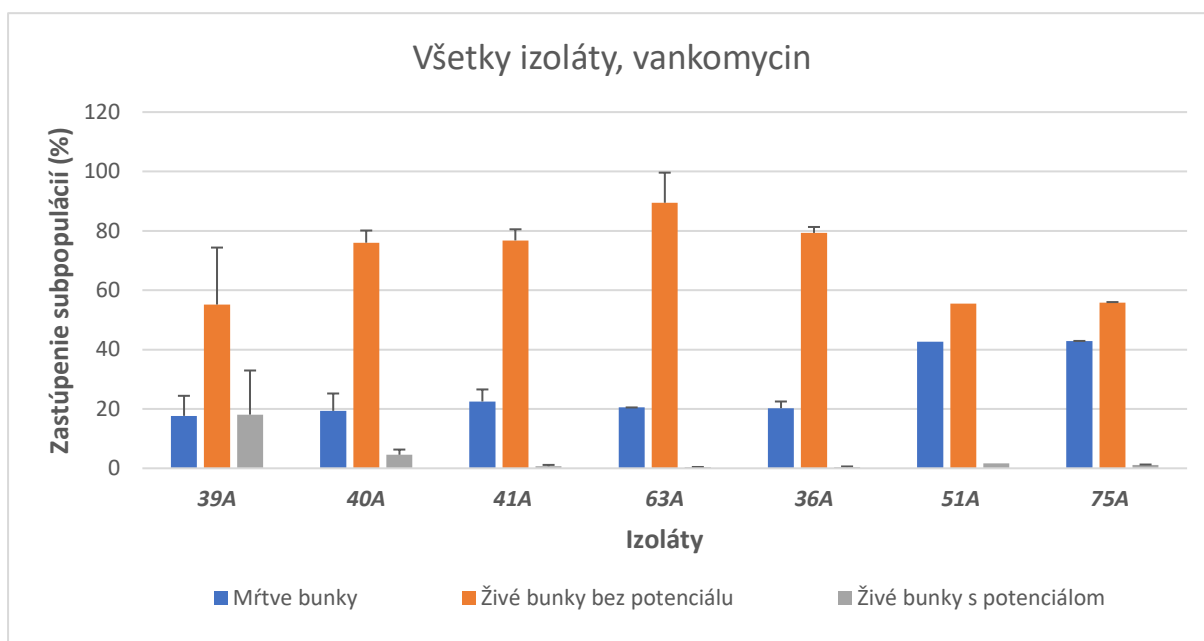
Graf č. 7c: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácií (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC vankomycínu u chronologických izolátov pacienta č. 2. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A). Izolát 51A bol meraný len raz. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A).



Graf č. 8a: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácií (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu u všetkých chronologických izolátov. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A, 36A, 75A). Izolát 51A bol meraný len raz. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov a z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A).



Graf č. 8b: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácii (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC oxacilinu u všetkých chronologických izolátov. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A, 36A, 75A). Izolát 51A bol meraný len raz. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A).

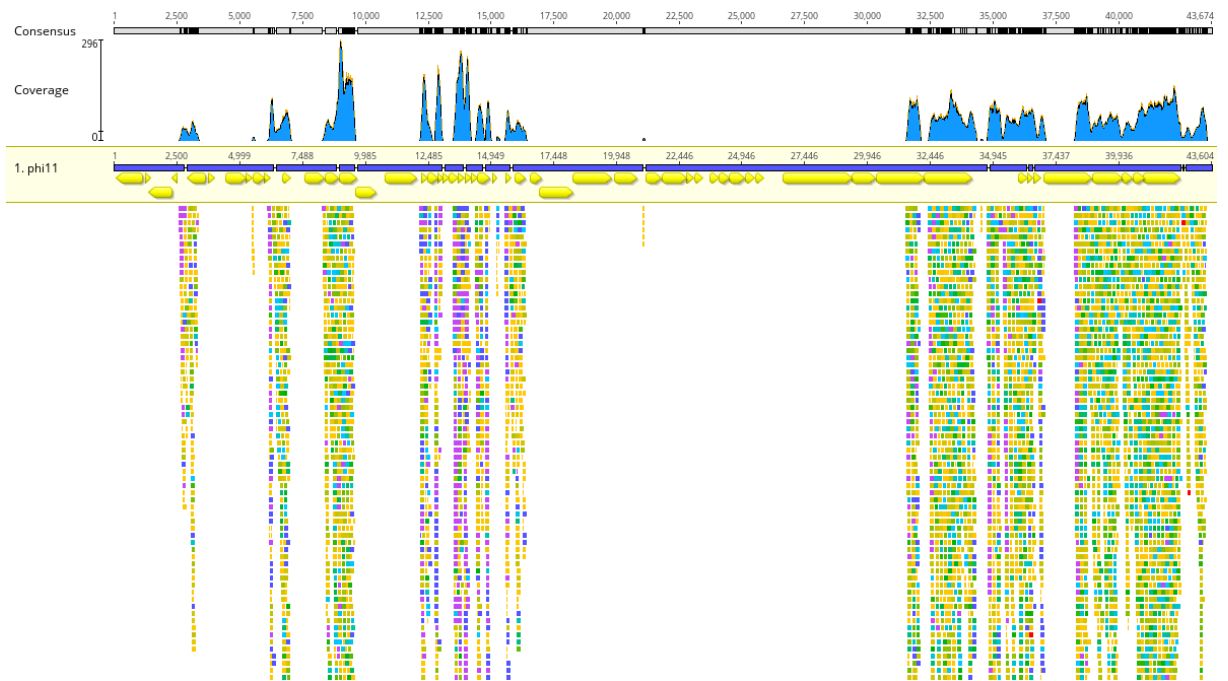


Graf č. 8c: Zastúpenie mŕtvych buniek, buniek bez membránového potenciálu a s membránovým potenciálom v populácii (%) v 4 hodine krivky hynutia po pôsobení 100x MIC vankomycínu u všetkých chronologických izolátov. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (63A, 36A, 75A). Izolát 51A bol meraný len raz. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov (39A, 40A, 41A) a z dvoch biologických duplikátov (36A, 75A).

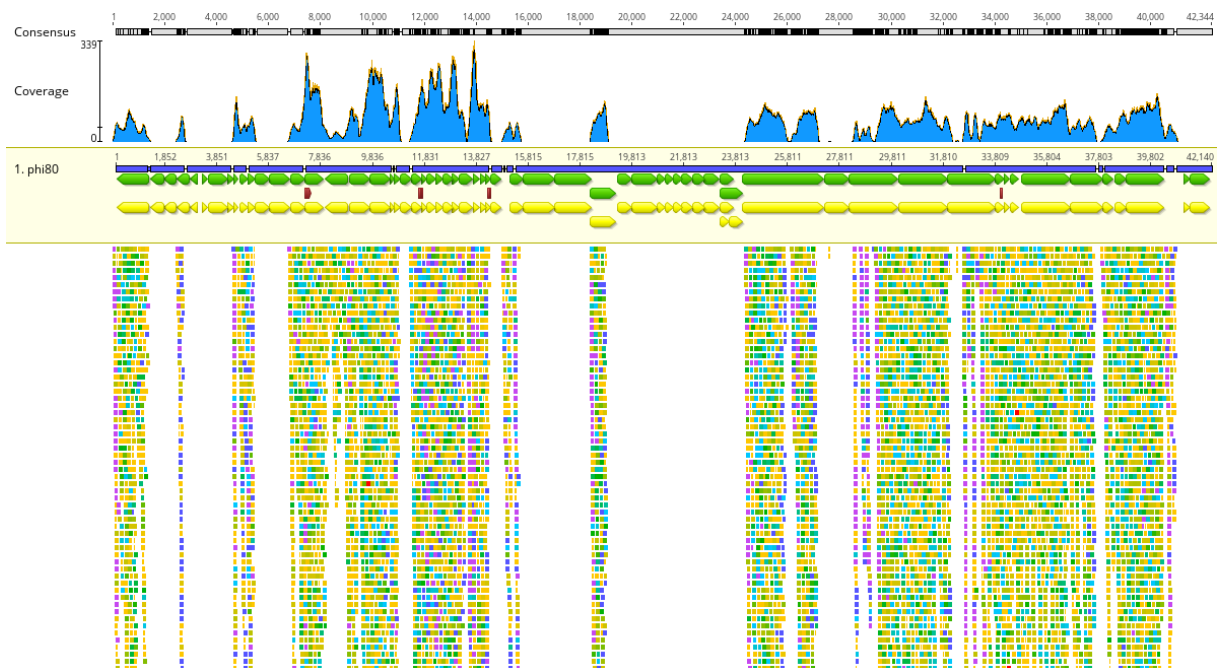
4.4 Vplyv vybraných antibiotík na redoxný potenciál bunky v priebehu kriviek hynutí u jednotlivých chronologických izolátov

Cieľ: Pozorovať vplyv vybraných antibiotík na formovanie subpopulácie produkujúcej GFP (green fluorescent protein) s nižším redoxným potenciálom a túto subpopuláciu kvantifikovať voči bunkám produkujúcim GFP so zachovaným redoxným potenciálom.

Aby som mohla sledovať expresiu génu *sigB* v priebehu jednotlivých časoch kriviek hynutia, do chronologických izolátov pacienta č. 1 (39A, 40A, 41A a 63A) pomocou techniky transdukcie (viď kapitola 3.2.10.17) som vniesla plazmid pCNsigBtet (viď kapitola 3.1.2), ktorý má promótorovú sekvenciu génu *sigB* fúzanú s GFP. Pre techniku transdukcie som zvolila bakteriofága $\phi 80$, ktorý je stafylokokový fág s vysokou transdukčnou efektivitou a nízkou frekvenciou lyzogenie. Plazmid pCNsigBtet som sa pokúsila vnieť pomocou techniky transdukcie aj do chronologických izolátov pacienta č. 2 (36A, 51A a 75A), avšak transdukcia aj po niekoľkých pokusoch nebola úspešná. Pre transdukciu som použila najprv bakteriofága $\phi 80$ a neskôr aj bakteriofága $\phi 11$, avšak ani v jednom prípade sa transdukcia nepodarila. Podľa analýzy sekvencie príslušných izolátov sa potvrdilo, že sa jedná o lyzogény týchto fágov, a preto s vysokou pravdepodobnosťou nebola transdukcia úspešná (viď obrázky č. 14 a č. 15). Výsledky analýzy sekvencie boli poskytnuté RNDr. Jaroslavom Nunvárom, Ph.D. a boli vykonané v BIOCEVU vo Vestci. Nastáva tu aj možnosť, že bakteriofágy a chronologické izoláty majú iný restriktívno – modifikačný systém a plazmid je v bakteriálnych bunkách degradovaný.



Obrázok č. 14: Analýza sekvencie izolátu 36A a bakteriofága $\phi 11$. Z analýzy môžeme vidieť, že sa jedná o lyzogéniu tohto fága u izolátu 36A.



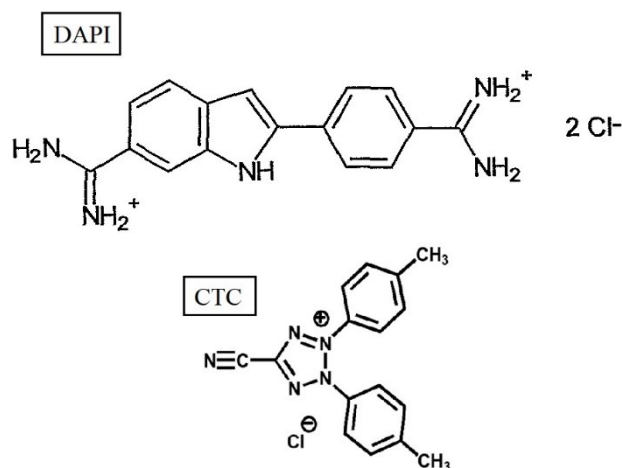
Obrázok č. 15: Analýza sekvencie izolátu 36A a bakteriofága $\phi 80$. Z analýzy môžeme vidieť, že sa jedná o lyzogéniu tohto fága u izolátu 36A.

V tomto experimente som analyzovala len chronologické izoláty *S. aureus* pacienta č. 1 (39A, 40a, 41A a 63A). V jednotlivých časoch kriviek hynutia – 1, 2, 3 a 4 hodiny (v niektorých prípadoch sa štvrtá hodina nepodarila namerať na prietokovom cytometri) od pridania antibiotika ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu som bunky odoberala, centrifugovala

a resuspendovala v PBS. Potom som ich podľa návodu zafarbila a zmerala (postup a podmienky merania vid' kapitola 3.2.7). Meranie sa uskutočnili buď v biologickom triplikáte, duplikáte alebo ako jedno meranie.

Fluorescenčné farbivo DioC₂(3) som v tomto experimente nemohla použiť, nakoľko súčasné meranie s GFP nie je možné. Pre pozorovanie životaschopných, respiračne aktívnych buniek som preto použila fluorescenčné farby 5-kyano-2,3-ditolyltetrazóniumchlorid (CTC) a 4,6-diamidino-2-fenyl indol (DAPI). CTC je slabo lipofilný kation, preto je pre membránu priepustná. Jej silná amfifilita ju udržiava v plazmatickej membráne. Zdravé bunky dýchajúce prostredníctvom elektrónového transportného systému absorbujú a redukujú CTC na nerozpustný červený fluorescenčný produkt, formazan. Bunky, ktoré nedýchajú alebo dýchajú s nižšou frekvenciou redukujú menšie množstvo CTC, a tým pádom produkujú menšie množstvo formazanu (BacLight™ RedoxSensor™ CTC Vitality Kit 2005; Horobin et al. 2013; Stockert et. al 2018). DNA špecifická sonda DAPI sa viaže do AT bohatých oblastí malého žliabku DNA. Farbí akýkoľvek typ buniek, ktoré obsahujú DNA. Odumreté bunky obsahujú len nepatrné množstvo DNA, preto je možné vďaka fluorescenčnej farbe DAPI odstrániť nešpecificky zafarbené odumreté bunky. Táto farba však nie je schopná rozlíšiť aktívne a neaktívne bakteriálne bunky (Kapuscinski 1995; Créach et al. 2002). Pomocou fluorescenčnej farby CTC sa mi podarilo rozlíšiť subpopuláciu buniek produkujúce GFP, a tým identifikovať bunky exprimujúce z promótoru pre *sigB*, ktoré stratili redoxný potenciál. Fluorescenčná farba DAPI mi čiastočne umožnila rozlíšenie medzi odumretými bunkami a živými bunkami. Avšak vďaka rôznym bakteriálnym transportným systémom sa dostávala aj do odumretých buniek, alebo farbila DNA i buniek s aktívnym redoxným potenciálom. Bunky akumulujúce DAPI som preto nevyhodnocovala.

Vynesenie zelenej fluorescence voči červenej fluorescence mi umožnila rozlíšiť štyri subpopulácie – bunky neprodujúce GFP a respirujúce, bunky neprodujúce GFP a nerespirujúce, bunky produkujúce GFP a respirujúce a nakoniec bunky produkujúce GFP a nerespirujúce. V tomto vynesení som rozdelila bunky do štyroch subpopulácií pre časy $t_1 - t_3$ (t_4) po pridaní antibiotík ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu.



Obrázok č. 16: Chemická štruktúra molekúl DAPI a CTC, ktoré som použila pri meraní redoxného potenciálu buniek na prietokovom cytometri (upravené a prevzaté z Kapuscinski 1995; Stockert 2018).

Pre rozlíšenie som si pripravila kontrolné vzorky. Celkom som si pre každý izolát v čase t_0 pripravila 3 kontroly – mŕtve bunky (pridanie 60 μ l 96% ethanolu), bunky so skratovaným membránovým potenciálom ale s neporušenou membránou (pridanie 500 μ M CCCP – ničí membránový potenciál odstránením protónového gradientu) a nefarbené bunky bez pridania antibiotika. Ako ďalšie som pre identifikáciu signálu GFP pripravila bunky bez plazmidu.

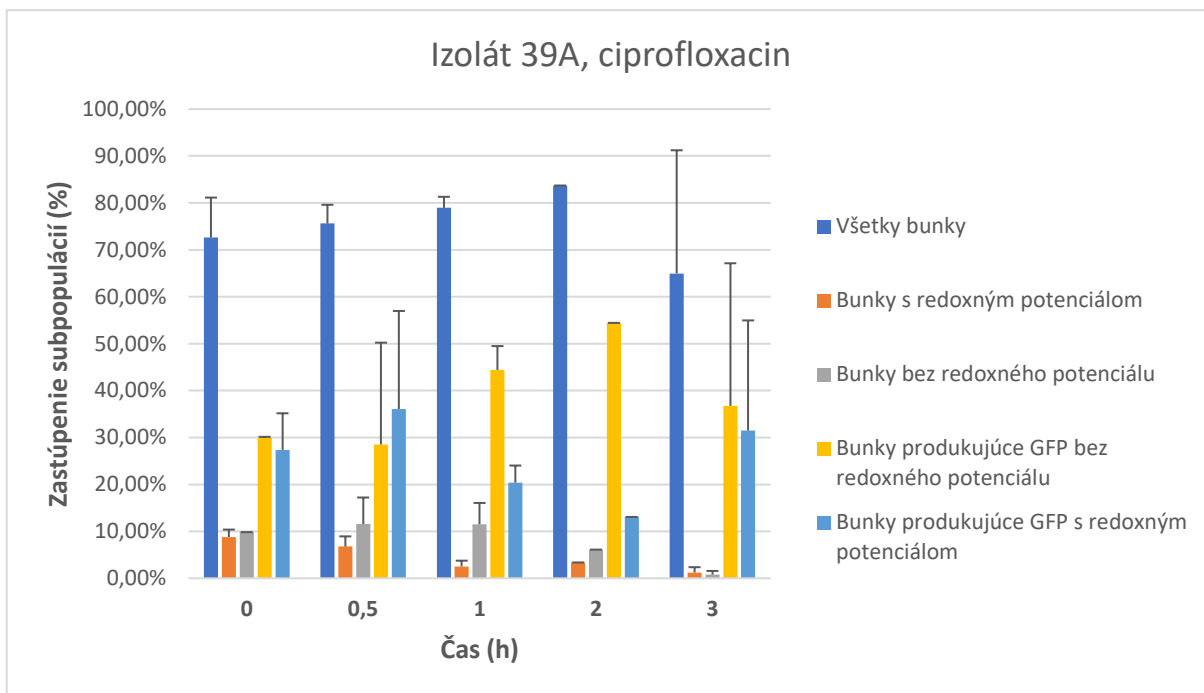
Výsledky som vyhodnocovala v programe Cytexpert. Vynesením FSC voči SSC som vhodne odlíšila subpopuláciu buniek od zvyškov membrán a proteínov, aby som v nesledujúcich vyneseniach testovala len bunky. Bunky som následne analyzovala vo vnesení zelená fluorescencia voči červenej fluorescencii. Aby som mohla sledovať ako sa menilo zastúpenie subpopulácií buniek v čase, a ako sa toto zastúpenie líši medzi chronologickými izolátmi, vložila som výsledky do grafov (viď grafy č. 9a – 9d, 10a – 10d, 11a – 11d).

Môžeme vidieť, že u všetkých chronologických izolátov pacienta č. 1 (39A, 40A, 41A a 63A) prevláda subpopulácia buniek, ktoré produkujú GFP, čo naznačuje tomu, že gén *sigB* je exprimovaný v každom izoláte. Po pôsobení ciprofloxacínu po 30 minútach odberu vzoriek subpopulácia buniek produkujúce GFP respirujúce a nerespirujúce sú skoro rovnako zastúpené (viď grafy č. 9a – 9d), u izolátu 63A dokonca prevláda subpopulácia buniek produkujúce GFP a respirujúce (viď graf č. 9d). Po 30 minútach však subpopulácia buniek produkujúce GFP a respirujúce klesá a prevláda subpopulácia buniek produkujúce GFP a nerespirujúce (viď

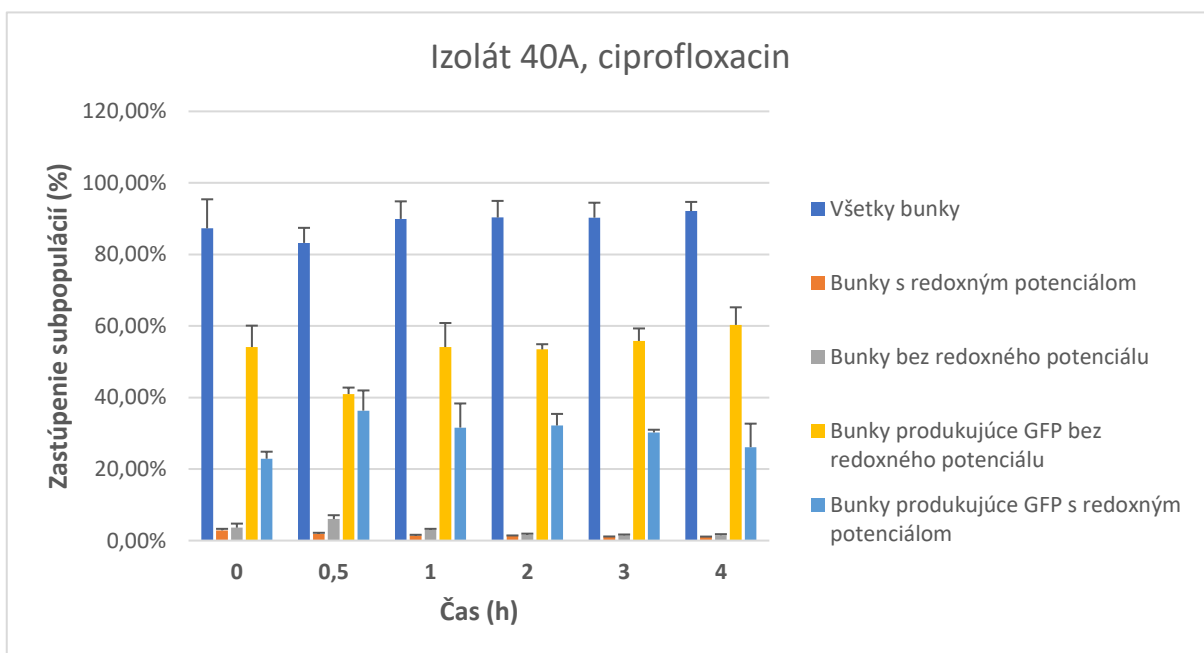
grafy č. 9a – 9d). Jedine u izolátu 41A aj po 30 minútach prevláda subpopulácia buniek produkujúce GFP a respirujúce (viď graf č. 9c).

V prípade pôsobenia oxacilínu a vankomycínu, čo sú antibiotiká pôsobiace na bunkovú stenu došlo k strate redoxného potenciálu už po 30 minútach odberu a tento pomer sa už významne nemenil po celú dobu experimentu. U izolátoch 39A, 40A a 41A po 30 minútach v niektorých prípadoch aj po 1 hodine prevládala alebo bola skoro rovnako zastúpená subpopulácia buniek neprodukujúce GFP a nerespirujúce (viď grafy č. 10a, 10b, 10c, 11a, 11b, 11c). Všetky chronologické izoláty po pôsobení týchto antibiotík mali väčšie zastúpenie buniek produkujúce GFP a nerespirujúce ako bunky produkujúce GFP a respirujúce (viď grafy č. 10a – 10d, 11a – 11d).

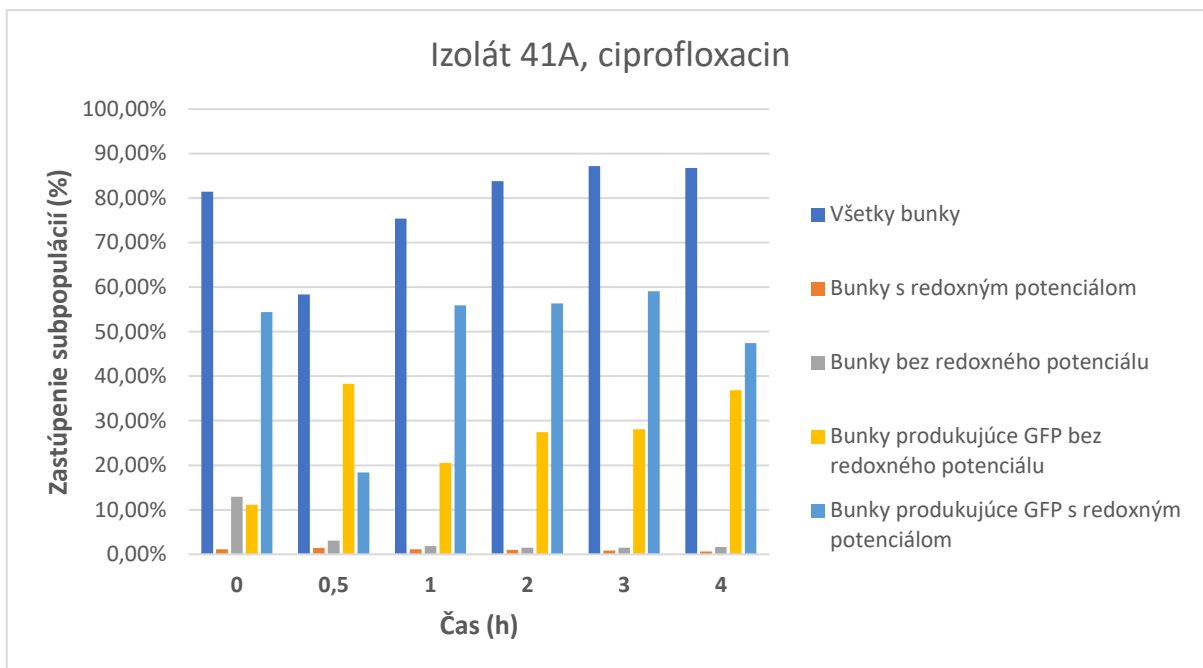
Z vynesných grafov môžeme usúdiť, že životaschopnosť, redoxný potenciál bunky istým spôsobom koreluje s membránovým potenciálom bunky. U antibiotika ciprofloxacínu môžeme pozorovať zachovaný membránový potenciál u väčšiny buniek v priebehu času, avšak pri redoxnom potenciály dochádza k poklesu a odstupom času prevládajú bunky bez redoxného potenciálu. Redoxný potenciál bunky nám hovorí viac o životaschopnosti bunky. K presnejším záverom by bolo určite potrebné zvoliť inú fluorescenčnú farbu na rozlíšenie odumretých a živých buniek namiesto DAPI, vykonať viac meraní alebo pozorovať ďalšie metabolické aktivity buniek.



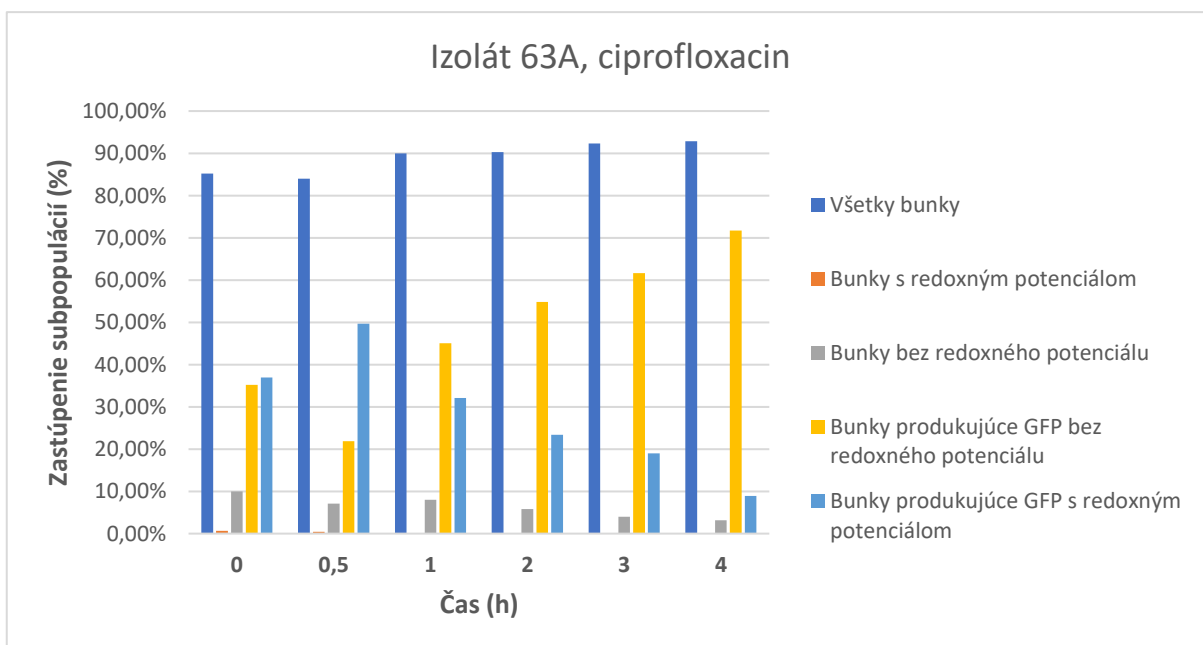
Graf č. 9a: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácii (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2; 3 hodiny) po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu u izolátu 39A. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov.



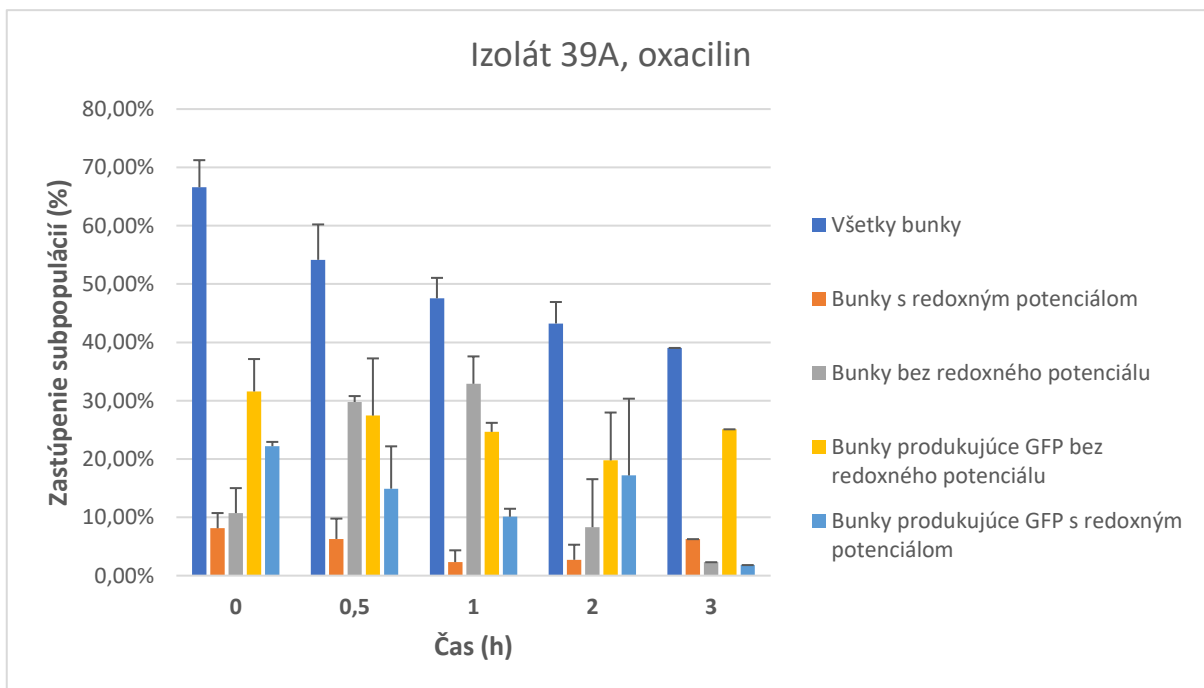
Graf č. 9b: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácii (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 hodiny) po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu u izolátu 40A. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov.



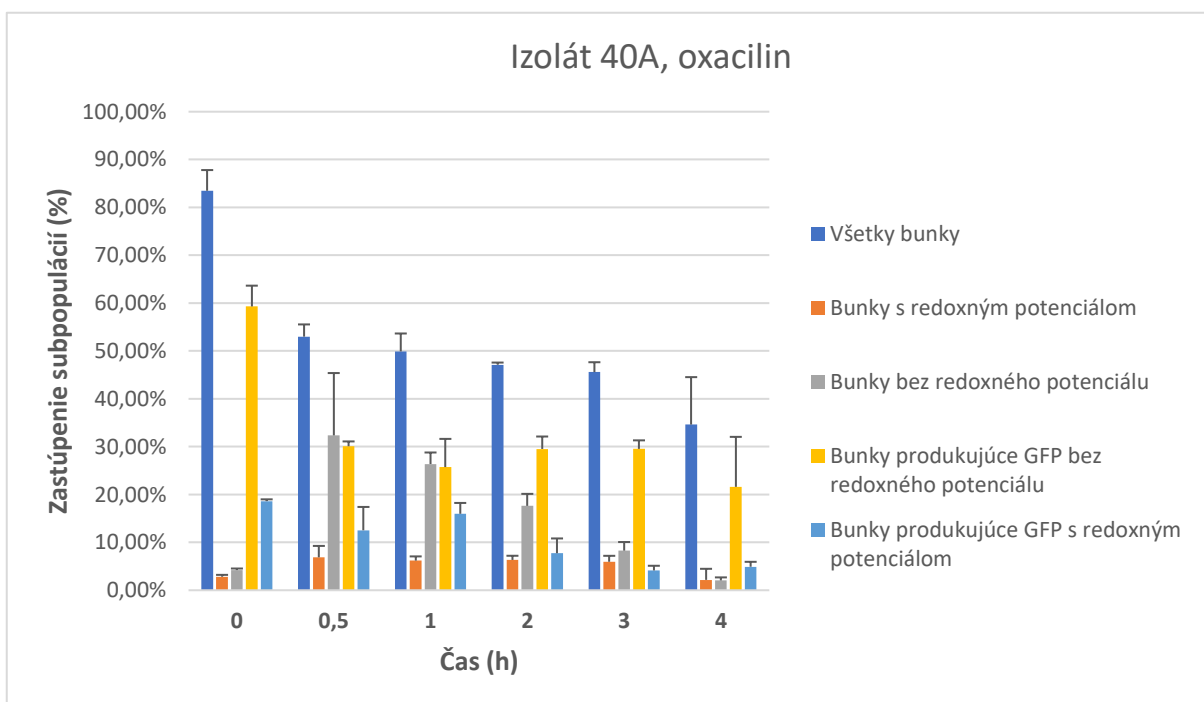
Graf č. 9c: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácii (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2 ; 3, 4 hodiny) po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu u izolátu 41A. Vynesené hodnoty sú z jedného biologického replikátu.



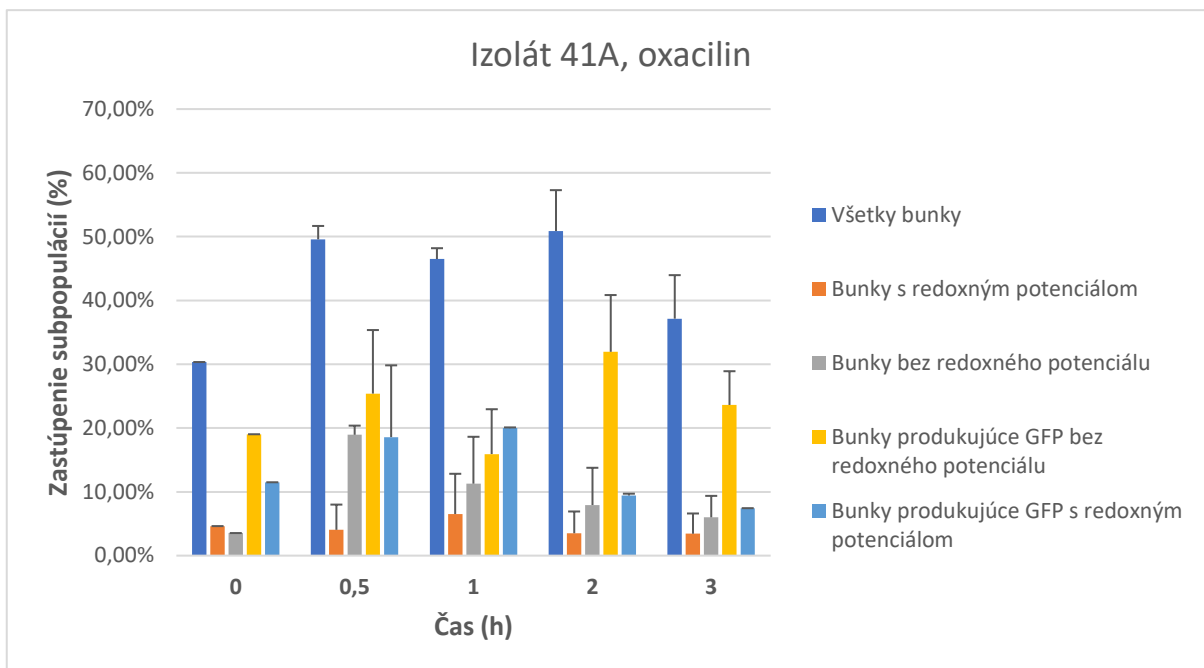
Graf č. 9d: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácii (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2 ; 3, 4 hodiny) po pôsobení 100x MIC ciprofloxacínu u izolátu 63A. Vynesené hodnoty pochádzajú z jedného biologického replikátu.



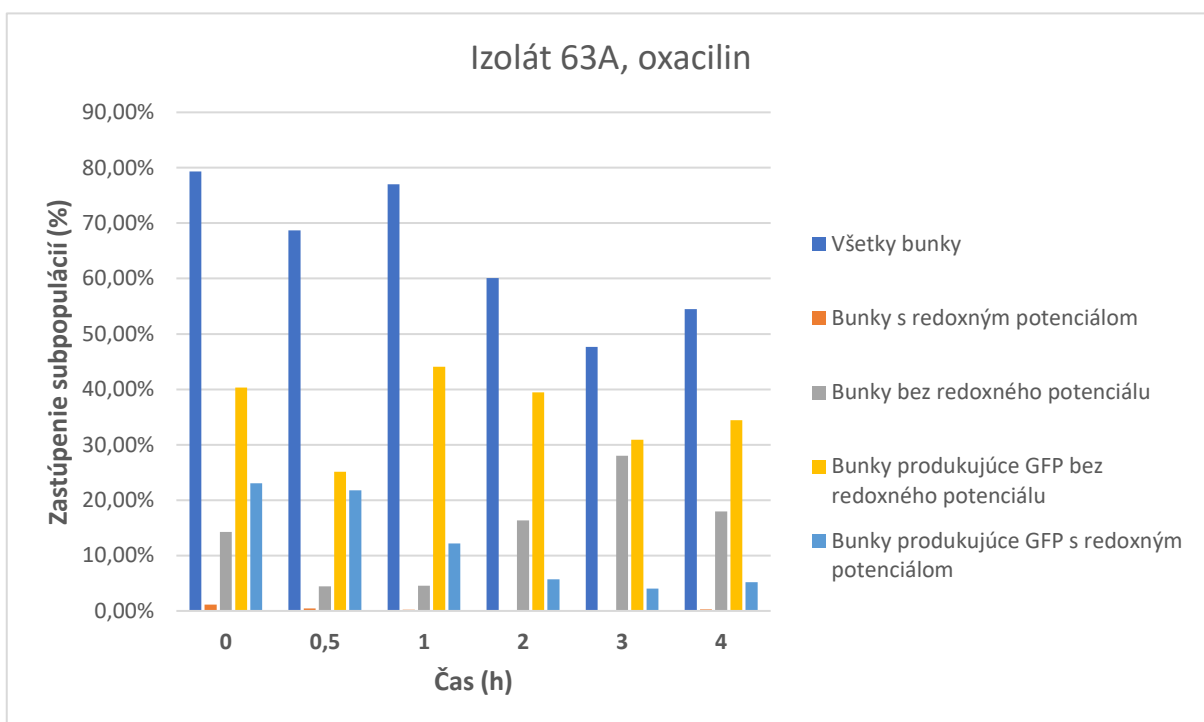
Graf č. 10a: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácii (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2 ; 3 hodiny) po pôsobení 100x MIC oxacilinu u izolátu 39A. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov.



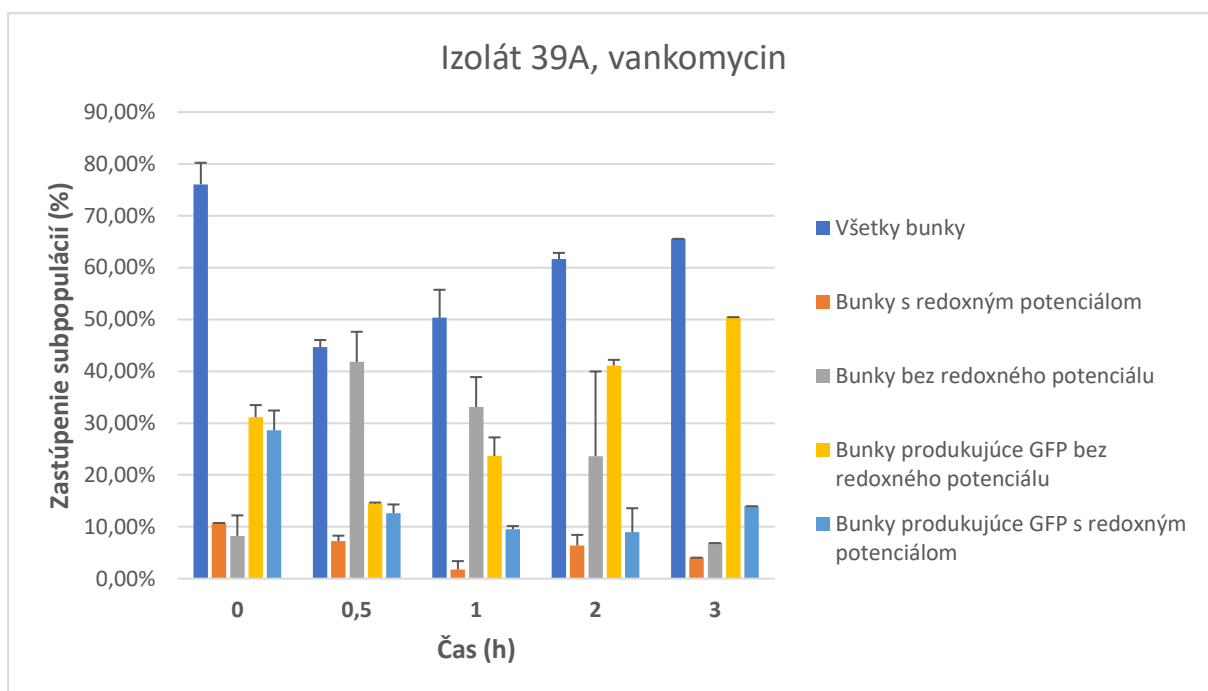
Graf č. 10b: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácii (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2 ; 3, 4 hodiny) po pôsobení 100x MIC oxacilinu u izolátu 40A. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov.



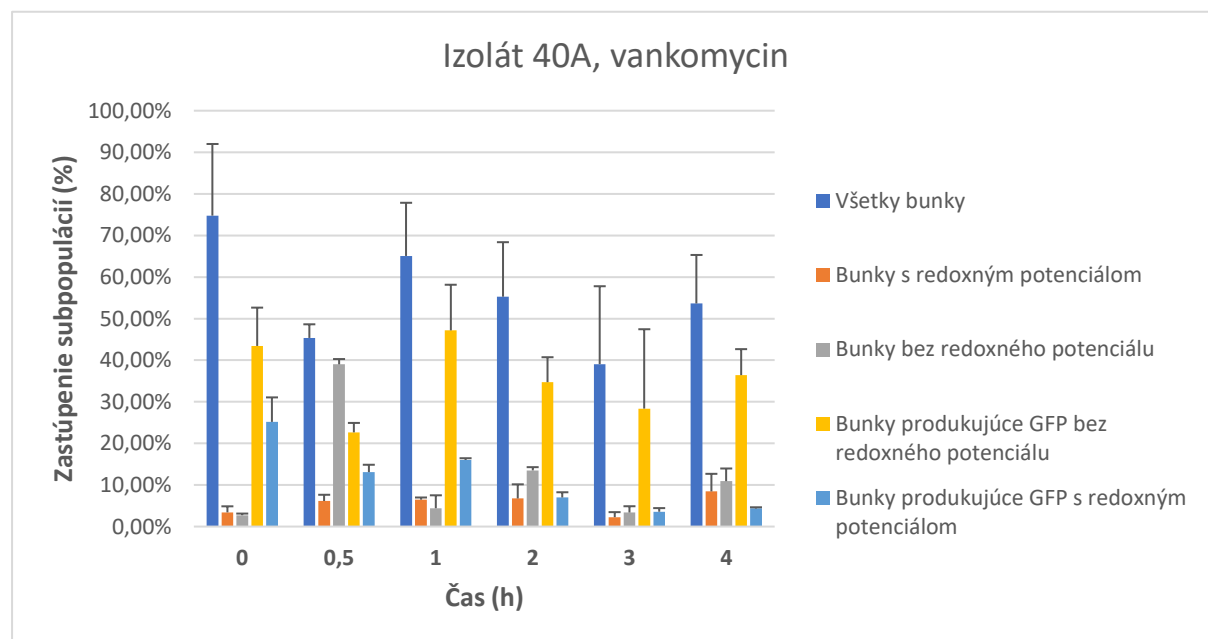
Graf č. 10c: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácií (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2 ; 3 hodiny) po pôsobení 100x MIC oxacilinu u izolátu 41A. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov.



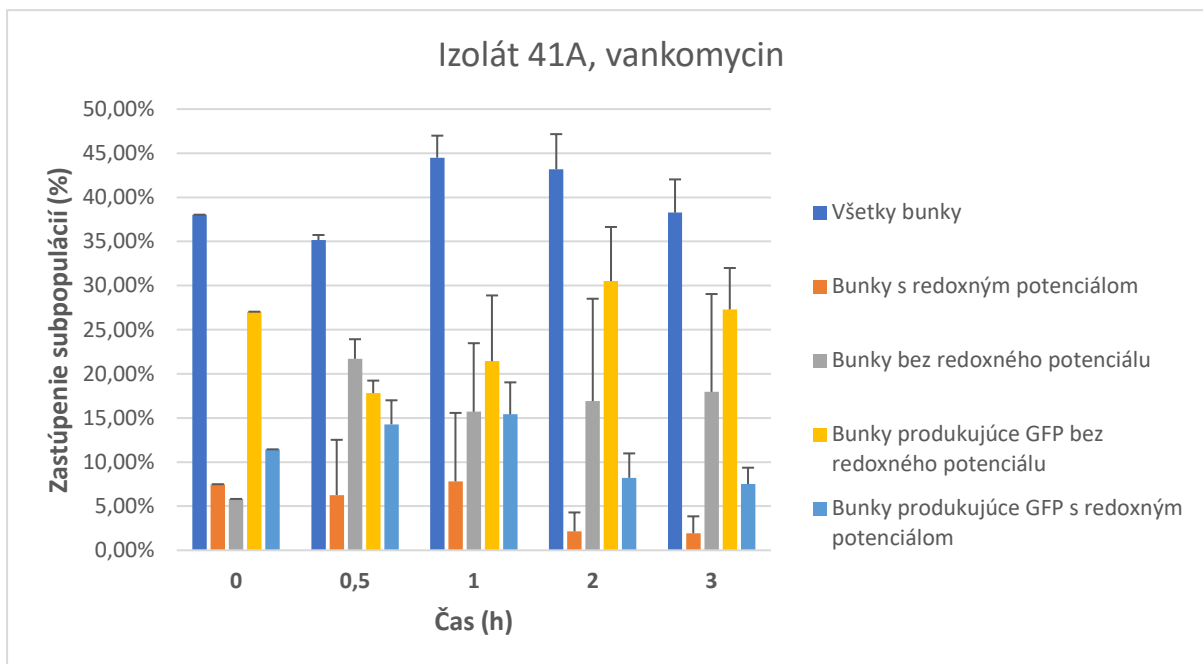
Graf č. 10d: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácií (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2 ; 3, 4 hodiny) po pôsobení 100x MIC oxacilinu u izolátu 63A. Vynesené hodnoty pochádzajú z jedného merania.



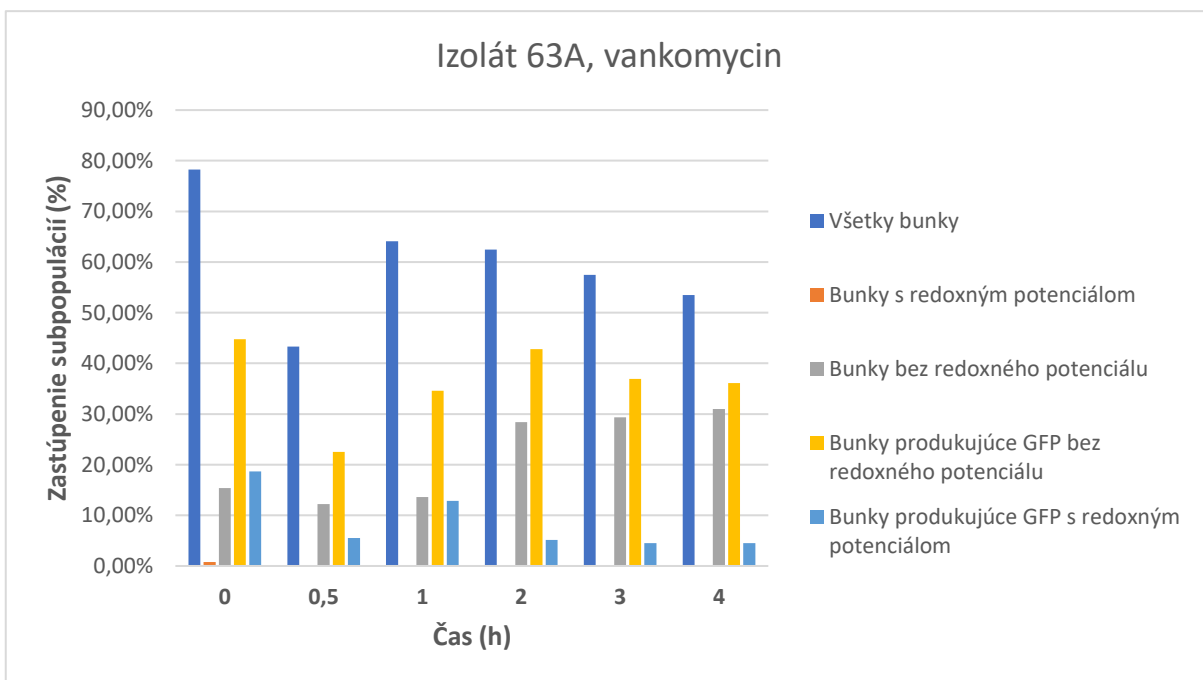
Graf č. 11a: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácií (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2; 3 hodiny) po pôsobení 100x MIC vankomycinu u izolátu 39A. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov.



Graf č. 11b: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácií (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 hodiny) po pôsobení 100x MIC vankomycinu u izolátu 40A. Vynesené hodnoty sú priemerom z troch biologických replikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z troch biologických replikátov.



Graf č. 11c: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácií (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2; 3 hodiny) po pôsobení 100x MIC vankomycinu u izolátu 41A. Vynesené hodnoty sú priemerom z dvoch biologických duplikátov. Chybové úsečky ukazujú štandardnú odchýlku z dvoch biologických duplikátov.



Graf č. 11d: Zastúpenie respirujúcich buniek, nerespirujúcich buniek, buniek produkujúce GFP a nerespirujúce, buniek produkujúce GFP a respirujúce v populácií (%) v priebehu času krivky hynutia (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 hodiny) po pôsobení 100x MIC vankomycinu u izolátu 63A. Vynesené hodnoty pochádzajú z jedného merania.

4.5 Stanovenie expresie génov *sigB*, *mazEF*, *agrA* a *rnaIII* pomocou metódy RT qPCR u chronologických izolátov pacienta č. 1

Cieľ: Posúdiť v akej miere sú exprimované gény *sigB*, *mazEF*, *agrA* a *rnaIII* v priebehu krivky hynutia.

Pre určenie mieru expresie génov nášho záujmu v priebehu krivky hynutia som vyizolovala RNA pred pridaním antibiotík a v časoch 30 minút a 3 hodiny po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu a následne som ju previedla na cDNA pomocou reverznej transkripcie (viď kapitola 3.2.11.2). Koncentráciu cDNA som zmerala na NanoDrope (viď tabuľka č. 6), ktorý taktiež overil čistotu izolovanej RNA a cDNA jednotlivých vzoriek. Vo všetkých prípadoch bolo znečistenie zanedbateľné. Tento pokus vychádza len z jedného biologického replikátu.

Izolát	Čas	Koncentrácia cDNA (ng/μl) (ciprofloxacín)	Koncentrácia cDNA (ng/μl) (oxacilín)	Koncentrácia cDNA (ng/μl) (vankomycín)
39A	0 minút	952,8 (kontrola)		
	30 minút	989,9	1041,2	744,2
	3 hodiny	810,4	826,9	808,2
40A	0 minút	800,6 (kontrola)		
	30 minút	765	763,9	759,2
	3 hodiny	818,3	788,2	761,6
41A	0 minút	746 (kontrola)		
	30 minút	787,5	797,5	727,1
	3 hodiny	710,2	885,9	875,4

Tabuľka č. 6: Koncentrácia prevedenej cDNA v jednotlivých časoch odberu po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu.

Pretože sa hodnoty koncentrácie cDNA v jednotlivých vzorkách aj časoch líšili (viď tabuľka č. 6), musela som pristúpiť k vhodnému nariadeniu cDNA na rovnakú hodnotu koncentrácie celkovej cDNA. Koncentrácia z ktorej som vychádzala bola tá s najmenšou hodnotou (41A čas 3 hodiny pre ciprofloxacín, $c = 710,2$ ng/μl) a zostávajúce vzorky som vhodne nariadila. Následne som do každej jamky pridala 5 μl vhodne nariadenej cDNA, ako je uvedené v protokole (viď kapitola 3.2.11.3).

So získanou cDNA a príslušnými primermi som vykonala samotnú kvantifikáciu jednotlivých transkriptov metódou RT qPCR na prístroji LightCycler 480. Pre odhalenie chyby v pipetovaní som na doštičku vyniesla vždy dva technické duplikáty, keď sa tieto dve hodnoty od seba líšili o viac než 0,5 hodnoty C_t , nezapočítala som ich do priemeru. Pre samotnú RT qPCR som použila Luna® Universal qPCR Master Mix. Tento mix obsahuje Hot Start *Taq* DNA polymerázu, modré farbivo pre kontrolu pridania mixu a hlavne fluorofor, ktorý sa viaže do malého žliabku dsDNA a je odvodený od SYBR® green I a patentovo chránený. Po väzbe fluoroforu do malého žliabku dsDNA fluorescencia výrazne vzrastie. Cyklus v ktorom fluorescencia pretnie prah pozadia, sa nazýva cyklus prahu (cycle of treshold, C_t) a je možné podľa neho určiť množstvo transkriptu vo vzorke. Hodnoty C_t som získala pomocou programu LightCycler 480 Software, ktorý túto hodnotu vypočítava automaticky.

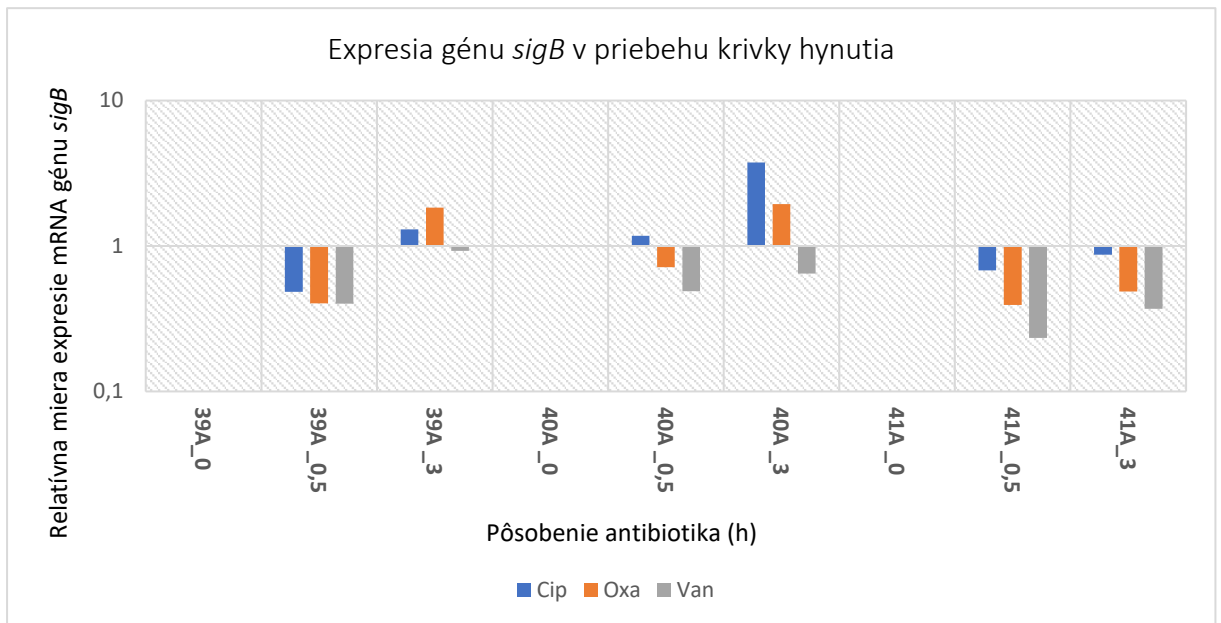
Pre zistenie efektivity reakcie som pre každý gén vytvorila riediacu radu so znižujúcou sa koncentráciou DNA (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) a pre výpočet efektivity reakcie som použila matematický vzorec vychádzajúci z publikácie z roku 2001 (Pfaffl 2001). Najprv som z hodnôt priemernej C_t pre štandardnú krivku v závislosti na prirodzenom logaritmu z množstva cDNA v riediacej rade ($\ln(\text{cDNA})$) zostavila priamku, z jej smernice som vypočítala účinnosť reakcie (efektivitu, E_f):

$$E_f = 10^{-\frac{1}{\text{smernica}}}$$

kde E_f je účinnosť, ktorej hodnoty by mali dosahovať do hodnoty 2 (pri 100 % účinnosti), v mojom prípade pre každý gén bola v rozmedzí 1,8 – 2. Pomocou účinnosti som následne vypočítala mieru expresie sledovaných génov (*sigB*, *mazEF*, *agrA*, *rnaIII*), ktoré boli porovnávané s mierou expresie referenčného génu pre gyrázu (*gyrB*). Výpočet relatívnej miery expresie cieľového génu (R) po pridaní antibiotík ku kultúre (vzorke) som vykonala $\Delta\Delta$ kvantifikáciu podľa vzorca (Pfaffl 2001):

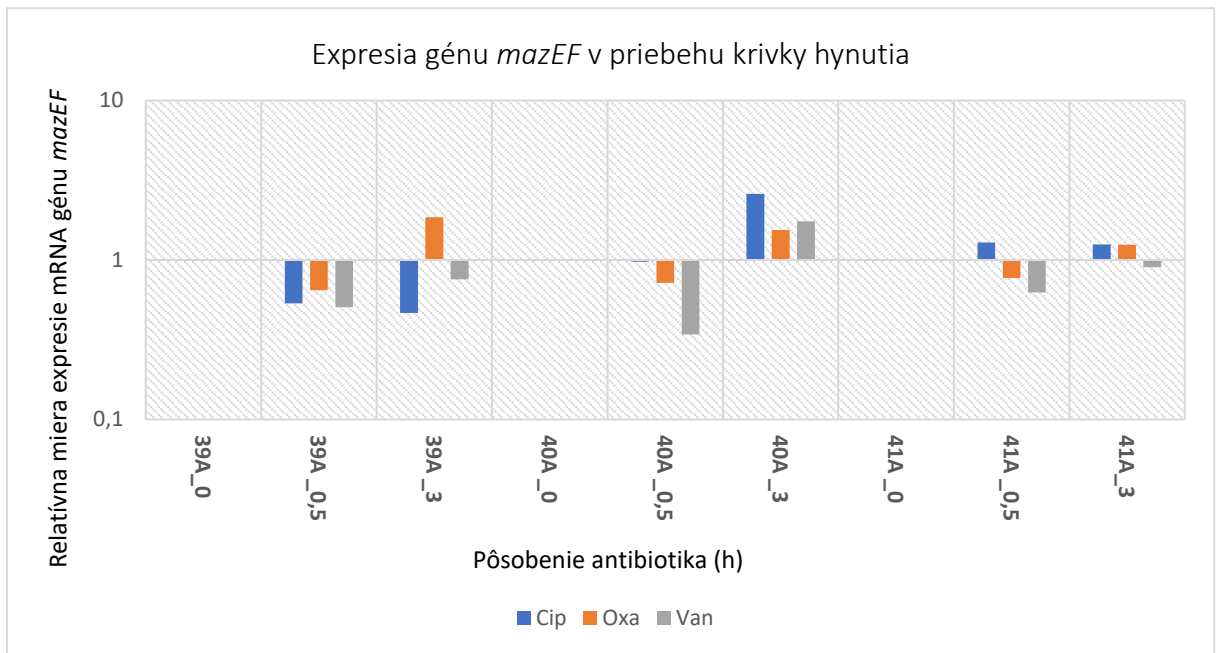
$$R = \frac{E_{f(\text{cieľový gén})}^{\Delta C_{t(\text{cieľový gén})}(\text{kontrola-vzorka})}}{E_{f(\text{referenčný gén})}^{\Delta C_{t(\text{referenčný gén})}(\text{kontrola-vzorka})}}$$

Aby som mohla porovnať, ako sa mení expresia génov nášho záujmu v rámci chronologických izolátov a aký vplyv majú na expresiu jednotlivé antibiotiká a ich doba pôsobenia, vyniesla som vypočítanú relatívnu expresiu do grafov pre každý gén zvlášť (viď grafy č. 12, 13, 14 a 15).



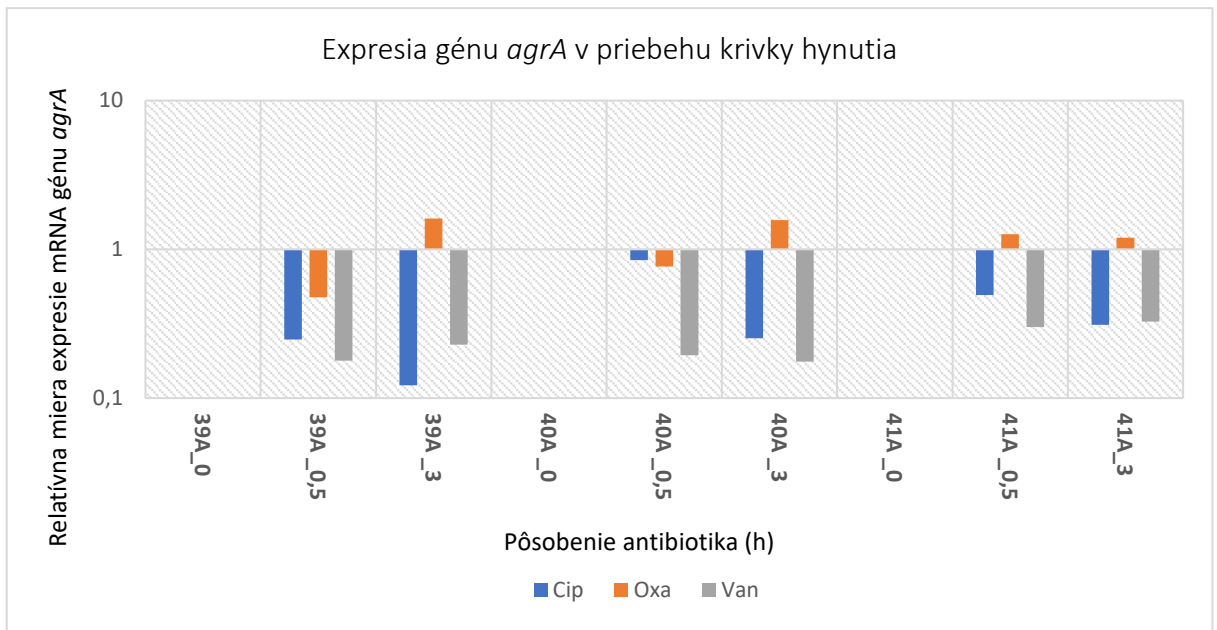
Graf č. 12: Relatívna miera expresie génu *sigB* u chronologických izolátov pacienta č. 1 v časoch 0, 30 minút a 3 hodiny po pôsobení antibiotík ciprofloxacinu (Cip, modrá), oxacilínu (Oxa, oranžová) a vankomycínu (Van, sivá). Hladina mRNA je normalizovaná vzhľadom ku kontrolným vzorkám v čase t_0 (kultúra bez antibiotika).

Z grafu ukazujúci expresiu génu *sigB* je možné vidieť, že je najviac exprimovaný u izolátu 40A a to hlavne po troch hodinách pôsobenia ciprofloxacinu, ale zvýšená miera expresie sa zaznamenala aj po troch hodinách pôsobenia oxacilínu. Menšia expresia génu *sigB* sa zaznamenala aj pri primoizolátu 39A po troch hodinách pôsobenia ciprofloxacinu a oxacilínu. Zaujímavé je, že izolát 41A, ktorý bol oproti primoizolátu izolovaný s najväčším odstupom času vykazuje najmenšiu mieru expresie génu *sigB*. Pôsobenie antibiotika vankomycín ani u jedného izolátu nenavodilo vyššiu mieru expresie tohto génu.



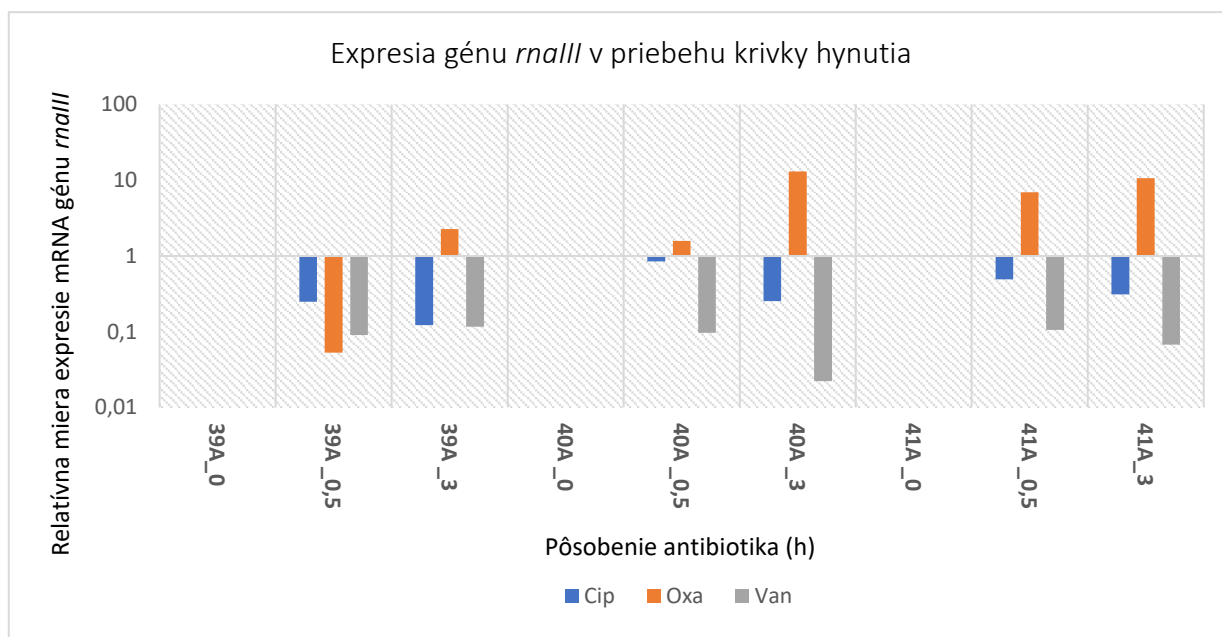
Graf č. 13: Relatívna miera expresie génu *mazEF* u chronologických izolátov pacienta č. 1 v časoch 0, 30 minút a 3 hodiny po pôsobení antibiotík ciprofloxacinu (Cip, modrá), oxacilinu (Oxa, oranžová) a vankomycínu (Van, sivá). Hladina mRNA je normalizovaná vzhľadom ku kontrolným vzorkám v čase t_0 (kultúra bez antibiotika).

Z grafu ukazujúci relatívnu mieru expresie génu *mazEF* môžeme usúdiť, že tak ako pri géne *sigB* tak aj u génu *mazEF* je najväčšia miera expresie u izolátu 40A a to v čase troch hodín. Zvýšenú expresiu tohto génu môžeme zaznamenať aj u izolátu 39A po troch hodinách pôsobenia oxacilinu ako aj u izolátu 41A po 30 minútach a troch hodinách pôsobenia ciprofloxacinu ako aj oxacilinu v tretej hodine.



Graf č. 14: Relatívna miera expresie génu *agrA* u chronologických izolátov pacienta č. 1 v časoch 0, 30 minút a 3 hodiny po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu (Cip, modrá), oxacilínu (Oxa, oranžová) a vankomycínu (Van, sivá). Hladina mRNA je normalizovaná vzhľadom ku kontrolným vzorkám v čase t_0 (kultúra bez antibiotika).

V grafu pre relatívnu expresiu génu *agrA* je možné vidieť, že expresia je skoro až 10 násobne nižšia oproti kontrolnému stavu a to hlavne po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu a oxacilínu. Mierny nárast expresie oproti kontrolnému stavu vykazujú všetky tri izoláty a to v čase tri hodiny po pôsobení oxacilínu. U izolátu 41A je mierny nárast expresie oproti kontrolnému stavu aj po 30 minútach pôsobenia oxacilínu. V prípade tohto génu je expresia skôr utlmená ako by dochádzalo k nadprodukcii produktu tohto génu.



Graf č. 15: Relatívna miera expresie génu *rnaIII* u chronologických izolátov pacienta č. 1 v časoch 0, 30 minút a 3 hodiny po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu (Cip, modrá), oxacilínu (Oxa, oranžová) a vankomycínu (Van, sivá). Hladina mRNA je normalizovaná vzhľadom ku kontrolným vzorkám v čase t_0 (kultúra bez antibiotika).

V grafu zobrazujúcom mieru expresie génu *rnaIII* je možné vidieť, že po pôsobení antibiotika oxacilínu v čase troch hodín u izolátov 40A a 41A miera expresie sa zvýšila až 10 násobne oproti kontrolnému stavu. Vysokú mieru expresie môžeme zaznamenať aj po 30 minútach pôsobenia oxacilínu u izolátu 41A. Miera expresie *rnaIII* sa vyznačuje vyššou expresiou u izolátov 40A a 41A, ktoré boli odobrané s odstupom času oproti primoizolátu (39A). U všetkých izolátov môžeme pozorovať nižšiu mieru expresie oproti kontrolnému stavu po pôsobení vankomycínu. Najnižšiu mieru expresie sme zaznamenali u izolátu 40A po troch hodinách pôsobenia vankomycínu.

Z výsledkov merania génovej expresie môžeme usúdiť, že typ antibiotika, doba jeho pôsobenia ako aj čas izolácie od primoinfekcie majú vplyv na zmenu génovej expresie sledovaných génov. Tieto výsledky sú skôr informatívne a pre presnejšie a relevantnejšie výsledky by bolo potrebné vykonať viac meraní, ako aj meranie izolátov, ktoré nesú nejakú adaptačnú mutáciu v *Agr* systéme alebo v géne *sigB*.

4.6 Príprava konštruktú pre deléciu génu *agrA* v jednotlivých chronologických izolátov

Cieľ: Pripraviť konštrukt pomocou ktorého by sa dalo v jednotlivých chronologických izolátov vydeletovať gén *agrA* a metódou krivky hynutia stanoviť ich mieru perzistencie.

Aby som mohla stanoviť a porovnať mieru perzistencie chronologických izolátov s deléciou v génu *agrA* s chronologickými izolátmi bez tejto mutácie, pokúsila som sa metódami génového inžinierstva pripraviť plazmid, pomocou ktorého by som tento gén vydeletovala a následne ho vniesla do vybraných chronologických izolátov.

K príprave konštruktú som použila plazmid pCasSA navrhnutý Chenom a jeho kolegami (Chen et al. 2017). Jedná sa o plazmid, ktorý používa CRISPR – Cas9 systém pre rôzne úpravy genómu *S. aureus* (delécia, inzercia, bodová mutácia). Do tohto plazmidu je možné vložiť ľubovoľný spacer, ktorý slúži ako navádzacia RNA pre Cas9 nukleázu a inzert, ktorý sa pomocou homológnej rekombinácie včlení do chromozomálnej DNA.

Pre vytvorenie delécie génu *agrA* pre spacer aj pre inzert som použila primery navrhnuté Chenom a jeho kolektívom (Chen et al. 2017) (viď kapitola 3.1.9.1). Primery navrhnuté pre inzert bolo potrebné, aby som upravila, a to tak, aby boli univerzálne pre deléciu v akomkoľvek izoláte s ľubovoľným typom Agr systému. Primery som posunula do oblasti mimo variabilnú oblasť génu pre *agrC*.

V prvom kroku bolo potrebné, aby som primery (viď kapitola 3.1.8.1) určené pre vytvorenie spaceru nafosforylovala (viď kapitola 3.2.10.5.1). Po tomto kroku som pristúpila ku Golden gate ligácii (viď kapitola 3.2.10.5.2), pomocou ktorého som spojila spacer a plazmid pCasSA. Ligačnú zmes som následne natransformovala do buniek *E. coli* DH5 α (viď kapitola 3.2.10.14) a vysiala na pevné LB médium s kanamycinom (50 $\mu\text{g/ml}$). Pre kontrolu plazmidov, či obsahujú spacer, som vybrala 6 narastených kolónií, ktoré som kultivovala v tekutom médiu cez noc a potom z nich vyizolovala plazmidy (viď kapitola 3.2.10.1). Úspešnosť ligácie som overila pomocou PCR reakcie ako aj pomocou sekvenovania daného úseku (použitím primerov pre sekvenovanie; viď kapitola 3.1.9.3) na servisnom pracovisku PrF UK. Vzniknutý produkt pochádzajúci z PCR reakcie som overila na agarózovej elektroforéze (viď obrázok č. 17).

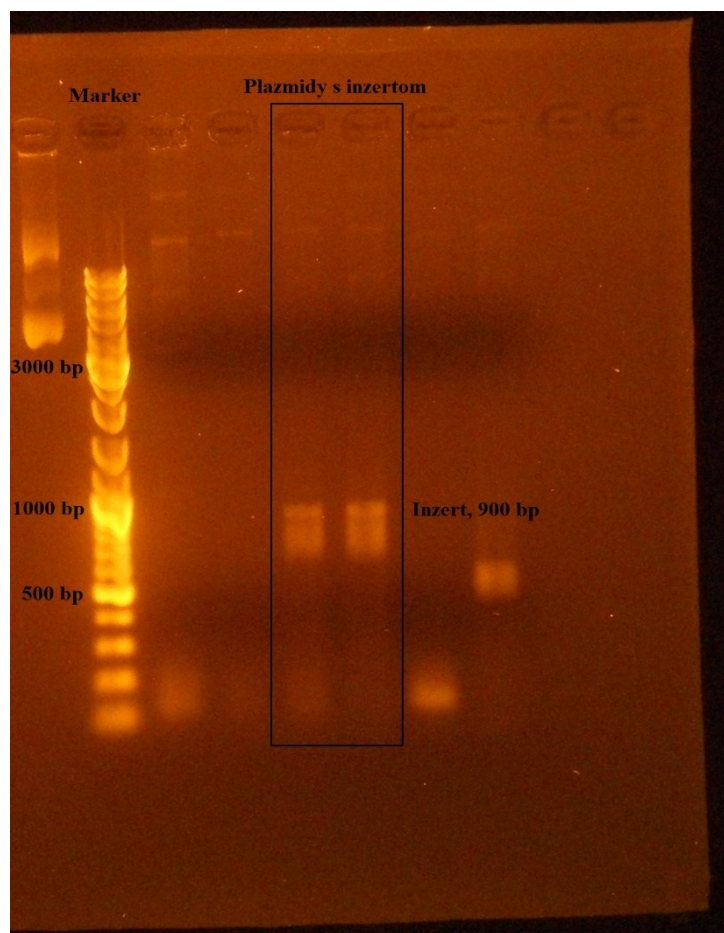


Obrázok č. 17: Agarózová elektroforéza ukazujúca úspešnú Golden gate ligáciu. Ohraničie poukazuje na plazmidy, ktoré nesú spacer o veľkosti približne 20 bp. Amplifikovaný úsek pochádza so spaceru a z časti plazmidu a jeho veľkosť je približne 200 bp.

Po úspešnom spojení spaceru a plazmidu som pristúpila k vytvoreniu inzertu pre deléciu génu *agrA*. Tento inzert sa skladal z dvoch častí, a to z upstream a downstream časti. Pre vytvorenie inzertu som použila primery, ktoré majú navzájom sa prekrývajúce oblasti (viď kapitola 3.1.8.1). Ako prvé som vytvorila upstream časť inzertu pomocou PCR reakcie a následne downstream časť (viď kapitola 3.2.10.4). Vzniknuté produkty som overila na agarózovej elektroforéze. Pre vytvorenie celkového inzertu bolo potrebné tieto dve časti spojiť, čo sa mi pomocou PCR reakcie podarilo (viď kapitola 3.2.10.4). Aby som mala pre nasledujúce kroky dostatočné množstvo celkového inzertu, tento inzert som pomocou PCR reakcie naamplifikovala. Výsledný produkt som overila na agarózovej elektroforéze a prečistila som ho použitím kitu pre prečistenie PCR produktov (GeneJet Extraction and DNA Cleanup Micro Kit; viď kapitola 3.2.10.7).

Pre spojenie plazmidu pCasSA so spacerom a vytvoreného inzertu bolo potrebné, aby som plazmid aj inzert vhodne naštiepila. Pre tento účel som použila restriktčné enzýmy (RE) XbaI a XhoI (viď kapitola 3.2.10.6). Po restriktčnom štiepení som plazmid aj inzert purifikovala od prebytočných RE pomocou kitu GeneJet Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (viď kapitola

3.2.10.7). Naštiepený plazmid (pCasSA so spacerom) a daný inzert som následne pomocou ligácie spojila (vid' kapitola 3.2.10.8). Ligačnú zmes som následne natransformovala do buniek *E. coli* IM08B (vid' kapitola 3.2.10.14) a vysiala na pevné LB médium s kanamycinom (50 µg/ml). Pre kontrolu plazmidov, či obsahujú inzert, som vybrala 6 narastených kolónií, ktoré som kultivovala v tekutom médiu cez noc a potom z nich vyizolovala plazmidy (vid' kapitola 3.2.10.1). Úspešnosť ligácie som overila jednak pomocou PCR reakcie ako aj sekvenovaním daného úseku z plazmidu (použitím primerov pre sekvenovanie; vid' kapitola 3.1.9.3) na servisnom pracovisku PrF UK. Vzniknutý produkt pochádzajúci z PCR reakcie som overila na agarózovej elektroforéze (vid' obrázok č. 18).



Obrázok č. 18: Overenie úspešnosti ligácie inzertu do plazmidu pCasSA so spacerom. Ohraničenie poukazuje na úspešnú ligáciu, kde plazmidy izolované z transformantov nesú inzert. Veľkosť inzertu je približne 900 bp.

Overené plazmidy som transformovala do kompetentných buniek *E. coli* IM08B, ktoré navodia jednu z modifikácií DNA podobnú *S. aureus*.

Z úspešných transformantov som vyizolovala plazmidy (viď kapitola 3.2.10.1) a pomocou elektroporácie som (viď kapitola 3.2.10.16) ich preniesla do kompetentných buniek, ktoré som pripravila z vybraných klinických izolátov *S. aureus* a laboratórneho kmeňa RN4220, ktorý je defektný v restričnom systéme (viď kapitola 3.2.10.13). Transformanty som vysiala na pevné TSB médium s chloramfenikolom (5 µg/ml) a nechala inkubovať 42 h pri 30 °C. Pre kontrolu delécie génu *agrA* som vybrala narastené kolónie, ktoré som kultivovala v tekutom médiu cez noc a potom z nich vyizolovala chromozomálnu DNA (viď kapitola 3.2.10.3). Úspešnosť delécie génu *agrA* som overila pomocou PCR reakcie. Vzniknutý produkt pochádzajúci z PCR reakcie som overila na agarózovej elektroforéze.

Vnesenie plazmidu do laboratórneho kmeňa *S. aureus* RN4220 sa prejavil ako najťažší krok. Aj po niekoľkých pokusoch a optimalizácií protokolu sa mi podarilo získať, len málo transformantov. Vo väčšine prípadov elektroporácia nebola úspešná a nevyrástli žiadne transformanty. V prípade, že vyrástlo aspoň niekoľko transformantov, bohužiaľ úprava genómu nebola úspešná a delícia génu *agrA* sa nepodarila. V prípade, keď som vniesla plazmid do klinického izolátu 36A, elektroporácia bola úspešnejšia, avšak delícia génu *agrA* sa ani v tomto prípade nepodarila. V konečnom dôsledku sa mi nepodarilo vytvoriť delečného mutanta v géne *agrA*.

Príčina prečo sa delícia génu *agrA* nepodarila môže byť viacero. Jedna z možností je, že plazmid nie je schopný sa udržať v bunke, pretože je plazmid restrično – modifikačným (RM) systémom bunky štiepený, a preto úprava genómu sa neuskutoční. Vyrastené kolónie sú tak spontánne rezistentné ku kanamycinu. Ďalšou z možností je, že homológna časť inzertu v downstream oblasti nie je dostatočne dlhá, a preto medzi homológnyimi úsekmi s genómovou DNA nedošlo k homológnej rekombinácii. Pretože primery navrhnuté Chenom a jeho kolektívom (Chen et al. 2017) boli navrhnuté do variabilnej oblasti pre Agr typ I a moje izoláty majú Agr typ II a III, neboli vhodné pre moje klinické izoláty.

Tieto problémy, by sa mohli vyriešiť tým, že sa vytvorí plazmid s novým a vhodnejším inzertom, ktorý by ale vytvoril len neúplnú deléciu génu *agrA*, poprípade sa môžu použiť rôzne kmene *E. coli* s rozličným RM systémom ako medzi krok pred samotnou mutagenézou v *S. aureus*.

5 Diskusia

Staphylococcus aureus patrí medzi grampozitívne baktérie. Hovoríme o oportunistickom patogéne, ktorý bežne kolonizuje dýchací trakt a kožu ľudí a vo väčšine prípadov je neškodný. Za určitých podmienok však tento patogén môže navodiť rôzne ochorenia, ktoré môžu vyústiť až do smrti pacienta. Oslabenie imunitného systému, rôzne rany na pokožke ako aj chirurgické zákroky zapríčiňujú stafylokokové infekcie. Veľký problém nastáva vtedy, keď z akútnej infekcie sa stane chronická infekcia, ktorej liečba je veľmi náročná a častokrát zlyháva. Jedným zo zásadných problémov prečo je antibiotická liečba neúčinná je tvorba subpopulácie perzistentných buniek. Táto subpopulácia buniek aj keď je geneticky identická s rodičovskou populáciou je schopná odolávať antibiotikám a po vysadení antibiotickej liečby sú schopné navrátiť svoj pôvodný fenotyp (virulentný) a opäť navodiť ochorenie. Veľkým problémom sa ukazuje aj šírenie rezistentných buniek, ktoré sa pravdepodobne formujú práve z perzistentných buniek. Fenomén perzistencie sa neobmedzuje len na *S. aureus*, ale môžeme ho nájsť i u ďalších klinicky významných patogénov, ktorých liečba neraz zlyháva.

Skúmaniu perzistencie sa v dnešnej dobe kladie oveľa väčší dôraz ako v minulosti, kedy tento fenomén bol v ústraní oproti rezistencii. Aj keď máme čoraz viac poznatkov o perzistencii sú stále nedostačujúce. Skúmanie tohto javu vôbec nie je jednoduché, lebo nastolenie perzistentného stavu je komplexným javom, do ktorého sa zapájajú rôzne mechanizmy, navyše sú rozdiely v mechanizmoch medzi grampozitívnymi a gramnegatívnymi baktériami. Štúdium neľahčuje ani fakt, že ich množstvo v populácií je malý a bunky v perzistentnom stave sú schopné rýchlo sa navrátiť do aktívneho stavu. Aby sa získalo čo najviac informácií, je dôležité pristupovať k tomuto problému komplexne a využívať niekoľko experimentálnych prístupov.

U perzistentných bunkách môže dochádzať k vzniku adaptačných mutácií, ktoré nám môžu napovedať, ktoré gény sa zapájajú pri tvorbe perzistentného stavu. Vznik adaptačných mutácií je možné navodiť a sledovať v laboratórnych podmienkach alebo ako ďalší variant sú chronologické izoláty pochádzajúce z chronických infekcií, kde adaptačné mutácie zodpovedajúce za zvýšenie vzniku perzisterov spontánne vznikli.

Prvým cieľom mojej diplomovej práce bolo stanovenie perzistentnej populácie pomocou kriviek hynutia, ktoré sú všeobecne považované za kvantitatívnu metódu stanovenia miery perzistencie. Táto vypracovaná metóda vychádza z predchádzajúcich prác nášho

laboratória. Metódu kriviek hynutia som použila na získané primoizoláty, ktoré predstavovali zatiaľ neadaptované izoláty a v ďalších dvoch prípadoch troch následných izolátov od dvoch rôznych pacientov. Pomocou tejto metódy som mohla skúmať, ako sa schopnosť perzistovať mení v čase a či i kratší časový úsek stačí k získaniu vyššej schopnosti perzistovať. Ďalej som mohla posúdiť aj to, ako sa táto schopnosť líši na základe použitého antibiotika. Izoláty boli osekvenované v MBÚ AV ČR a podľa výsledkov sekvenácie som mohla získané adaptačné mutácie dať do súvislosti s mierou perzistencie. MIC používaných antibiotík ciprofloxacín, oxacilín a vankomycín som mala k dispozícii od FN Motol a podľa stanovených koncentrácií som vystavovala skúmané izoláty.

V druhej časti mojej diplomovej práce som sa zamerala na fyziologický stav perzistentných buniek, a to na membránový potenciál a redoxný potenciál na základe pôsobenia antibiotika. Znížený membránový potenciál sa dáva do súvislosti s perzistentnými bunkami a redoxný potenciál nám odhalí životaschopnosť/vitalitu buniek. Podľa týchto poznatkov sme otestovali ako sa mení membránový potenciál a redoxný potenciál u pozorovaných izolátov v priebehu kriviek hynutia.

Pomocou prietokového cytometra som pozorovala pôsobenie vybraných antibiotík na membránový potenciál a redoxný potenciál bunky a pokúsila sa dať do súvislosti so získanými mutáciami izolátov alebo časovým intervalom akými boli odobraté a mierou perzistencie, ktorú som zistila stanovením CFU. Tak ako u membránového potenciálu tak aj u redoxného potenciálu som používala duálne fluorescenčné farbenie, navyše u izolátov, kde som sledovala redoxný potenciál bol zavedený aj plazmid, ktorý mal promótorovú sekvenciu génu *sigB* fúzovanú s GFP. V priebehu kriviek hynutia som tak vedela rozlíšiť subpopuláciu buniek s membránovým potenciálom, bez membránového potenciálu ale živé a mŕtve bunky bez membránového potenciálu. Počas sledovania redoxného potenciálu som vedela rozlíšiť bunky so zachovaným redoxným potenciálom, bez redoxného potenciálu a bunky produkujúce GFP so zachovaným redoxným potenciálom a so stratou redoxného potenciálu. Ako kontrolné vzorky mi slúžili nefarbené bunky, bunky so skratovaným membránovým potenciálom po pôsobení CCCP (protonofor) a mŕtve bunky, ktoré vznikli po pôsobení 96% ethanolu.

V tretej a poslednej časti mojej práce som sa zamerala na molekulárnu podstatu perzistencie. V tejto časti som sledovala génovú expresiu metódou RT qPCR u vybraných génov, ktoré majú preukázanú súvislosť s perzistenciou (*sigB*, *mazEF*, *agrA*, *rnalIII*). Génová

expresia bola meraná v časových intervaloch 0 hodín, 30 minút a 3 hodiny po pôsobení antibiotika.

V poslednej časti mojej diplomovej práce som sa pokúsila pomocou CRISPR – Cas9 systému vydeletovať gén *agrA*, ktorý je hlavným regulátorom dvojkomponentového systému *agrCA* a posúdiť aký vplyv má táto delécia na vytvorenie perzistentného stavu. Túto deléciu som chcela previesť pomocou plazmidu pCasSA, ktorý som upravila podľa mojich izolátov, avšak sa mi upravený plazmid nepodarilo vnieť do klinických izolátov.

Prácu som začala výberom izolátov, ktoré boli podrobené skúmaniu. Podľa získaných dát zo sekvenčnej analýzy MBÚ AV ČR s.r.o, kde boli nájdené všetky mutácie v porovnaní s najbližším klonálnym predkom, som vybrala izoláty, ktoré neniesli žiadne mutácie v Agr lokuse a mali Agr typ iný ako I a izoláty, ktoré niesli mutáciu v géne *sigB*. Chronologické izoláty prvého pacienta niesli síce kumulatívne mutácie ale neniesli žiadnu mutáciu v Agr lokuse a mali Agr typ II. Pomocou týchto izolátov som chcela posúdiť aký vplyv má delécia génu *agrA* na tvorbu perzistentných buniek. Je známe, že mutácie v génoch Agr systému vedú k zníženej schopnosti virulencie, čím bakteriálna bunka je schopná uniknúť imunitnej odpovedi a je schopná vytvárať perzistentné bunky (Suligoy et al. 2018; Xu et al. 2017). Chronologické izoláty druhého pacienta niesli substitučnú mutáciu v géne *sigB* a mali Agr typ III. Alternatívny sigma faktor B reguluje množstvo génov, a tým i rôzne bunkové procesy. Literatúra uvádza, že produkty génov *sarA*, *sigB* a Agr lokusu sú navzájom prepojené a počas chronickej infekcie práve SigB inhibuje expresiu génov Agr lokusu a *sarA*, čím ovplyvňuje vznik perzisterov. Delécia génu *sigB* znižuje tvorbu perzistentných buniek a znemožňuje tvorbu SCV buniek (Tuchscher et al. 2015). Liu a jeho kolektív v roku 2018 našli substitučnú mutáciu v géne *sigB*, ktorý napomáhal k tvorbe biofilmu a biofilm je práve rezervoárom veľkého množstva perzistentných buniek (Moradali et al. 2017). Táto substitučná mutácia spočívala v zámene glutamínu na prolín, zatiaľ čo u mnou sledovaných chronologických izolátov substitučná mutácia viedla k zámene arginínu na leucín. Tieto substitučné mutácie sa nezhodujú a dá sa len predpokladať, že substitučná mutácia v géne *sigB*, ktoré nesú chronologické izoláty, napomáha k tvorbe perzistentných buniek, tak ako podľa našich výsledkov stanovením kriviek hynutia vyplýva.

U perzistentnej populácie je typický bifázický priebeh hynutia. Krivky hynutia mnou sledovaných klinických izolátov vykazovali práve, takýto priebeh hynutia (viď grafy č. 1 a č. 2). U prvého pacienta som sledovala nárast schopnosti perzistovať v závislosti na získaných

mutácií. Oproti primoizolátu (39A) všetky ostatné chronologické izoláty (40A, 41A, 63A) vykazovali väčšiu mieru schopnosti perzistovať. Síce tieto chronologické izoláty neniesli žiadnu mutáciu v Agr lokuse, ktorý je spojený s tvorbou perzistentných buniek ale po dlhšom pretrvávajú v organizme pacienta si vytvorili adaptačné mutácie, ktoré pravdepodobne prispievajú k tvorbe perzistentnej subpopulácie. Spojitosť medzi týmito adaptačnými mutáciami a perzistenciou je potrebné ďalej skúmať a dokázať. Rozdiel v schopnosti perzistovať v závislosti na adaptácii bolo možné sledovať po pôsobení všetkých antibiotík. U všetkých troch antibiotík (ciprofloxacín, oxacilín, vankomycín) je možné vidieť nárast o jeden až dva rády oproti primoizolátu.

U druhého pacienta bola miera schopnosti perzistovať už u primoizolátu pomerne vysoká. U chronologických izolátov druhého pacienta sa objavila substitučná mutácia v géne *sigB* a rada ďalších adaptačných mutácií. Miera schopnosti perzistovať po pôsobení antibiotík oxacilínu a vankomycínu bol medzi izolátmi približne zrovnateľný. Po pôsobení antibiotika ciprofloxacínu však miera schopnosti perzistovať izolátov 51A a 75A bola o dva rády vyššia oproti primoizolátu (36A). Chronologické izoláty druhého pacienta vykazovali vyššiu mieru schopnosti perzistovať oproti chronologickým izolátom prvého pacienta (viď graf č. 5). Táto skutočnosť bola pravdepodobne spôsobená tým, že izoláty druhého pacienta niesli mutáciu v géne *sigB*, ktorý je zapojený pri tvorbe perzistentných buniek a niesli i mnoho ďalších adaptačných mutácií, ktoré by mohli prispieť k navodeniu perzistentného stavu, avšak ich spojitosť s perzistenciou je zatiaľ len špekulatívna.

Moje predchodkyne poukázali na skutočnosť, že metóda stanovenia kriviek hynutia metódou stanovenia CFU má svoje nedostatky, pretože pri vysokom riedení kultúry populácia často nevyrástla. Tento jav pozorovali hlavne u izolátov, ktoré boli veľmi adaptované a mali mutácie v Agr systéme. Na rovnaký problém som narazila aj ja, kedy izoláty, ktoré boli viac adaptované pri vysokých riedeniach vyrastali neochotne. Tento jav je pravdepodobne spôsobený tým, že veľmi adaptované a mutované izoláty v Agr systéme nie sú schopné produkovať dostatočné množstvo molekúl, ktoré by napomohli k resuscitácii perzisterov. Z tohto dôvodu som sa rozhodla otestovať vplyv supernatantu z nočných kultúr vybraných chronologických izolátov na vyrastanie z perzistentného stavu. Predpokladala som, že supernatant obsahuje molekuly QS systému, ktoré by mali napomáhať pri resuscitácii perzistentných buniek. Použitie supernatantu pozitívne ovplyvnilo vyrastanie z perzistentného stavu viac bunkám aj pri nízkych riedeniach a stanovenie miery schopnosti perzistovať pri použití supernatantu bolo jedno až o dva rády väčšie oproti výsevom, kde supernatant použitý

nebol (viď obrázok č. 12). Literatúra uvádza, že kmene *S. aureus* s rovnakým Agr typom sú schopné si navzájom aktivovať Agr systém, čím bunka prechádza na agresívny virulentný stav (Wang a Muir 2016).

Moje predchodkyne ďalej zistili, že miera schopnosti perzistovať je najviac zvýšená u *agr* mutant (Kotková 2019; Valtová 2020). Podľa našich výsledkov i substitučná mutácia v géne *sigB* nášho izolátu napomáha pri tvorbe perzistentných buniek ale za schopnosť perzistovať môžu byť zodpovedné aj iné mutácie než v Agr operóne. V literatúre sú popísané nepriame dôkazy o tom, že vyradenie génu *sigB* má vplyv na tvorbu perzisterov. Literatúra uvádza na myšacom modeli, že delécia génu *sigB* znižuje mieru schopnosti prežívať v hostiteľovi a vytvárať SCV formy, ktoré sú jednou z foriem perzisterov (Tuchscherr et al. 2015). Ďalej bolo publikované, že substitučná mutácia objavená Liu a jeho kolektívom (2018) však napomáha pri tvorbe biofilmu a zachováva i virulenciu *S. aureus*. Je pravdepodobné, že mutácia v géne *sigB* môže napomáhať i pri tvorbe perzistentného stavu.

V druhej časti mojej práce som sa pokúsila ukázať, ako pôsobenie sledovaných antibiotík ovplyvňuje membránový potenciál a redoxný potenciál v priebehu krivky hynutia. Kolaps/zníženie membránového potenciálu sa dáva do súvislosti s vytváraním perzistentných buniek (Wilmaerts et al. 2019). Znížený membránový potenciál u perzisterov môžeme sledovať u baktérie *E. coli* aj *S. aureus*. U *E. coli* za kolaps membránového potenciálu zodpovedá pórotočný toxín HokB, kým u *S. aureus* za zníženie membránového potenciálu a vzniku vysokej hladiny perzistentných buniek zodpovedajú mutácie v génoch kódujúce enzýmy Krebsovho cyklu (Verstraeten et al. 2015; Wang et al. 2018). Podľa uvedeného znížený membránový potenciál môžeme pozorovať u perzisterov, preto sme sa ho rozhodli sledovať u skúmaných izolátov.

Redoxný potenciál nám udáva životaschopnosť, respiračnú aktivitu buniek. Počas rôznych stresových podmienkach môže bunka svoj redoxný stav zmeniť. Redoxný stav môže kontrolovať ako bakteriálne správanie, diferenciáciu tak aj vývoj spoločenstva (Sporer et al. 2017). Redoxný potenciál bunky zatiaľ nebol spájaný s perzistentným stavom.

Membránový potenciál sme merali po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu a výsledky sú zaznamenané v grafoch č. 6a – 6c a 7a – 7c pre každého pacienta a každé antibiotikum zvlášť. V grafoch udávam len hodnoty v čase t_4 , kedy sa zastúpenie jednotlivých subpopulácií ustálilo. Zistili sme, že po pôsobení ciprofloxacínu aj po štvrtej hodine prevláda subpopulácia buniek so zachovaným membránovým potenciálom (viď graf č.

8a). Pravdepodobne je to spôsobené tým, že ciprofloxacín pôsobí na gyrázu a nie na bunkovú stenu ako oxacilín a vankomycín.

U prvého pacienta môžeme vidieť, že aj po 4 hodinách pôsobenia ciprofloxacínu prevládala subpopulácia buniek so zachovaným membránovým potenciálom, avšak oproti primoizolátu adaptovanejšie izoláty mali väčšie percentuálne zastúpenie týchto buniek (viď graf č. 6a).

U druhého pacienta rozdiel medzi ním a prvým pacientom nebol výrazný. Po štyroch hodinách pôsobenia ciprofloxacínu boli populácie s potenciálom a bez potenciálu skoro v rovnakom pomere u primoizolátu i u izolátu 75A. U izolátu 51A prevláda subpopulácia buniek bez membránového potenciálu, avšak pri tomto meraní bolo nameraných menej buniek a meranie sa uskutočnilo iba raz, preto tu mohli nastať chyby (viď graf č. 7a).

U antibiotík, ktoré pôsobia na bunkovú stenu vo štvrtej hodine ich pôsobenia prevládali bunky bez potenciálu u oboch pacientov (viď grafy č. 8b a 8c). Po pôsobení oxacilínu aj po štvrtej hodine môžeme vidieť zastúpenie buniek so zachovaným membránovým potenciálom, naproti tomu po pôsobení vankomycínu je len minimálne množstvo buniek so zachovaným membránovým potenciálom.

Je zrejmé, že každé antibiotikum, ktoré sme používali pôsobí na fyziologický stav prežívších baktérií rôznym spôsobom. Každé z týchto antibiotík má rozdielne pole pôsobenia. Ciprofloxacín inhibuje gyrázu, kým oxacilín inhibuje transpeptidáciu a karboxypeptidáciu pri syntéze peptidoglykánu väzbou na proteíny viažuce penicilín (PBP) u rastúcich buniek. Vankomycín inhibuje syntézu bunkovej steny väzbou na stenové prekurzory, ktoré tak nemôžu tvoriť zosieťovanie pomocou transpeptidáz a dochádza tak k zastaveniu rastu.

Podľa týchto poznatkov je zrejmé, že oxacilín a vankomycín razantne indukujú znížený membránový potenciál. Na znížený membránový potenciál u *S. aureus* má väčší vplyv zvolené antibiotikum ako genetické pozadie izolátu. Meranie fyziologického stavu pomocou prietokového cytometra nie je úplne vypovedajúca informácia o perzistentnom stave, pretože strata membránového potenciálu sa nedá korelovať s mierou perzistencie, ktorú sme získali stanovením CFU. Po pôsobení antibiotika ciprofloxacínu na prietokovom cytometri sme namerali vždy väčšie množstvo buniek so zachovaným potenciálom ako sme stanovili pomocou CFU.

Redoxný potenciál sme merali spoločne s expresiou génu *sigB*. Zvolila som fluorescenčnú farbu CTC, ktorá udáva redoxný potenciál buniek a spektrá s GFP je možné spolu merať dohromady, pretože sa neprekrývajú. Do chronologických izolátov prvého pacienta som preto pomocou techniky transdukcie vniesla plazmid pCNSigBtet, ktorý má promótorovú sekvenciu génu *sigB* fúzanú s GFP. Pomocou tohto plazmidu a prietokového cytometra, ktorý detegoval fluorescenciu GFP sa mi podarilo pozorovať, či pôsobenie antibiotík indukuje obecnú stresovú odpoveď a ktoré typy buniek po pôsobení antibiotík hynú. Tento plazmid som sa pokúsila vniesť pomocou techniky transdukcie aj do chronologických izolátov druhého pacienta, avšak neúspešne. Po sekvenčnej analýze izolátov a fágov $\phi 80$ a $\phi 11$ bolo zistené, že sa jedná o lyzogény týchto fágov, a preto s najväčšou pravdepodobnosťou nebola transdukcia úspešná.

Pre rozoznanie živých a mŕtvych buniek som zvolila fluorescenčnú farbu DAPI, ktorá sa však ukázala ako nevhodná, pretože vďaka rôznym bakteriálnym transportným systémom sa dostávala ako do odumretých buniek, tak farbila DNA i buniek s aktívnym redoxným potenciálom. Bunky akumulujúce DAPI som preto nevyhodnocovala. Pre budúce merania je preto potrebné v kombinácii CTC zvoliť vhodnejšiu fluorescenčnú farbu na rozlíšenie živých a mŕtvych buniek.

U všetkých chronologických izolátov prvého pacienta môžeme vidieť, že prevládajú bunky, ktoré produkujú GFP aj v čase t_0 , po aplikácii antibiotík došlo k zvýšeniu populácie buniek s exprimovaným GFP, čo nám napovedá, že nami používané antibiotiká indukujú expresiu *sigB* operónu. Zaujímavé je, že aj v čase t_0 môžeme zaznamenať bunky, ktoré produkujú GFP. Rola tohto sigma faktoru nie je u *S. aureus* úplne objasnená a súčasné práce viac skúmajú jeho účasť v regulácii virulencie ako adaptácii na stres (Jenul a Horswill 2019). Po štyroch hodinách pôsobenia antibiotík ciprofloxacínu, oxacilínu a vankomycínu prevládali bunky s exprimovaným GFP, čo naznačuje, že určitú rolu v nastolení perzistentného stavu hrať bude, ale je potrebné túto spojitosť ďalej preukázať.

Po pôsobení ciprofloxacínu u všetkých izolátov okrem izolátu 41A, kde prevládajú bunky so zachovaným redoxným potenciálom, postupom času bunky strácajú svoj redoxný potenciál a väčšina z nich exprimuje *sigB* (viď grafy č. 9a – 9d). Rovnaký trend môžeme pozorovať aj u antibiotík oxacilínu a vankomycínu, kde postupom času u všetkých chronologických izolátov prevládajú bunky so zníženým redoxným potenciálom a väčšina týchto buniek exprimuje *sigB* (viď grafy č. 10a – 10d a 11a – 11d).

Z uvedených môžeme posúdiť, že po pôsobení antibiotika ciprofloxacín síce bunka zachováva svoj membránový potenciál, avšak svoj redoxný potenciál znižuje. Pri antibiotík oxacilín a vankomycín bunka postupom času stráca ako svoj membránový potenciál tak aj svoj redoxný potenciál. Redoxný potenciál nám viac vypovedá o životaschopnosti/respiračnej aktivite bunky, a tým môže byť i lepším ukazovateľom fyziológie perzistentných buniek.

Zároveň som bola schopná rozlíšiť, ktorá populácia s redoxným potenciálom a bez redoxného potenciálu exprimuje *sigB* podľa signálu reportérového GFP. Jeho expresia bola zaznamenaná ako v bunkách s redoxným potenciálom i bez redoxného potenciálu a týchto buniek bola väčšina (viď grafy č. 9a – 9d, 10a – 10d, 11a – 11d). V priebehu krivky hynutia sa zvyšoval počet buniek s exprimovaným GFP a bez redoxného potenciálu u všetkých sledovaných antibiotík. To by ukazovalo na to, že na tvorbu perzisterov má vplyv ako strata redoxného potenciálu, tak aj expresia *sigB*.

V ďalšej časti mojej práce sme stanovili mieru génovej expície u troch izolátov prvého pacienta, o ktorých vieme, že ovplyvňujú mieru perzistencie a u ktorých sme stanovili mieru expície *sigB* prietokovou cytometriou. Expícia génu alternatívneho sigma faktora B sa mierne zvýšila u izolátov 39A a 40A po troch hodinách pôsobenia ciprofloxacínu a oxacilínu oproti kontrole (kultúra bez antibiotika) (viď graf č. 12). Výsledky RT qPCR a prietokovej cytometrie úplne nekorelujú. Vo výsledkoch prietokovej cytometrie došlo k zvýšeniu expície GFP už po 30 minútach pôsobenia antibiotík. Výsledky z qPCR a cytometrie nemožno úplne zrovnávať, pretože qPCR zaznamenáva zmeny v expresii v celej populácii buniek, viac – menej nám ale potvrdili, že i na úrovni mRNA génu *sigB* dochádza k zvýšeniu jeho expície po pôsobení antibiotík.

Expícia génov *mazEF* bola zvýšená u všetkých troch izolátov po troch hodinách pôsobenia antibiotík (viď graf č. 13). *MazEF* sú génmi TA systému. TA systémy sa spájajú s perzistenciou ale skôr u G⁻ baktérií, ako *E. coli* alebo *Pseudomonas*. U *S. aureus*, ktorá je G⁺ baktéria nebol preukázaný vzťah medzi TA systémom a perzistenciou (Helaine a Ronneau 2019).

U génu *agrA* sme zaznamenali mierne zvýšenie expície po pôsobení antibiotika oxacilín po troch hodinách pôsobenia u všetkých troch izolátov. Expícia tohto génu u ostatných antibiotík a časoch bol skôr downregulovaný (viď graf č. 14). Gén *agrA* je hlavným regulátorom dvojkomponentového systému *agrCA* a reguluje expresiu ako RNAIII tak aj PSM molekúl. Ako RNAIII tak aj PSM molekuly sú zapojené do virulencie *S. aureus*. Počas

perzistentného stavu je však virulencia potláčaná, a tým pádom i expresia génu *agrA* je inhibovaná (Wang a Muir 2016; Xu et al. 2017).

Expresia génu *rnaIII* bola zvýšená po troch hodinách pôsobenia oxacilínu u všetkých izolátoch a po 30 minútach pôsobenia oxacilínu u izolátu 41A (viď graf č. 15). Expresia tohto génu oproti kontrole však nebola až tak výrazne zvýšená a pri ostatných antibiotikách jeho expresia bola skôr potláčaná. RNAIII reguluje produkciu virulenčných faktorov, preto je exprimovaný hlavne pri akútnych infekciách a počas chronickej infekcie je jeho expresia potláčaná (Wang a Muir 2016).

Metóda stanovenia génovej expresie je vhodná k pozorovaniu molekulárnych mechanizmov perzistencie, o jej miere však veľa nevytvára. Vzhľadom k heterogenite perzisterov sa nedá príliš očakávať, že miera expresie jedného alebo viac génov bude v budúcnosti dostatočne vhodná pre použitie v klinickej praxi pri detegovaní perzisterov. Kombináciou RT qPCR a prietokovej cytometrie a merania redoxného potenciálu by sa však mohli perzistentné bunky ľahšie detegovať.

V poslednej časti mojej práce som sa zaoberala deléciou génu *agrA* v izolátoch, ktoré neniesli žiadne mutácie v *Agr* lokuse. Túto deléciu som chcela previesť pomocou CRISPR – Cas9 systému. Pomocou tejto delécie som mohla stanoviť mieru schopnosti perzistovať mutovaných izolátov a porovnať ich mierou schopnosti perzistovať izolátov bez mutácie alebo s mutáciou v géne *sigB*, a tak preukázať rolu *agrA* génu pri tvorbe perzisterov.

Pre deléciu génu *agrA* som použila plazmid pCasSA navrhnutý Chenom a jeho kolektívom, ktorý používa CRISPR – Cas 9 systém pre úpravu genómu *S. aureus*. Do tohto plazmidu je možné vložiť ľubovoľný spacer ako aj inzerť. Pomocou Golden gate ligácie som vložila spacer do plazmidu a po vytvorení celkového inzertu, ktorý pozostával z upstream a downstream časti som pomocou ligačnej reakcie vložila aj inzerť do plazmidu. Takto pripravený plazmid som transformáciou preniesla do buniek *E. coli* IM08B, ktoré umožňujú špecifickú stafylokokovú modifikáciu DNA. Po izolácii plazmidov z *E. coli* IM08B som sa plazmidy pokúsila najprv preniesť do *S. aureus* RN4220, ktorý má defektný restriktívno - modifikačný (RM) systém. Bohužiaľ aj po niekoľkých pokusoch po elektroporácii plazmidu do týchto buniek nepodarilo získať transformanty. Po elektroporácii plazmidu do požadovaného klinického izolátu sa mi podarilo získať príslušné transformanty, avšak tieto transformanty nemali deléciu génu *agrA*.

Neúspech vytvoriť deléciu génu *agrA* môže spočívať v tom, že homológna časť inzeru v downstream oblasti nie je dostatočne dlhá, a preto medzi homológnyimi úsekmi s genómovou DNA nedošlo k homológnej rekombinácii. Primery navrhnuté Chenom a jeho kolektívom boli navrhnuté do variabilnej oblasti pre Agr typ I, avšak moje izoláty mali Agr typ II a III, preto bolo potrebné primery upraviť a tým downstream oblasť inzeru skrátiť. Nastáva tu aj možnosť, že plazmid je RM systémom klinických izolátov štiepený a plazmid nezotrvá v bunke dostatočne dlho, aby došlo k expresii Cas9 endonukleázy.

Jedným z riešení by mohol byť vytvorenie plazmidu s novým a vhodnejším inzertom, ktorý by ale vytvoril len neúplnú deléciu génu *agrA*. Je možné použiť aj rôzne kmene *E. coli* s rozličným RM systémom ako medzi krok pred samotnou mutagenézou v *S. aureus*.

Podľa zatiaľ známych informácií môžeme povedať, že perzistencia, jej vznik a priebeh je komplexný dej do ktorého sa zapájajú rôzne mechanizmy a neexistuje univerzálnosť medzi jednotlivými bakteriálnymi druhmi. Kombinácia rôznych techník ako aj skúmanie rôznych parametrov, fyziologických stavov perzistentných buniek nám môžu pomôcť lepšie porozumieť dejom súvisiacich s perzistenciou.

Kombinácia rôznych antibiotík, ktoré majú rozdielne pole pôsobenia, je možné perzistentné bunky odstrániť. Ďalej antibiotikami, ktoré necielia na bunkové procesy, ktoré vyžadujú energiu a rast buniek, ale aktivujú enzýmy, ktorým je napr. ClpP proteáza, ktorá zaháji nekontrolovanú proteolýzu, je tiež možné proti perzisterom bojovať. Ďalšou stratégiou v boji proti perzisterom je navrátiť dormantný stav dezagregáciou proteínov, ktoré sú pre bunkové procesy esenciálne, a to pomocou šaperónov DnaK a ClpB (Wilmaerts et al. 2019).

6 Súhrn

Cieľom mojej práce bolo sledovanie miery schopnosti perzistovať u vybraných chronologických izolátov, a to ako sa táto schopnosť mení v priebehu adaptácie na hostiteľa, a ako je táto zmena ovplyvnená získanými mutáciami. Ďalej som mala za úlohu preukázať vplyv jednotlivých adaptačných mutácií ako v geneticky neutrálnom pozadí (*S. aureus* RN4220), tak aj u jednotlivých chronologických izolátov a ich vplyv na mieru schopnosti perzistovať.

V mojej diplomovej práci boli dosiahnuté tieto ciele:

- 1) Pomocou kriviek hynutia som zistila mieru schopnosti perzistovať u vybraných chronologických izolátov od dvoch pacientov trpiacich cystickou fibrózou a zistila som, že schopnosť perzistovať stúpa s adaptáciou izolátu. Taktiež som zistila, že mutanty v géne *sigB* majú vyššiu mieru schopnosti perzistovať.
- 2) Sledovala som vplyv rôznych antibiotík na membránový potenciál pomocou prietokovej cytometrie a určila som zastúpenie subpopulácií v priebehu pôsobenia antibiotika. Každé antibiotikum malo odlišný vplyv na membránový potenciál prežívšej subpopulácie buniek.
- 3) Taktiež som sledovala vplyv antibiotík na redoxný potenciál bunky pomocou prietokovej cytometrie a určila som jednotlivé subpopulácie buniek v priebehu pôsobenia antibiotika. Zistila som, že v subpopulácií preživších buniek prevládali bunky so zníženým redoxným potenciálom, a to po pôsobení všetkých troch antibiotík.
- 4) Stanovila som mieru génovej expresie pre gény, ktoré sa dávajú do spojitosti s perzistenciou. Zistila som že gény *agrA* a *rnaIII*, ktoré sú súčasťou *agr* operónu sú vo väčšine prípadov inhibované po pôsobení nami študovaných antibiotík.
- 5) Upravila som plazmid pCasSA aby bol vhodný pre vytvorenie delécie génu *agrA*. Mieru schopnosti perzistovať som bohužiaľ nevedela stanoviť u mutant s deléciou génu *agrA*, nakoľko sa mi nepodarilo takýto mutant vytvoriť. Na rôzne príčiny neúspechu pri úprave genómu *S. aureus* som poukázala a navrhla možné riešenia tohto problému.

7 Zoznam použitej literatúry

1. *Allan, E.J., Hoischen, C., Gumpert, J. (2009): Bacterial L-forms, *Advances in Applied Microbiology*, **68**: 1 – 39
2. *Antelmann, H., Helmann, J.D. (2011): Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**: 1049–63
3. *Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., Storz, G. (1999): Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**: 6161–65
4. Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., Brynildsen, M.P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J.J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J.-M., Hardt, W.-D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D.T., Jenal, U., Levin, B.R., Michiels, J., Storz, G., Tan, M.-W., Tenson, T., Van Melderen, L., Zinkernagel, A. (2019): Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, **17**: 441–448.
5. Barea, T., Pollak, S., Eldar, A. (2018): Self-sensing in *Bacillus subtilis* quorum-sensing systems. *Nature Microbiology*, **3**: 83–89
6. Benarroch, J.M., Asally, M. (2020): The microbiologist's guide to membrane potential dynamics. *Trends in Microbiology*, **28**: 304–314
7. *Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J., Rabinowitz, J.D. (2009): Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, **5**: 593–99
8. Bigger, J. (1944): Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, **244**: 497–500
9. Bojer, M.S., Lindemose, S., Vestergaard, M., Ingmer, H. (2018): Quorum sensing-regulated phenol-soluble modulins limit persister cell populations in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 255
10. *Bryan, L.E, Kwan, S. (1983): Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **23**: 835–845
11. Conlon, B.P., Rowe, S.E., Gandt, A.B., Nuxoll, A.S., Donegan, N.P., Zalis, E.A., Clair, G., Adkins, J.N., Cheung, A.L., Lewis, K. (2016): Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology*, **1**: 1 - 7
12. *Cortese, B., Palamà, I. E., D'Amone, S., Gigli, G. (2014): Influence of electrotaxis on cell behaviour. *Integrative Biology*, **6**: 817–83
13. Créach, V., Baudoux, A.-C., Bertru, G., Rouzic, B.L. (2003): Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, **52**: 19–28

14. ***Dong-yeon, D. L., Galera-Laporta, L., Bialecka-Fornal, M., Moon, E. C., Shen, Z., Briggs, S. P., et al. (2019):** Magnesium flux modulates ribosomes to increase bacterial survival. *Cell*, **177**: 352-360
15. ***Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J., Lina, G. (2002):** High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus species*. *Journal of Bacteriology*, **184**: 1180–1186
16. ***Fahey, R.C., Brown, W.C., Adams, W.B., Worsham, M.B. (1978):** Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal of Bacteriology*, **133**: 1126–29
17. ***Fournier, B., Hooper, D.C. (2000):** A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **182**: 3955–3964
18. ***Fournier, B., Klier, A., Rapoport, G. (2001):** The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, **41**: 247–261
19. ***Geisinger, E., Adhikari, R.P., Jin, R., Ross, H.F., Novick, R.P. (2006):** Inhibition of rot translation by RNAlII, a key feature of agr function. *Molecular Microbiology*, **61**: 1038–1048
20. ***Giachino, P., Engelmann, S., Bischoff, M. (2001):** Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **183**: 1843–1852
21. ***Gilbert, H.F. (1990):** Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **63**: 69–172
22. ***Guldemann, C., Boor, K.J., Wiedmann, M., Guariglia-Oropeza, V. (2016):** Resilience in the face of uncertainty: Sigma factor B fine-tunes gene expression to support homeostasis in gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**: 4456–4469
23. **Habib, G., Zhu, J., Sun, B. (2020):** A novel type I toxin-antitoxin system modulates persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, **310**: 151400
24. **Hammer, K.A., Heel, K.A. (2012):** Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **40**: 239–245.
25. ***Häse, C.C. (2000):** Virulence and sodium bioenergetics. *Trends in Microbiology*, **8**: 490–491
26. ***Holmgren, A., Fagerstedt, M. (1982):** The in vivo distribution of oxidized and reduced thioredoxin in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **257**: 6926–30
27. **Horobin, R.W., Rashid-Doubell, F., Pediani, J.D., Milligan, G. (2013):** Predicting small molecule fluorescent probe localization in living cells using QSAR modeling. 1. Overview and models for probes of structure, properties and function in single cells. *Biotechnic & Histochemistry*. **88**: 440–460.
28. ***Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F. (1992):** Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, **257**: 1496–502

29. **Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W. S., Bae, T., & Ji, Q. (2017):** Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *Journal of the American Chemical Society*, **139**: 3790-3795
30. **Choudhary, K.S., Mih, N., Monk, J., Kavvas, E., Yurkovich, J.T., Sakoulas, G., Palsson, B.O. (2018):** The *Staphylococcus aureus* two-component system AgrAC displays four distinct genomic arrangements that delineate genomic virulence factor signatures. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 1082
31. **Christmas, B.A.F., Rolfe, M.D., Rose, M., Green, J. (2019):** *Staphylococcus aureus* adaptation to aerobic low-redox-potential environments: implications for an intracellular lifestyle. *Microbiology*, **165**: 779–791
32. **Jenul, C., Horswill, A.R. (2019):** Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology Spectrum*, **7**: 7.2.29
33. ***Ji, G., Beavis, R., Novick, R.P. (1997):** Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, **276**: 2027–2030
34. **Jung, S.-H., Ryu, C.-M., Kim, J.-S. (2019):** Bacterial persistence: Fundamentals and clinical importance. *Journal of Microbiology*, **57**: 829–835
35. **Kapuscinski, J. (1995):** DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, **70**: 220–233
36. ***Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A.L., Wang, Y., Lewis, K. (2004a):** Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, **230**: 13–18
37. **Kinkel, T. L., Roux, C. M., Dunman, P. M., Fang, F. C. (2013):** The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio*, **4**: e00696-13
38. ***Kint, C.I., Verstraeten, N., Fauvart, M., Michiels, J. (2012):** New-found fundamentalsof bacterial persistence. *Trends in Microbiology*, **20**: 1–9
39. **Kotková, H. (2019):** Změny ve schopnosti perzistovat u chronologických izolátů *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Prahe, Praha
40. ***Leichert, L.I., Jakob, U. (2004):** Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLOS Biology*, **2**: e333
41. ***Lewis, K. (2010):** Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, **64**: 357–372
42. **Liu, H., Shang, W., Hu, Z., Zheng, Y., Yuan, J., Hu, Q., Peng, H., Cai, X., Tan, L., Li, S., Zhu, J., Li, M., Hu, X., Zhou, R., Rao, X., Yang, Y. (2018):** A novel SigB(Q225P) mutation in *Staphylococcus aureus* retains virulence but promotes biofilm formation. *Emerging Microbes & Infections*, **7**: 1–12
43. ***Liu, J., Martinez-Corral, R., Prindle, A., Dong-Yeon, D. L., Larkin, J., Gabalda-Sagarra, M., et al. (2017):** Coupling between distant biofilms and emergence of nutrient time-sharing. *Science*, **356**: 638–642

44. *Manna, A., Cheung, A.L. (2001): Characterization of sarR, a modulator of sar expression in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **69**: 885–896
45. Martínez-Reyes, I., Chandel, N. S. (2020): Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature communications*, **11**: 1-11
46. *Matsuo, M., Kato, F., Oogai, Y., Kawai, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H. (2010): Distinct two-component systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* can change the susceptibility to antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 1536–1537
47. McAuley, S., Huynh, A., Czarny, T. L., Brown, E. D., Nodwell, J. R. (2018): Membrane activity profiling of small molecule *B. subtilis* growth inhibitors utilizing novel dual-dye fluorescence assay. *Medchemcomm*, **9**: 554–561
48. *Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F., Reichheld, J-P. (2009): Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual Review of Genetics*, **43**: 335–67
49. Michiels, J.E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N., Michiels, J. (2016): Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resistance Updates*, **29**: 76–89
50. Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, C. L., Langlois-Bégin, P., Michaud, S., Malouin, F. (2006): Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *Journal of Bacteriology*, **188**: 64-76
51. **Molecular Probes (2005):** BacLight™ RedoxSensor™ CTC Vitality Kit. Manual
52. Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H.A. (2017): *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**: 39
53. *Mulikidjanian, A. Y., Dibrov, P., Galperin, M. Y. (2008): The past and present of sodium energetics: may the sodium-motive force be with you. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, **1777**: 985–992
54. Nair, D., Memmi, G., Hernandez, D., Bard, J., Beaume, M., Gill, S., Francois, P., Cheung, A. L. (2011): Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *Journal of Bacteriology* **193**: 2332–2335
55. *Newton, G.L., Rawat, M., La Clair, J.J., Jothivasan, V.K., Budiarto, T. et al. (2009): Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nature Chemical Biology*, **5**: 625–27
56. *Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F., Moghazeh, S. (1995): The agr P2 operon—an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Genetics and Genomics*, **248**: 446–458
57. *Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993): Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *The EMBO Journal*, **12**: 3967–3975

58. **Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H. Shapiro, H. M. (2000):** Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 827–834
59. ***Page, R., Peti, W. (2016):** Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*, **12**: 208
60. **Pfaffl M. W. (2001):** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**: 2003–2007
61. ***Poolman, B., Konings, W.N. (1993):** Secondary solute transport in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, **1183**: 5–39
62. ***Proctor, R. A., Von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., et al. (2006):** Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, **4**: 295–305
63. ***Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.H., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Li, M., Otto, M. (2008):** RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Cell*, **32**: 150–158
64. ***Reyes, D., Andrey, D.O., Monod, A., Kelley, W.L., Zhang, G., Cheung, A.L. (2011):** Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **193**: 6020–6031
65. ***Ron, E.Z. (2013):** Bacterial stress response, pp. 589–603. In Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F. (eds.), *The prokaryotes: Prokaryotic physiology and biochemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Germany.
66. **Ronneau, S., Helaine, S. (2019):** Clarifying the link between toxin–antitoxin modules and bacterial persistence. *Journal of Molecular Biology*, **431**: 3462–3471
67. **Salcedo-Sora, J.E., Kell, D.B. (2020):** A quantitative survey of bacterial persistence in the presence of antibiotics: Towards antipersister antimicrobial discovery. *Antibiotics*, **9**: 508.
68. ***Senn, M.M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., Fluckiger, U., Berger-Bachi, B., Bischoff, M. (2005):** Molecular analysis and organization of the sigmaB operon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **187**: 8006–8019
69. **Schneewind, O., Missiakas, D. (2014):** Genetic manipulation of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, **32**: UNIT 9C.3
70. ***Sirec, T., Benarroch, J. M., Buffard, P., Garcia-Ojalvo, J., Asally, M. (2019):** Electrical polarization enables integrative quality control during bacterial differentiation into spores. *iScience*, **16**: 378–389

71. ***Somerville, G.A., Proctor, R.A. (2009):** At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **73**: 233–248
72. ***Sonenshein, A.L. (2005):** CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **8**: 203–207
73. **Sporer, A.J., Kahl, L.J., Price-Whelan, A., Dietrich, L.E.P. (2017):** Redox-based regulation of bacterial development and behavior. *Annual Review of Biochemistry*, **86**: 777–797
74. **Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., Blázquez-Castro, A. (2018):** Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, **120**: 159–167
75. **Suligoy, C.M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., González, C.D., Alvarez, L.P., Robinson, D.A., Gómez, M.I., Buzzola, F.R., Sordelli, D.O. (2018):** Mutation of Agr is associated with the adaptation of *Staphylococcus aureus* to the host during chronic osteomyelitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**: 18
76. **T., Wang, X. Y., Cui, P., Zhang, Y. M., Zhang, W. H., Zhang, Y. (2017):** The Agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, **8**: 1–13
77. ***Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F., Arrow, A. S. (1987):** Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiological Reviews*, **51**: 439–457
78. ***Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., and Fowler, V.G. (2015):** *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, **28**: 603–661
79. **Trastoy, R., Manso, T., Fernández-García, L., Blasco, L., Ambroa, A., Pérez del Molino, M.L., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T.K., Tomás, M. (2018):** Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clinical Microbiology Review*, **31**: e00023-18
80. **Tuscherr, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pförtner, H., Niemann, S., Geraci, J., Van de Vyver, H., Fraunholz, M.J., Cheung, A.L., Herrmann, M., Völker, U., Sordelli, D.O., Peters, G., Löffler, B., (2015):** Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. *PLOS Pathogens*, **11**: e1004870
81. ***Tuscherr, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., et al. (2010):** *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *The Journal of Infectious Diseases*, **202**: 1031–1040
82. **656047 Tuscherr, L., Löffler, B., Proctor, R.A. (2020):** Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple metabolic pathways impact the expression of virulence factors in small-colony variants (SCVs). *Frontiers in Microbiology*, **11**: 1028
83. **Valtová., A. (2020):** Metody charakterizace perzistentního stavu po působení vybraných antibiotik u *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha

84. Verstraeten, N., Knapen, W.J., Kint, C.I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J.E., Fu, Q., David, C.C., Fierro, A.C., Marchal, K., Beirlant, J., Versées, W., Hofkens, J., Jansen, M., Fauvart, M., Michiels, J. (2015): Opg and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Molecular Cell*, **59**: 9–21
85. *Villanueva, M., Garcia, B., Valle, J., Rapun, B., Ruiz de Los Mozos, I., Solano, C., Marti, M., Penades, J.R., Toledo-Arana, A., Lasa, I. (2018): Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nature Communications*, **9**: 523
86. Wang, B., Muir, T.W. (2016): Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular mechanisms and remaining puzzles. *Cell Chemical Biology*, **23**: 214–224
87. Wang, T., El Meouche, I., Dunlop, M.J. (2017): Bacterial persistence induced by salicylate via reactive oxygen species. *Scientific Reports*, **7**: 1 -7
88. Wang, Y., Bojer, M.S., George, S.E., Wang, Z., Jensen, P.R., Wolz, C., Ingmer, H. (2018): Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Scientific Reports*, **8**: 10849
89. White. M.J., Boyd, J.M., Horswill, A.R., Nauseef, W.M. (2014). Citované podľa Jenul, C., Horswill, A.R. (2019): Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology Spectrum*, **7**: 7.2.29
90. Wilmaerts, D., Windels, E.M., Verstraeten, N., Michiels, J. (2019): General mechanisms leading to persister formation and awakening. *Trends in Genetics*, **35**: 401–411
91. Xia, G., Wolz, C. (2014): Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution* **21**: 593–601
92. Xu, T., Wang, X.-Y., Cui, P., Zhang, Y.-M., Zhang, W.-H., Zhang, Y. (2017): The Agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, **8**: 2189
93. Xu, Y., Zhang, B., Wang, L., Jing, T., Chen, J., Xu, X., Zhang, W., Zhang, Y., Han, J. (2020): Unusual features and molecular pathways of *Staphylococcus aureus* L-form bacteria. *Microbial Pathogenesis*, **140**: 103970

Označenie *: Sekundárna citácia