

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 v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Lucie Kubištová

Studium fenoménu perzistence u *Staphylococcus aureus*

Study of persistence phenomenon at *Staphylococcus aureus*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 13. srpna 2015

.....

Poděkování

Děkuji především mé školitelce RNDr. Ireně Liché za odborné vedení, podnětné rady, trpělivost a pomoc během práce v laboratoři i během sepisování diplomové práce.

Děkuji Mgr. Borisovi Ryabchenko za obětavou pomoc s metodou qPCR, bez něj bychom si tuto metodu asi nezvládli osvojit.

Děkuji kolektivu laboratoře 101 za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji mé rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Bakterie *Staphylococcus aureus* jsou lidské patogeny, které způsobují onemocnění různě závažného charakteru od lehkých infekcí kůže po těžké septické stavy. *S. aureus* často osidluje plíce pacientů s cystickou fibrózou a způsobuje dlouho trvající pneumonie, které pro tyto pacienty mohou být smrtelné. Infekce způsobené bakteriemi *S. aureus* se jako většina infekcí léčí antibiotiky. Neúspěšnost léčby často způsobuje přítomnost rezistentních kmenů. Bylo ale zjištěno, že na selhávání léčby má podíl i jiný typ odolnosti k antibiotikům – perzistence. Perzisteři jsou fenotypové varianty isogenní bakteriální populace, které jsou odolné k působení antibiotikům, i když nemají genetické determinanty podmiňující rezistenci. Fenomén perzistence u bakterií je zatím poměrně málo prozkoumaný jev.

Cílem mé diplomové práce bylo přispět k charakterizaci perzistence u *S. aureus*. Optimalizovali jsme metodu rychlé identifikace počtu perzisterů v bakteriální populaci po působení antibiotik metodou měření křivek hynutí. Touto metodou jsme dále zjistili, že vystavení osmotickému stresu způsobuje zvýšení počtu perzisterů v populaci o 1 – 2,5 řádu oproti nestresované kultuře. Dále jsme metodou kvantitativní PCR analyzovali expresi alternativního sigma faktoru *sigB*. Zjistili jsme, že *sigB* se exprimuje v podmínkách růstu s antibiotiky i při osmotickém stresu. Metodou průtokové cytometrie za použití fluorescenčních značek SYTOX green a C₁₂-resazurin jsme určili počet živých a mrtvých buněk v populaci po působení testovaných antibiotik. Touto metodou jsme především chtěli identifikovat dormantní populaci, která často představuje perzistery. Metodu se nám ale zatím nepodařilo optimalizovat a tuto dormantní populaci jsme nemohli kvantifikovat. Do budoucna ale tato metoda po optimalizaci představuje užitečný nástroj pro rychlou identifikaci fyziologického stavu populace po působení antibiotik a tím může urychlit i zkoumání vzniku perzisterů.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, perzistence, působení antibiotik, křivka hynutí, *sigB*, stresová odpověď

Abstract

Staphylococcus aureus is human pathogen and is causative factor of many diseases with different character, from light infections of the skin to life-threatening sepsis. *S. aureus* often colonizes cystic fibrosis patient's lungs and causes long-standing pneumonia, which can cause death in these patients. Infection caused by *S. aureus* are, as most of the infections, treated with antibiotics. Failure in treatment is caused because of presence of resistant strains. It was shown, that treatment failure can be caused by different type of the antibiotic tolerance – by the persistence. Persisters are phenotypic variants of isogenic bacterial population, that is unaffected by antibiotic treatment even though they don't have genetics determinants of the resistance. The phenomenon of the persistence in bacteria is still relatively poorly understood.

The aim of my thesis was to contribute to the characterization of the persistence in *S. aureus*. We have optimized a method for rapid identification of persisters' amount in the bacterial population after treatment with antibiotics using the method of measuring the killing curves. We have found out, that exposure to osmotic stress causes increase in number of persistence in the bacterial population by 1 – 2,5 order. Using quantitative PCR method we have analyzed the alternative sigma factor *sigB* expression. We have found out, that *sigB* is expressed in growth conditions with antibiotics, and during osmotic stress. Using flow cytometry with fluorescence probes SYTOX green and C₁₂-resazurin we have identified numbers of live and dead cells in the population after antibiotic treatment. We primarily wanted to identify dormant population, which often represents persisters. We have not yet succeed in optimizing this method and this dormant population cannot be quantified. In the future, however, this method seems to be a useful tool for the rapid identification of physiological state population after treatment with antibiotics, and it may accelerate study of persistence.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, persistence, antibiotic treatment, killing curve, *sigB*, stress response

Obsah

Seznam zkratk	9
1 ÚVOD	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1 Historie studia fenoménu perzistence	12
2.2 Podíl perzisterů na chronických infekčních onemocněních	13
2.3 Charakteristika perzisterů na populační úrovni	15
2.4 Strategie perzisterů pro přežití	18
2.5 Mechanizmy vzniku perzistence	21
2.5.1 Vznik na základě vnějšího signálu	23
2.5.1.1 Limitace živin	23
2.5.1.2 Faktory vedoucí k SOS odpovědi	24
2.5.1.3 Signalizace prostřednictvím malých molekul	24
2.5.2 Stochastický vznik	25
2.6 Vliv stresu a aktivace sigma faktoru SigB na formování perzisterů u <i>S. aureus</i>	26
2.6.1 Struktura a regulace <i>sigB</i> operonu u <i>B. subtilis</i> a <i>S. aureus</i>	27
2.6.2 Fyziologická funkce obecné stresové odpovědi u <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.6.3 SigB a formování perzisterů u <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3 MATERIÁL A METODY	32
3.1 Materiál	32
3.1.1 Bakteriální kmeny	32
3.1.2 Kultivační média	32
3.1.2.1 Komplexní média	32
3.1.2.2 Médium BHI pro osmotický stres	33
3.1.3 Antibiotika	33
3.1.4 Enzymy	34
3.1.5 Chemikálie	34
3.1.6 Roztoky	35

3.1.6.1	Pufry pro horizontální gelovou elektroforézu	35
3.1.6.2	Roztok 1% NaCl (w/v).....	36
3.1.6.3	DEPC-H ₂ O	36
3.1.6.4	Zásobní roztok paraquatu 0,2 M	36
3.1.6.5	Zásobní roztok PBS (fosfátový pufr) 0,2 M.....	36
3.1.7	Primery pro qPCR.....	37
3.1.8	Komerční soupravy	37
3.1.9	Programy	37
3.1.10	Přístroje a laboratorní vybavení	38
3.2	Metody	39
3.2.1	Sterilizace v autoklávu	39
3.2.2	Práce s bakteriální kulturou.....	39
3.2.2.1	Kultivace v tekutém médiu	39
3.2.2.2	Měření hustoty bakteriální populace v tekutém médiu	39
3.2.2.3	Uchovávání bakteriálních kmenů.....	39
3.2.3	Určení minimální inhibiční koncentrace paraquat dichloridu	39
3.2.3.1	Diluční metoda.....	40
3.2.3.2	Disková difuzní metoda	40
3.2.4	Růstová křivka	40
3.2.5	Krátkodobé křivky hynutí	40
3.2.5.1	Křivka hynutí s antibiotikem.....	41
3.2.5.2	Křivka hynutí stresované kultury s antibiotikem	41
3.2.6	Testování na rezistentní buňky.....	42
3.2.7	Sběr buněk pro izolaci RNA	42
3.2.7.1	Sběr buněk vystavených působení antibiotik a paraquat dichloridu pro izolaci RNA	42
3.2.7.2	Sběr buněk vystavených osmotickému stresu pro izolaci RNA.....	43
3.2.8	Izolace chromozomální DNA.....	43

3.2.9	Izolace RNA.....	44
3.2.10	Převod RNA na cDNA.....	45
3.2.11	Separace nukleových kyselin pomocí horizontální gelové elektroforézy	46
3.2.12	Kontrola funkčnosti primerů pro qPCR metodou standartní PCR	46
3.2.13	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	47
3.2.14	Průtoková cytometrie	48
4	VÝSLEDKY	50
4.1	Růstové vlastnosti kmene <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50
4.2	Testování citlivosti referenčního kmene <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 k vybraným antibiotikům a paraquat dichloridu	51
4.2.1	Stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik	51
4.2.2	Testování citlivosti k paraquat dichloridu.....	52
4.3	Sledování vzniku perzisterů v krátkodobém časovém horizontu.....	54
4.3.1	Křivky hynutí v podmínkách s antibiotikem.....	55
4.3.2	Křivky hynutí stresované kultury s antibiotikem	57
4.3.3	Testování na rezistentní mutanty.....	59
4.4	Sledování exprese genu <i>sigB</i> metodou kvantitativní PCR.....	60
4.4.1	Izolace celkové RNA	60
4.4.2	Převod celkové RNA na cDNA	61
4.4.3	Testování primerů metodou standartní PCR	62
4.4.4	Kvantitativní PCR (qPCR).....	63
4.4.4.1	Kvantifikace exprese.....	64
4.5	Měření vitality buněk metodou průtokové cytometrie	67
5	DISKUZE.....	74
6	ZÁVĚR	81
7	SEZNAM LITERATURY	82

Seznam zkratek

(p)ppGpp	Guanosin tetra/pentafosfát
ATP	Adenosintrifosfát
BHI	Brain-heart infusion
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
FACS	Fluorescence activated cell sorting
LALS	Large angle light scattering
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
PQ	Paraquat dichlorid
QS	Quorum sensing
SALS	Small angle light scattering
SarA	Staphylococcal accessory regulator A
SCVs	Small-colony variants
SHX	Serin hydroxamát
TA	Toxin-antitoxin

1 ÚVOD

Bakterie *Staphylococcus aureus* jsou grampozitivní kokovité bakterie, které se uspořádávají do hroznovitých útvarů. Jsou nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní, kataláza a koaguláza pozitivní. Na krevním agaru rostou v malých hladkých žlutých koloniích, okolo kterých tvoří zónu β -hemolýzy. S modelovým organismem *Bacillus subtilis* patří do řádu Bacillales.

S. aureus je významný lidský patogen. Způsobuje onemocnění různě závažného charakteru od banálních infekcí kůže a tkání, vážnější onemocnění vnitřních orgánů až po život ohrožující septické stavy a intoxikace (Lowy, 1998).

Již pár let po zavedení penicilinu do klinické praxe se objevily první rezistentní kmeny. S tím začaly probíhat rozsáhlé studie zkoumající mechanismy rezistence u bakterií. V době počátků léčby antibiotiky byl ale objeven i jiný zajímavý mechanismus odolnosti k antibiotikům – perzistence (Bigger, 1944). Studium perzistence bylo ale vytlačeno studiemi mechanismů rezistence, systematické studie perzistence se začaly provádět až na přelomu 20. a 21. století, kdy začalo být čím dál tím více zřejmé, že se perzisteři podílí na mnoha chronických onemocněních a jsou mnohdy příčinou neúspěšnosti léčby antibiotiky.

Perzistentní bakterie, perzisteři, jsou fenotypové varianty, které se vyznačují odolností k antibiotikům. Nenesou ale žádné geny pro rezistence k antibiotikům, nejsou to rezistentní buňky (Bigger, 1944). V některých literárních zdrojích se odlišuje perzistence, dormance, latence atd., v této práci je termín perzistence používán pro fenotyp splňující charakteristiky popsané výše, to například znamená, že dormantní buňky mohou být perzisteři.

Studium fenoménu perzistence u bakterií *S. aureus* je tématem mé diplomové práce. Perzistence u *S. aureus* není stále příliš prozkoumaný jev, proto se v přehledu literatury věnuji perzistenci na obecné úrovni, zároveň jsem tím chtěla ukázat komplexnost tohoto fenoménu. U různých bakterií byly studovány mechanismy, které jim umožňují přežít působení antibiotik, nejrozšířenější strategie se zdá být navození stavu dormance (Balaban et al., 2004; Keren et al., 2004a). Přesný mechanismus ale není doposud znám a vědecká komunita není stále jednotná v názoru na vznik tohoto fenoménu.

Recentní studie naznačují, že perzistence má velký význam u rekurentních infekcí pacientů s cystickou fibrózou (Fodor et al., 2012). Cystická fibróza se mimo jiné projevuje fyziologickými změnami v epitelu plic a gastrointestinálního traktu. Plíce těchto pacientů jsou

náchylné k infekcím, se kterými tito pacienti bojují celý život a často jsou příčinou úmrtí. Perzisteri *S. aureus* jsou často původci těchto infekcí (Kahl et al., 1998).

Mezi nejvíce studovaný perzistentní fenotyp *S. aureus* patří varianty tvořící tzv. trpasličí kolonie SCVs (small-colony variants). Tyto varianty jsou často izolovány z plic pacientů s cystickou fibrózou. SCVs *S. aureus* se vyznačují zpomaleným růstem, proto tvoří malé kolonie, absencí pigmentace a hemolýzy (Melter and Radojevič, 2010).

Cílem práce bylo přispět k základní charakterizaci perzistence u *S. aureus* s ohledem na výskyt perzisterů v plicích pacientů s cystickou fibrózou. Věnovali jsme se studiu perzistence na populační úrovni, sledovali jsme aktivitu alternativního sigma faktoru SigB po působení různých antibiotik, po navození oxidativního a osmotického stresu a zkoumali spojitost mezi aktivací SigB a výskytem perzistence. Práce je součástí projektu laboratoře Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, který má za cíl charakterizovat perzistenci bakterií *S. aureus* u pacientů s cystickou fibrózou. Zároveň se nepřímou drží dlouhodobé tematiky naší laboratoře, která je adaptace bakterií *B. subtilis* na stres, jelikož se zdá, že perzistence je strategie adaptace na stresové podmínky.

Hlavní cíle mé diplomové práce byly:

1. Zavedení metody pro efektivní sledování vzniku perzisterů
2. Sledovat toleranci bakteriální populace k působení různých antibiotik v krátkodobém časovém horizontu.
3. Zjistit, zda existuje spojitost mezi stresem, expresí *sigB* a vznikem perzistence
4. Metodou průtokové cytometrie charakterizovat fyziologický stav buněk v populaci po působení antibiotik.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Historie studia fenoménu perzistence

Perzisteři představují frakci bakteriální populace, která vykazuje odolnost k antibiotikům přesto, že nemá genetické determinanty antibiotikové rezistence, například enzym β -laktamázu. Perzisteři mají zřejmě velký význam v chronických infekcích. Základní popis tohoto „zvláštního“ chování části bakteriální populace *Staphylococcus aureus* publikoval již v roce 1944, krátce po zavedení penicilinu do klinické praxe, armádní lékař J. W. Bigger (Bigger, 1944), kdy si všiml, že i po řádné léčbě dochází u části pacientům k návratu infekce a že tato populace buněk není rezistentní, rezistence bakterií k penicilinu byla popsána již v roce 1940 (Abraham and Chain, 1940). Po tomto pozorování provedl následující experimenty. Pěstoval kulturu *Staphylococcus aureus* (tehdejší název *Staphylococcus pyogenes*) s penicilinem, vysel vzorek z této tekuté kultury na misku s živným agarem a zjistil, že z celé populace přežilo 10^{-6} bakterií. Tyto přeživší reinokuloval do čistého tekutého média, poté přidal penicilin. Populace bakterií, kterou v předchozím pokusu izoloval, nebyla rezistentní a přežilo stejné množství bakterií jako v předchozím pokusu. Tuto frakci bakterií, která podle něj představuje buňky v dormantním stavu, nazval perzistery,

Kromě ojedinělých publikací široce popisujících stejné poznatky jako Bigger, pouze u jiných bakterií, například *Mycobacterium tuberculosis* (dříve tuberkulózní bacil) nebo streptokoků (Mc Dermott, 1958, 1959), nebyly v této oblasti učiněny žádné převratné objevy až do 80. let 20. století. Toto téma bylo znovu otevřeno americkými vědci Moyedem a Bertrendem, kteří izolovali perzistentní varianty *Escherichia coli* K-12 nazvané Hip (high persistence – vysoce perzistentní) mutanty (Moyed and Bertrand, 1983). Tyto mutanty, které tvořili perzistentní fenotyp s frekvencí 10^{-2} , izolovali opakovaným pěstováním přeživších buněk v médiu s ampicilinem. Pro další studium tohoto jevu šlo o významný objev, jelikož obvyklé malé množství perzisterů v bakteriální populaci znesnadňovalo jejich podrobnější zkoumání. U těchto mutant objevili genetickým mapováním nový gen o neznámé funkci, který nazvali *hipA*. Šlo o první pokusy určení genetického pozadí perzisterů. Později byla zjištěna přesná funkce genu *hipA*, kóduje toxin v toxin-antitoxin modulu *hipBA* (Black et al., 1991; Germain et al., 2013).

Počátkem nového tisíciletí se, spolu s neustále závažnějším problémem rezistence bakterií, dostává fenoménu perzistence stále většího zájmu vědců, kteří postupně odhalují, jak je vznik perzistentního fenotypu komplexní jev s mnoha různými strategiemi přežívání.

2.2 Podíl perzisterů na chronických infekčních onemocněních

Vztahu mezi perzistentním fenotypem a stále se vracejícími infekcemi si všimli již J. W. Bigger (Bigger, 1944), avšak po mnoho let nebyla této problematice věnována pozornost, jelikož se většina vědců věnovala studiu rezistence k antibiotikům. Postupně s dalšími poznatky bylo jasné, že perzisteři mají nepopiratelný podíl na přetrvávání některých chronických a rekurentních infekcích a jsou tak vedle rezistentních bakterií příčinou selhávání léčby u některých infekčních onemocnění (Levin and Rozen, 2006; Lewis, 2007, 2010a). U jinak zdravých pacientů ale většinou perzisteři nepředstavují závažnou překážku ve vyléčení. Antibiotika eliminují majoritní citlivou bakteriální populaci a imunitní systém si obvykle poradí se zbývající populací perzisterů. Problém nastává u imunodeficientních pacientů, například HIV pozitivních nebo po chemoterapii, kdy jejich imunitní systém není schopný tuto k antibiotikům odolnou populaci eliminovat.

Mnoho chronických infekcí je spojeno s tvorbou biofilmu. Jde především o infekce spojené s cizím tělesem, tedy například s katetry a s kloubní náhradami, dále pak infekce ran a pneumonie. Bariéra biofilmu může zabránit pronikání antibiotik a antimikrobiálních peptidů k bakteriím a ztížit tak úplné odstranění infekce i u imunokompetentních osob. Bakterie jsou v biofilmu chráněné převážně mechanicky. K přetrvávání bakterií v biofilmu přispívá také přítomnost perzistentních fenotypových variant (Brooun et al., 2000; Chen and Wen, 2011; Lewis, 2001). Po zdánlivém vyléčení a ukončení podávání antibiotik se z tohoto rezervoáru v biofilmu opět plně rozvine infekce.

Dále uvádím mikroorganismy schopné tvořit perzistery, které jsou pro svou závažnost a častý výskyt ve spojitosti s rekurentními a chronickými infekcemi nejvýznamnější.

Nejen kvůli své závažnosti je ve spojitosti s onemocněním nejvíc studovaná a diskutovaná perzistence u *Mycobacterium tuberculosis*, mykobakterie způsobující tuberkulózu nejen u imunodeficientních pacientů. Vzhledem k chronické povaze onemocnění (McCune and Tompsett, 1956), kdy bakterie různou dobu přetrvávají v latentní formě, která je způsobena zastavením nebo zpomalením růstu bakterií a jejich přetrvávání v makrofázích, bylo navrženo, že tyto odolné formy mohou být perzistentní varianty (Bentrup and Russell, 2001; Gomez and McKinney, 2004; Stewart et al., 2003; Wayne and Sohaskey, 2001).

Vracející se infekce ran způsobené bakteriemi *Staphylococcus aureus* popsal již J.W. Bigger (Bigger, 1944). Dnes je zřejmé, že chronické infekce *S. aureus* jsou často infekce spojené s tvorbou biofilmu nebo trpasličích kolonií, tzv. small-colony variants (SCVs), které

jsou často auxotrofní na hemin, menadion nebo thymin a vyznačují se zpomaleným růstem (Melter and Radojevič, 2010). Mezi chronická onemocnění *S. aureus* patří infekce ran, osteomyelitida, endokarditida a bakteriémie (Abele-Horn et al., 2000; Davis et al., 2008; von Eiff et al., 1997; Proctor et al., 1995) ale i multiorgánové infekce (Agarwal et al., 2007).

S. aureus se spolu s *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* a dalšími bakteriemi často vyskytuje v plicích lidí trpících cystickou fibrózou (CF). Zastoupení jednotlivých mikroorganismů se v čase mění (Razvi et al., 2009; Valenza et al., 2008). Tyto bakterie se adaptují na prostředí plic postižených následky CF a přežívají jako perzistentní fenotypové varianty dlouhodobou antibiotikovou terapií, která má na jejich populaci mnohdy pouze malý vliv (Fodor et al., 2012).

CF je dědičné onemocnění způsobené mutací genu kódující CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) protein, který slouží v epiteliálních buňkách jako chloridový a sodný kanál, podílí se i na transportu hydrogenuhličitanu (Quinton, 2008; Reisin et al., 1994; Schwiebert et al., 1995). Následek této mutace dochází u pacientů ke zvýšení koncentrace chloridových iontů v potu, dýchacích cestách a gastrointestinálním traktu. Zvýšená koncentrace chloridových iontů způsobuje reabsorpci sodíku spolu s vodou a tím k zahuštění hlenu (Matsui et al., 1998). To vede ke ztenčení ochranné hlenové vrstvy v plicích a zmenšení řasinek (Worlitzsch et al., 2002), a tím i k redukované ochraně epitelu plic před infekcemi. Izotonické prostředí navíc brání správné funkci antimikrobiálních peptidů (Goldman et al., 1997). Tito pacienti se proto celý život potýkají se stále vracejícími pneumoniemi a celý život jsou léčeni velkými dávkami antibiotik.

Jednou ze strategií přežívání *S. aureus* v plicích pacientů s CF je tvorba variant rostoucích v malých, tzv. trpasličích koloniích SCVs. Tyto varianty se vyznačují zpomaleným růstem, redukovanou pigmentací, redukovanou produkcí hemolyzinů a zvýšenou odolností k aminoglykosidům. Díky takto změněnému fenotypu jsou obtížně detekovatelné (Kahl et al., 1998). Schopnost *S. aureus* tvořit biofilm a regulace exprese genů pro faktory virulence mohou být dalšími strategiemi pro perzistentní přežívání v plicích pacientů s CF (Goerke and Wolz, 2010). *P. aeruginosa* v plicích pacientů s CF často produkuje perzistery s velkou efektivitou, selektují se Hip (high persistence) mutanty, které i když jejich genom neobsahuje geny zodpovědné za rezistenci k antibiotikům, přežívají i po léčbě antibiotiky (Mulcahy et al., 2010). Tvoří varianty SCVs (Häubler et al., 1999) nebo mukoidní varianty, které formují mikrokolonie a jsou chráněné alginátem (Lam et al., 1980), předpokládá se, že tyto struktury vytváří v plicích biofilm (Singh et al., 2000).

Perzistence *P. aeruginosa* je spojena s dalšími nemocemi, jako jsou infekce implantátů a ran, kde přežívají v biofilmu (Harrison-Balestra et al., 2003; Ward et al., 1992).

Perzistentní fenotyp se vyskytuje nejen u bakterií, ale byl zjištěn též u eukaryotních mikroorganismů. *Candida albicans* je kvasinka způsobující infekci kandidózu především u imunodeficientních pacientů. Často se vyskytuje ve formě biofilmu na lékařských implantátech (Ramage et al., 2006). Bylo zjištěno, že tyto kvasinky v biofilmu mohou dlouhodobě odolávat antifungálním látkám, aniž by byly geneticky rezistentní (LaFleur et al., 2006). Z ústní dutiny pacientů trpící dlouhodobou kandidózou byli izolovány Hip (high persistence) mutanty, jejichž populace podobně jako u bakteriálních perzisterů tvoří perzistentní varianty s vysokou frekvencí, konkrétně 0,2-9 % (LaFleur et al., 2010).

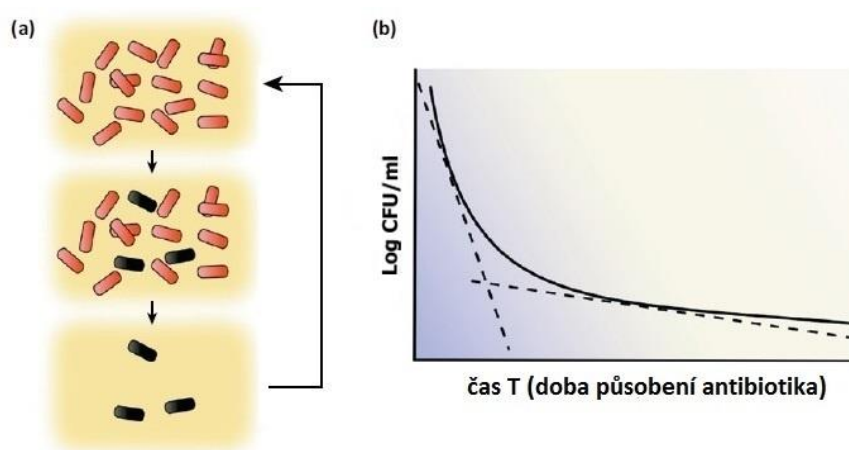
2.3 Charakteristika perzisterů na populační úrovni

Jak již bylo řečeno, perzisteři představují populaci, která je odolná k působení antibiotik, ale nejsou to rezistentní bakterie, u kterých je odolnost k antibiotikům podmíněna geneticky a jejichž odolnost k antibiotikům je v populaci stabilní. Perzisteři jsou přechodné nedědičné fenotypové varianty vzniklé z geneticky homogenní populace.

Bakteriální populace vytvářejí perzistery po kultivaci s antibiotiky různých typů. V závislosti na použitém antibiotiku a jeho koncentraci se generuje různě velká frakce perzisterů. Například frekvence tvorby bakterií s perzistentním fenotypem v kultuře *Escherichia coli* ve standardních podmínkách s použitím různých antibiotik je v rozmezí 10^{-4} až 10^{-6} (Wiuff et al., 2005). Dále bylo zjištěno, že perzisteři, kteří jsou odolní k jednomu antibiotiku, mohou být odolní i k jinému antibiotiku. Například bakterie *Escherichia coli*, které přežily kultivaci s tetracyklinem, přežily i následnou kultivaci s ciprofloxacinem (Sufya et al., 2003).

Velikost frakce perzisterů je závislá též na růstové fázi, ve které se nachází testovaná bakteriální kultura. Pokud byla kultura re-inokulováním udržována v brzké exponenciální fázi, nebyla zjištěna přítomnost žádných perzisterů. Počet perzisterů se ostře zvyšuje v pozdní exponenciální fázi a ve stacionární fázi dosahuje téměř 1 %. Bylo také zjištěno, že populace bakterií *Staphylococcus aureus* v stacionární fázi byla zcela odolná k ciprofloxacinu. Tyto výsledky naznačovaly, že bakterie ve stacionární fázi mohou být ekvivalentní k perzisterům (Keren et al., 2004a).

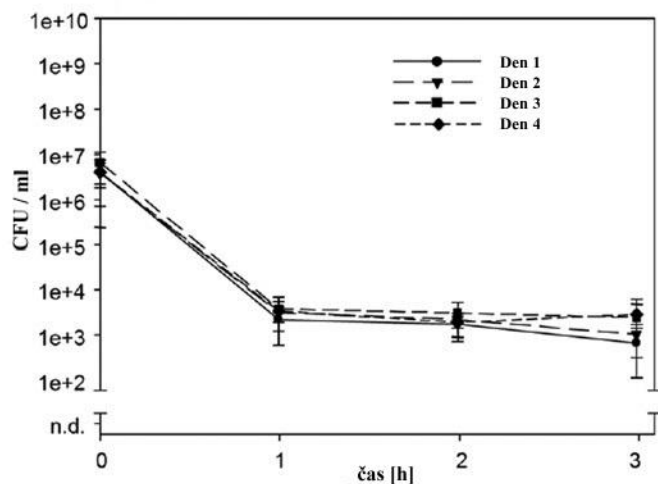
Přežívání geneticky homogenní bakteriální populace po přidání antibiotika do tekuté kultury může být měřeno pomocí vyšetí z tekuté kultury na agarové plotny v různých časových intervalech. Pokud je bakteriální populace fenotypově heterogenní a kromě citlivých variant obsahuje i perzistery, po sestavení grafu, kde na ose x je doba působení antibiotika a na ose y počet přeživších bakterií, získáme tzv. křivku hynutí, tato křivka bude mít typický bifázický průběh (obr. 1b). To znamená, že v prvních několika minutách až hodinách dochází k exponenciálnímu poklesu majoritní citlivé populace následované dlouhodobým vyrovnaným přežíváním nebo pomalým poklesem malé frakce bakterií – perzisterů. Po odstranění působení antibiotika se perzistentní populace opět rozroste, nová populace je ale stejně citlivá k antibiotiku jako původní (obr. 1a) (Balaban et al., 2004; Bigger, 1944).



Obr. 1. Výskyt perzisterů v bakteriální populaci. a) V isogenní citlivé bakteriální populaci (červeně) se s různou frekvencí tvoří perzistentní varianty (černě), které přežijí působení antibiotik (dolní obdélník). Po odstranění antibiotika z této přeživší populace opět vyrostou citlivá isogenní populace. **b)** Typická křivka hynutí bakteriální populace, ve které se vyskytují perzisteři. V první fázi dochází po přidání antibiotika do tekuté kultury bakterií k rychlému poklesu většinové citlivé populace, v druhé fázi dochází ke zpomalenému poklesu počtu přeživších perzisterů. Upraveno dle (Kint et al., 2012).

První systematická studie dynamiky vzniku perzistence byla publikována v roce 2012 skupinou Sabriny Lechner. Čtyři modelové laboratorní kmeny *S. aureus* a dva SCV kmeny *S. aureus* v exponenciální a stacionární fázi byly po dobu 24 h kultivovány v tekutém médiu postupně se šesti různými antibiotiky. Z této tekuté kultury byly každou hodinu odebrány vzorky a vyšetý na neselektivní půdu. Testováním kultury v exponenciální fázi byl ve všech podmínkách zjištěn pro kulturu s perzistery typický bifázický průběh hynutí. Křivka hynutí kultury ve stacionární fázi tento průběh nevykazovala, ve většině podmínek nedocházelo

k výraznému úbytku přeživších bakterií. Avšak za použití antibiotik tobramycinu, který inhibuje translaci a daptomycinu, který narušuje buněčnou membránu, k poklesu počtu bakterií došlo, tyto výsledky tak nepotvrdily hypotézu, že bakterie ve stacionární fázi odpovídají perzistentnímu fenotypu. Bylo zjištěno, že velikost frakce perzisterů závisí na druhu a koncentraci antibiotika, kterému je kultura vystavena, což naznačuje, že není univerzální perzistentní fenotyp, ale existuje fyziologická heterogenita perzistentní subpopulace. Velikost frakce perzisterů dále závisí na použitém kmeni, kmeny SCV vykazovaly vyšší odolnost k antibiotikům než laboratorní. Kromě těchto výsledků bylo potvrzeno, že perzistence není dědičná (obr. 2) (Lechner et al., 2012a).



Obr. 2. Testování dědičnosti perzistence. Bakterie *S. aureus* SA113 v exponenciální fázi byly po 3 hodiny kultivována s tobramycinem o koncentraci 100x MIC, následně byly přeočkovány do čistého média, kultivovány přes noc a znovu přeočkovány do čistého média. Bakterie v exponenciální fázi byly opět kultivovány s tobramycinem o koncentraci 100x MIC. V grafu je zobrazen počet přeživších bakterií v různých časech kultivace. Upraveno dle (Lechner et al., 2012a).

Výsledky této studie populační dynamiky perzisterů byly následně doplněny další publikací týmu Sabriny Lechner, kdy testovali citlivost izolovaných perzisterů na další antibiotika. Bylo zjištěno, že ve většině případů inkubace s jedním antibiotikem neposkytuje vyšší odolnost (tzv. cross-tolerance) k druhému antibiotiku. Průběh tohoto experimentu ale závisel na pořadí, v jakém byla antibiotika použita. Tyto výsledky opět naznačují heterogenitu perzistentní subpopulace (Lechner et al., 2012b).

2.4 Strategie perzisterů pro přežití

Pozorování růstové dynamiky bakteriální kultury naznačuje, že tvorba perzisterů závisí na růstové fázi kultury. To znamená zjednodušeně řečeno, čím pomaleji buňky rostou, tím více jsou odolné k antibiotikům. Perzisteři by tedy měli být buňky v dormantním stavu. Je to logická úvaha, jelikož většina antibiotik cílí na komponenty rostoucí buňky. β -laktamová antibiotika, jako například penicilin G, zabraňují polymeraci peptidoglykanu v rostoucí buňce (Hammes, 1976), aminoglykosidy, například streptomycin, se váží na ribozom a brání iniciaci proteosyntézy (Luzzatto et al., 1968) a fluorochinolony, reprezentované ciprofloxacinem, inhibují funkci DNA gyrázy, esenciálního enzymu, který se podílí na replikaci DNA, a topoizomerázy IV (Fournier and Hooper, 1998). Neefektivita nebo snížená efektivita účinku antibiotik na nerostoucí buňky byla také potvrzena několika studii (Eng et al., 1991; Tuomanen et al., 1986). Je ale zastavení růstu jediná podmínka pro vznik perzistence? A co vlastně způsobuje to, že se do stavu perzistence dostane jen část bakteriální populace?

Vzhledem k tomu, že studium fenoménu perzistence je teprve na začátku systematického studia, panuje mezi vědci značná názorová nejednotnost, která se týká zásadních otázek kladených v souvislosti s tímto tématem. Neexistuje jasná shoda, zda jsou perzisteři pouze dormantní, respektive pomalu rostoucí buňky, které by byly odolné k antibiotikům pasivně jen proto, že nerostou, nebo zda to jsou rostoucí buňky s aktivním mechanismem perzistence. Není ani shoda v tom, jestli dormance je ekvivalentní k perzistenci. Na otázku, zda jsou perzisteři opravdu jen pomalu rostoucí nebo nerostoucí buňky, odpověděl jeden z předních vědců zabývajících se touto tematikou John D. McKinney velmi trefně. Podle něj je to příklad toho, jak se hypotéza může změnit v dogma, protože vysvětlení je tak pravděpodobné, že to prostě musí být pravda (Balaban et al., 2013).

Teorii, že perzisteři jsou buňky v dormantním stádiu, navrhl na základě svého pozorování již J. W. Bigger (Bigger, 1944). Na tomto tvrzení se dnes shoduje většina vědců. Tato teorie byla podpořena mnoha novodobými studii.

V roce 2004 byla provedena první transkriptomická studie, která měla za cíl zanalyzovat expresní profil bakterií *E. coli* s perzistentním fenotypem. Byla zjištěna zvýšená exprese více než 300 genů. Mezi ně patřily geny kódující proteiny, které participují na stresových odpovědích, a co je zajímavé, také geny kódující proteiny, které blokují buněčné funkce, například TA moduly kódující buněčné toxiny a UmuDC protein, který inhibuje replikaci. Exprese přibližně 600 genů zahrnutých v buněčném metabolismu byla snížena (Keren et al.,

2004b). Transkriptomická studie *M. tuberculosis* zjistila u bakterií s perzistentním fenotypem zvýšenou expresi 350 genů, zatímco snížená exprese byla zjištěna pro 2036 genů. Mezi geny se sníženou expresí patřilo mnoho genů, jejichž produkty se účastní energetických a metabolických drah buňky (Keren et al., 2011).

S ohledem na hypotézu, že perzisteri představují nerostoucí část bakteriální populace se sníženou mírou translace, byla vyvinuta efektivní metoda na jejich izolaci z celkové bakteriální populace. Autoři studie vytvořili kmeny *E. coli* obsahující fúzi promotoru pro ribozomální gen *rrnBP1* s genem pro GFP. Gen *rrnB* kóduje 16S rRNA a je exprimován ve vysoké míře v exponenciální fázi růstu. Pomocí FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analýzy byly buňky rozděleny podle míry fluorescence, buňky s nízkou nebo žádnou mírou fluorescence byly považovány za perzistery. Tato skutečnost byla potvrzena růstovými experimenty a transkriptomickou studií s takto izolovanými buňkami (Shah et al., 2006).

Za účelem nalezení genů, které jsou zodpovědné za perzistentní fenotyp, byla studována knihovna knock-out mutant *E. coli*. Tato knihovna nazývaná Keio kolekce představovala soubor mutantních kmenů *E. coli* K-12, jejichž genom obsahoval vždy definovanou jedno genovou *in-frame* delecii v neesenciálních genech. (Baba et al., 2006). Jednotlivé mutanty byly testovány na změněnou citlivost k antibiotikům a sníženou schopnost vytvářet perzistery. Tímto způsobem ale nebyly nalezeny mutanty, které by byly plně neschopny vytvořit perzistery, což naznačuje redundanci mechanismů vedoucích k perzistenci. Byly ale nalezeny mutanty s 10x nižší mírou perzistence. Mutace byly objeveny například v genech regulujících fyziologii buňky na globální úrovni *fis*, *hns*, *hnr*, *dksA*, v genech kódujících chaperony *dnaJ* a *dnaK* a v genu *ygfA*, jehož produkt inhibuje syntézu nukleotidů. Lze tedy shrnout, že buňky, které nemohly utlumovat svůj metabolismus, vykazovaly nižší míru perzistence (Hansen et al., 2008).

V dalším experimentu s jiným přístupem ke studiu perzisterů B. W. Kwan nejprve vystavil jednu kulturu *E. coli* rifampinu, který interferuje s transkripcí a druhou kulturu tetracyklinu, který inhibuje translaci. Takto kultivované bakterie byly vystaveny působení dalších antibiotik. Vykazovaly vyšší míru perzistence než ty, na které nebylo působeno rifampinem nebo tetracyklinem (Kwan et al., 2013). I tyto výsledky podporují hypotézu, že perzisteri odpovídají dormantním buňkám. Dále říkají to, že formování perzisterů je ovlivněno vnějšími stresovými podmínkami.

Výsledky těchto studií nepochybně svědčí o tom, že dormance hraje v přežití perzisterů velkou roli. Je to tedy ale opravdu jediná strategie pro přežití? Existuje několik studií, podle kterých se zdá, že jediná strategie to není a že existuje aktivní buněčná odpověď umožňující perzistenci.

Analýzou FACS bylo s pomocí fluorescenčních reportérů buněčného dělení a metabolismu zjištěno, že i část rychle se dělící populace bakterií *E. coli* byla perzistentní, i když nedělící se populace obsahovala perzisterů 10x více (Orman and Brynildsen, 2013). Znamená to tedy, že perzistentní populace je fenotypově diverzifikovaná.

Byla publikována práce, která uvádí, že perzistence je umožněna aktivní odpovědí buňky na hladovění. Mutanty *P. aeruginosa* v genech *relA* a *spoT*, jejichž produkty jsou zásadní pro stringentní odpověď, vykazovaly nižší míru perzistence v podmínkách limitace živin než divoký kmen (Nguyen et al., 2011).

Je nutné ale poznamenat, že interpretace výsledků prací Ormana a Nguyena byly zpochybňovány. Podle (Wood et al., 2013) jejich výsledky nedokazují, že perzistence je aktivní proces, ale naznačují, že aktivní je odpověď vedoucí k perzistenci, která je představována dormantním stavem.

Hypotéza o dalším aktivním mechanismu perzistence vyvstala ze studie, která uvádí, že antibiotika nezabíjí pouze tím, že inaktivují svůj cíl v buňce, ale i tím, že generují hydroxylové radikály, které způsobují v buňce oxidativní poškození (Kohanski et al., 2007; Wang and Zhao, 2009). Hypotéza tedy byla, že perzistence může být způsobena aktivním zneškodňováním hydroxylových radikálů. Bylo zjištěno, že enzymy, které zneškodňují reaktivní kyslíkové radikály, kataláza a superoxid dismutáza přispívají, k tvorbě perzisterů (Nguyen et al., 2011; Shatalin et al., 2011). Význam hydroxylových radikálů pro zabíjení bakterií antibiotiky je ale předmětem spekulací (Keren et al., 2013; Liu and Imlay, 2013).

Ve spojitosti s infekcemi způsobené bakteriemi *Staphylococcus aureus* byly objeveny fenotypové varianty, které byly identifikovány na základě tvorby malých kolonií. Varianty byly podle tohoto znaku pojmenovány SCVs (small colony variants) a byly zjištěny i u dalších bakterií (Häubler et al., 1999; Roggenkamp et al., 1998; Wellinghausen et al., 2009). Tyto varianty *S. aureus* se dále vyznačují redukovanou pigmentací a absencí hemolýzy při pěstování na krevním agaru. Rostou pomaleji, proto tvoří menší kolonie než divoký typ (Proctor et al., 1994). Mají redukovanou expresi faktorů virulence, což přispívá k jejich obtížné dostižitelnosti pro imunitní systém (Tuchscher et al., 2011). Mezi SCV variantami *S. aureus* byly zjištěny

auxotrofní mutanty, například menadion- dependentní varianta s mutací v genu *menB* (Lannergård et al., 2008) a hemin-dependentní varianta s mutacemi v genech *hemA* a *hemH* (Schaaff et al., 2003). Tyto mutanty jsou defektní v elektron transportním řetězci, mají tedy snížený membránový potenciál a tak aktivně nepřijímají kladně nabitá aminoglykosidová antibiotika (Baumert et al., 2002). Zajímavá je schopnost SCV *S. aureus* intracelulárního růstu v endoteliálních buňkách (Tuchscherr et al., 2010).

Mykobakterie jsou odolná k působení antibiotik tím, že se nachází ve stavu dormance. Na modelu *Mycobacterium marinum* bylo demonstrováno, že se perzistentní varianty dokáží aktivně dělit v makrofázích. Po vstupu do makrofága se totiž aktivují nespecifické efluxní pumpy, které snižují intracelulární koncentraci antibiotika (Adams et al., 2011).

I když je výzkum perzistence teprve v počátcích, je zřejmé, že neexistuje jeden univerzální perzistentní fenotyp, ale že v perzistentní populaci převládá heterogenita perzisterů. Tomu nasvědčují i studie na populační úrovni popsané v kapitole 2.3. Heterogenita bakteriální populace byla prokázána týmem N. Q. Balaban, který vyvinul důmyslnou techniku studia bakteriální populace na úrovni jedné buňky. Identifikovali dva typy perzisterů, typ I představovali nerostoucí perzisteři, kteří prošli stacionární fází, typ II pak pomalu rostoucí perzistery (Balaban et al., 2004).

2.5 Mechanizmy vzniku perzistence

Jak bylo již řečeno, studium fenoménu perzistence je teprve v začátcích. To znamená, že jsme i na počátku porozumění mechanismů, které vedou k vytvoření perzistence. Hlavní otázky kladené ve spojitosti s touto problematikou jsou, zda perzistence vzniká náhodně na základě stochasticity molekulárních procesů nebo je indukována vnějším signálem. V odpovědi na tuto otázku se vědci veskrze shodují, vznik perzistence je výsledek stochastických i determinovaných procesů. Výše bylo zmíněno, že N. Q. Balaban popsala dva typy perzisterů, typ I jako nerostoucí perzistery, které prošly stacionární fází a pomalu rostoucí perzistery typu II, kteří stacionární fází neprošli (Balaban et al., 2004). V úvaze z roku 2011 ale již uvádí, že perzisteři typu I jsou ty, jejichž vznik byl indukován vnějším podnětem, naopak perzisteři typu II vznikly náhodně jako výsledek stochasticity molekulárních procesů (Balaban, 2011). Je to příklad toho, jak se poměrně rychle formují názory vědců na tuto problematiku. Další významný vědec Kim Lewis také uvádí, že perzistence je reakce na vnější podnět nebo výsledek

stochasticity molekulárních procesů, kdy perzisterie vznikají náhodně. Perzistery ale nerozděluje na typ I a typ II (Lewis, 2010b).

Další otázka souvisí s předchozím. Existují perzistentní varianty ještě před působením stresu jako součást bet-hedging strategie, kdy se bakteriální populace jistí na horší časy nebo vznikají až po stresu na základě specifické stresové odpovědi? V odpovědi na tuto otázku se již vědecká komunita neshoduje zejména proto, že existují jen nepřímé důkazy podporující jedno nebo druhé tvrzení. Metodou studia jednotlivých buněk v populaci bylo prokázáno, že perzisterie pre-existují v bakteriální populaci před působením antibiotika, což by mohlo nasvědčovat tomu, že perzisterie jsou varianty bet-hedging strategie vznikající stochasticky v rámci bakteriální populace (Balaban et al., 2004). Další studie ale ukázaly, že frekvence vzniku perzisterií závisí na velikosti inokula použitého na zaočkování čistého média (Luidalepp et al., 2011). Perzisterie v exponenciálně rostoucí kultuře tedy mohou být perzisterie z noční kultury ve stacionární fázi (Keren et al., 2004b). Stochastický pohled na vznik perzisterií reprezentuje hypotéza Persistence as Stuff Happens (PaSH) = Perzistence se prostě děje (Johnson and Levin, 2013). Postoj autora k otázce vzniku perzistence je z názvu více než jasný.

Dále bylo navrženo, že příčinou vzniku perzistence může být buněčné stárnutí, jelikož starší buňka se dělí pomaleji, což může být předpoklad pro odolnost k antibiotikům (Klapper et al., 2007).

V úvodu k této kapitole bych se chtěla ještě zmínit o tzv. toxin-antitoxin (TA) modulech. TA moduly jsou tvořeny dvěma geny v operonu, jeden gen kóduje pro buňku toxický stabilní produkt, druhý gen kóduje antitoxin, který účinky toxinu neutralizuje. Jako příklad TA modulu můžeme uvést *hipBA*, *hipB* kóduje antitoxin, *hipA* toxin. HipA je kináza, která fosforyluje glutamyl-tRNA-syntetázu a tím jí inaktivuje. Dochází k poklesu nabitých tRNA^{Glu}, to spouští syntézu (p)ppGpp proteinem RelA a dochází ke zpomalení růstu. To může způsobovat odolnost k antibiotikům (Germain et al., 2013). Gen *hipA* byl první genetická determinanta objevená ve spojitosti s perzistencí (Moyed and Bertrand, 1983).

U bakterií *S. aureus* byly zatím nalezeny tři TA moduly, nejstudovanější je *mazEF*. Toxin MazF je RNáza, která štěpí mRNA pro buňku důležitých genů a dochází k zastavení růstu (Fu et al., 2009). Díky aktivitě MazF vykazuje bakterie zvýšenou odolnost k β -laktamovým antibiotikům (Schuster et al., 2015).

Geny TA modulů byly nalezeny jak na plazmidech, tak na chromozomu (Pandey and Gerdes, 2005). Diskutuje se podíl TA modulů na distribuci plazmidů (Van Melderen, 2001),

avšak jejich význam stále není úplně jasný. Poměrně jasný je ale jejich vliv na formování perzisterů, který vyplývá i z transkriptomických studií, které ukázaly, že exprese TA modulů je u perzisterů zvýšena. Experimentální zvýšení produkce toxinu v buňce vedlo k větší odolnosti bakteriální populace (Keren et al., 2004b, 2011; Shah et al., 2006). Zdá se, že TA moduly participují jak na deterministickém vzniku perzisterů, tak stochastickém, jejich význam pro tyto dvě odlišné cesty vedoucí ke vzniku perzistence bude diskutován v dalších kapitolách.

2.5.1 Vznik na základě vnějšího signálu

Bakterie jsou vystaveny vnějším podmínkám, na které musí reagovat přizpůsobením své fyziologie. U některých vnějších vlivů bylo zjištěno, že spouštějí formování perzistentního fenotypu. Dále uvádím jejich výčet.

2.5.1.1 Limitace živin

Bakterie se často potýkají s nedostatkem živin. Nedostatek aminokyselin a/nebo zdroje uhlíku spouští stringentní odpověď. Výsledkem je zpomalení růstu. Pro spuštění stringentní odpovědi jsou nejdůležitější dva proteiny, RelA a SpoT. RelA je protein asociován s ribozomem, pokud do A místa ribozomu vstoupí nenabitá tRNA, protein začne syntetizovat guanosin tetra/pentafosfát (p)ppGpp. Při nedostatku zdroje uhlíku začne (p)ppGpp syntetizovat protein SpoT. Zvýšená hladina alarmonu (p)ppGpp má za následek globální změny ve fyziologii buňky vedoucí k zpomalení růstu a metabolismu (Cashel and Gallant, 1969; Haseltine and Block, 1973; Metzger et al., 1989).

U mnoha bakterií bylo zjištěno, že hladovění je asociováno se vznikem perzistence, není ale jasné, zda hladovění vždy vede k perzistenci (Fung et al., 2010). Jak již bylo popsáno výše, u bakterií *E. coli* toxin HipA způsobuje snížení koncentrace nabitých tRNA^{Glu} v buňce a tím spouští stringentní odpověď, která dostane buňky do stavu dormance. U Hip mutant (high persistence) je vyšší hladina volného HipA toxinu způsobená mutantní alelou *hipA7*, jejíž produkt má nižší afinitu k HipB antitoxinu (Korch et al., 2003; Rotem et al., 2010). Tyto varianty tvoří perzistery s frekvencí 10^{-2} . Knock-out genů *relA* a *spoT* u Hip mutant způsobil, že perzisteri vůbec nevznikali. Je tedy zřejmé, že vznik perzisterů je ovlivněn hladinou (p)ppGpp, která se zvyšuje při hladovění (Korch et al., 2003).

Tato hypotéza byla podpořena dalším experimentem, kdy byl porovnán vznik perzisterů u knock-out mutant *relA* a *spoT* *Pseudomonas aeruginosa* ve dvou podmínkách. Tyto mutanty byly pěstovány v médiu, které obsahovalo nebo neobsahovalo funkční analog (p)ppGpp stimulující stringentní odpověď serin hydroxamát (SHX). Počet perzisterů vzniklých pěstováním v médiu s SHX byl o dva řády vyšší než perzisterů vzniklých v médiu bez SHX (Nguyen et al., 2011).

Mutace *relA* u *S. aureus*, která způsobuje permanentní aktivaci stringentní odpovědi způsobila vznik Hip fenotypu (Gao et al., 2010). Spojitost hladovění a formování perzistence byla nalezena i u *Mycobacterium tuberculosis* (Betts et al., 2002).

2.5.1.2 Faktory vedoucí k SOS odpovědi

SOS odpověď se spouští při poškození DNA, které může být způsobeno reaktivními kyslíkovými radikály nebo chinolovými a fluorochinolovými antibiotiky. Jedno vláknové zlomy v DNA inaktivují LexA represor, který se váže na SOS box. Tím se aktivují geny pro opravu zlomů, např. *recA* a *recB*. Dále dochází k zastavení růstu (Radman, 1975).

Fluorochinolony indukují SOS odpověď u *E. coli* a tím umožňují přežívání s tímto antibiotikem. Bylo zjištěno, že mutanty *E. coli* v klíčových genech SOS odpovědi *recA*, *recB*, *lexA* vykazují sníženou odolnost k ciprofloxacinu a ofloxacinu (Dörr et al., 2009; Wu et al., 2012a). Naopak konstitutivní exprese těchto genů způsobuje nárůst počtu perzisterů v populaci (Dörr et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že k perzistenci indukované SOS odpovědí nepřispívá jen oprava zlomů v DNA. Při SOS odpovědi se aktivuje exprese toxinu TisB, který je součástí TA modulu *tisAB* (Dörr et al., 2010; Vogel et al., 2004). TisB je peptid, který se váže na vnitřní membránu, kterou poškozuje, tím dochází k poklesu protonmotivní síly a poklesu hladiny ATP (Unoson and Wagner, 2008). To způsobuje navození stavu dormance a perzistenci. SOS odpověď může být experimentálně indukována paraquat dichloridem (PQ). Buňky vystavené PQ vykazují vyšší míru odolnosti k fluorochinolonům než buňky, které PQ nebyly vystaveny (Wu et al., 2012a).

2.5.1.3 Signalizace prostřednictvím malých molekul

Jelikož je perzistence strategie pro přežití, ke které se uchyluje jen část populace a jelikož poměr perzisterů v bakteriální populaci se zvyšuje v pozdní exponenciální fázi spolu se

zvyšujícím se počtem bakterií v populaci, dalo by se uvažovat o tom, že na formování perzisterů může mít vliv bakteriální komunikace prostřednictvím malých molekul – quorum sensing (QS).

U *Pseudomonas aeruginosa* delece genů QS systému *lasR* a *lasI* způsobila, že bakterie hůře přežívaly kultivaci s ofloxacinem v porovnání s nemutovaným kmenem. Zvýšená exprese *lasR* naopak zlepšila přežívání (Kayama et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že přidání molekul indukujících QS phenazine pyocyaninu a acyl-homoserin laktonu ke kultuře *P. aeruginosa* způsobuje zvětšení frakce perzisterů (Möker et al., 2010).

Vliv QS na formování perzisterů byl dále zjištěn u bakterií *Streptococcus mutans*. Deleční mutanti $\Delta comC$ (delece genu pro produkci signálních feromonů CSP) a $\Delta comE$ (delece genu regulátoru odpovědi) stresem indukovaného QS systému CSP-comDE tvořili menší frakci perzisterů po působení ofloxacinu ve srovnání s divokým kmenem. A naopak, přidání CSP ke kultuře divokého kmene zvýšilo počet perzisterů (Leung and Lévesque, 2012). Je tedy zřejmé, že malé signální molekuly ovlivňují prostřednictvím QS formování perzisterů.

Zdá se ale, že molekuly QS nejsou jediné chemické signály, které se podílejí na vzniku perzistence. Bylo zjištěno, že perzistenci u *E. coli* může být indukována indolem. Ten je syntetizován při hladovění enzymem tryptofanázou TnaA. Mutanti s delecí v genu *tnaA* tvoří o řád méně perzisterů než standardní kmen, po kultivaci tohoto mutantního kmene s indolem došlo ke zvýšení počtu perzisterů o řád (Vega et al., 2012).

2.5.2 Stochastický vznik

O možném stochastickém vzniku perzisterů svědčí fakt, že vznikají z geneticky homogenní populace, která je jako tekutá kultura pěstována ve stejných podmínkách pro všechny buňky v kultuře. Toto je tradiční mikrobiologický pohled, heterogenita bakteriální populace je maskována experimenty v tekuté kultuře. Dnes ale víme, že bakterie jsou vystaveny molekulárnímu šumu, což může být jedna z příčin náhodného vzniku perzisterů. Vnější molekulární šum představuje různou koncentraci induktorů, živin apod. dostupných pro jednu konkrétní buňku v celkové populaci, vnitřní molekulární šum je zapříčiněn stochasticitou molekulárních procesů v jedné buňce (Elowitz et al., 2002). Studium na úrovni jedné buňky bylo dokázáno, že perzisteři mohou stochasticky přecházet do stavu aktivního růstu a naopak, že rostoucí buňky mohou stochasticky přecházet do stavu dormance (Balaban et al., 2004).

Důsledek malých rozdílů v koncentraci molekul může být velký v případě bistabilních systémů. Nejvíce studovaný bistabilní systém je *lac* operon *E. coli*. Pokud množství induktoru osciluje kolem střední hodnoty nutné pro spuštění genové exprese, stochasticky dochází buď ke stavu zapnuto, nebo vypnuto. Molekulární šum je amplifikován pozitivní zpětnou vazbou, což vede k bistabilitě. V homogenní populaci vystavené stejným vnějším vlivům tak dochází ke vzniku dvou fenotypů (Ozbudak et al., 2004). Bistabilní systémy jsou typické tam, kde dochází k diferenciaci buňky. U *Bacillus subtilis* je to například navození stavu kompetence (Maamar and Dubnau, 2005) nebo sporulace (Veening et al., 2005).

Otázkou ale je, stochasticita jakých molekulárních procesů vede ke vzniku perzistence? Bylo navrženo, že perzistence může být způsoben fluktuací hladiny toxinu z TA modulu *hipBA*, která když dosáhne určité prahové hodnoty, uvede bakterie do stavu dormance. Dále bylo zjištěno, že čím vyšší je hladina toxinu HipA, tím déle trvá stav dormance. Fluktuace hladiny toxinu kolem prahové hodnoty způsobuje koexistenci dvou fenotypových variant, u jedné varianty nebylo dosaženo prahové koncentrace toxinu, a tudíž nebyla navozena dormance, naopak u druhé varianty došlo k překročení prahové koncentrace toxinu a navození stavu dormance. V posledních studiích jsou uvažovány i jiné stochastické mechanismy navození perzistence než pouze prostřednictvím TA modulů (Fasani and Savageau, 2013; Maisonneuve and Gerdes, 2014; Maisonneuve et al., 2011).

Je možné, že stochastický vznik perzisterů je součástí bet-hedging strategie přežití v nestálých vnějších podmínkách, jelikož se zdá, že frekvence přepínání mezi stavem dormance a normálním růstem závisí na stabilitě prostředí (Kussell et al., 2005).

2.6 Vliv stresu a aktivace sigma faktoru SigB na formování perzisterů u *S. aureus*

Bakterie jsou během infekce vystaveny nepříznivým environmentálním vlivům, kterým se musí bránit a přizpůsobit. Obecná obrana bakterií proti stresovým podmínkám je aktivace obecné stresové odpovědi. Ta je u grampozitivních bakterií zprostředkována alternativním sigma faktorem SigB, podjednotkou RNA polymerázy. Faktor SigB rozpoznává specifické promotorové sekvence genů, které se podílejí na odpovědi na stres (van Schaik and Abee, 2005). Na základě toho, co víme o obecné stresové odpovědi a faktoru SigB u *B. subtilis* je možné uvažovat nad tím, že aktivita SigB uvádí buňku do stavu sníženého metabolismu a

zpomaleného růstu, což je stav odpovídající dormanci, také u *S. aureus*, a tím může navozovat perzistenci.

2.6.1 Struktura a regulace *sigB* operonu u *B. subtilis* a *S. aureus*

Obecná stresová odpověď u grampozitivních bakterií je nejvíce studovaná na modelovém organismu *Bacillus subtilis*. K aktivaci *sigB* dochází například při teplotním šoku, ethanolovém šoku, osmotickém šoku, nedostatku živin, kyslíku apod. SigB ovlivňuje transkripci více než 150 genů. Obecná stresová odpověď způsobuje snížení energetického metabolismus a tím zpomalení růstu, dále dochází k aktivaci nesespecifických preventivních ochranných mechanismů, včetně ochrany proti oxidativnímu poškození nebo poškození způsobenému zvýšenou teplotou. Takto se buňka připravuje na další stres (Hecker et al., 2007). Alternativní sigma faktor SigB je regulátor transkripce také u *S. aureus* (Deora et al., 1997).

Geny *sigB* *B. subtilis* a *S. aureus* jsou homologní (Wu et al., 1996), na úrovni aminokyselinové sekvence vykazují podobnost ze 77 % (Kullik and Giachino, 1997). Zdá se ale, že regulace *sigB* se u *S. aureus* a *B. subtilis* výrazně liší.

Transkripce *sigB* u *B. subtilis* je pod kontrolou dvou promotorů (Hecker et al., 2007), u *S. aureus* je pod kontrolou tří promotorů (Donegan and Cheung, 2009; Senn et al., 2005). Operony *sigB* *B. subtilis* a *S. aureus* jsou zobrazeny na obr. 3.

Aktivita SigB je u *S. aureus* i *B. subtilis* regulována třemi proteiny RsbU, a RsbVW. Geny *rsbVW*, které kódují tyto regulátory, patří s genem *sigB* u obou bakterií do *sigB* operonu (Hecker et al., 2007; Kullik and Giachino, 1997).

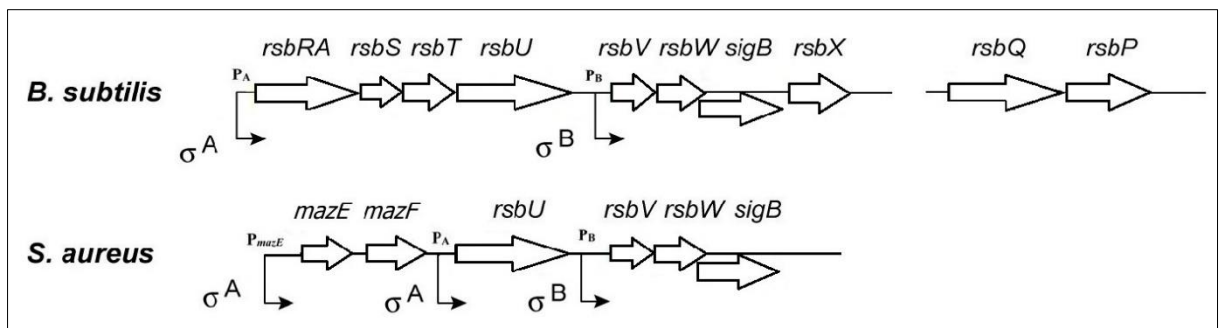
U *B. subtilis* funguje protein RsbW jako anti-sigma faktor, který drží SigB v neaktivní formě. Ve stresových podmínkách se na RsbW váže anti-anti sigma faktor RsbV, dochází k přerušení vazby mezi RsbW a SigB a tím se SigB aktivuje. RsbV se váže na SigB pouze v defosforylovaném stavu. Fosforylace a defosforylace RsbV je regulována kinázovou aktivitou RsbW a fosfatázovou aktivitou dvou fosfatáz RsbU a RsbP. Tyto fosfatázy jsou aktivní v přítomnosti stresu. Na regulaci aktivity SigB, respektive aktivity fosfatázy RsbU se při environmentálním stresu u *B. subtilis* podílí další proteiny RsbRST, které jsou součástí tzv. stresozomu, geny pro tyto proteiny se nachází proti směru transkripce *sigB* operonu, a fosfatáza RsbX která je součástí *sigB* operonu. Na regulaci fosforylace RsbV při hladovění se podílejí

fosfatázy RsbQP, geny *rsbQP* nejsou součástí *sigB* operonu a ani se nenachází v jeho blízkosti v genomu (Hecker et al., 2007).

U *S. aureus* také funguje RsbW protein jako anti-sigma faktor (Miyazaki et al., 1999) a RsbV protein nejspíš jako anti-anti sigma faktor (Palma and Cheung, 2001). RsbU *S. aureus* je také fosfatáza a je zatím jediný známý regulátor interakce RsbV/RsbW u *S. aureus*. Bylo ale zjištěno, že SigB je u *rsbU* delečních mutant stále částečně aktivní (Palma and Cheung, 2001; Palma et al., 2006), naproti tomu u *B. subtilis* faktor SigB u *rsbU* delečních aktivní nebyl (Smirnova et al., 1998). Bylo také zjištěno, že RsbU u *S. aureus* má konstitutivní nízkou úroveň fosfatázové aktivity (Senn et al., 2005). Další homology Rsb proteinů, které regulují aktivitu SigB u *B. subtilis* nebyly u *S. aureus* zjištěny (Senn et al., 2005).

V kapitole 2.5 jsem se krátce zmiňovala o TA modulu *S. aureus mazEF*. Bylo zjištěno, že geny *mazEF* leží proti směru transkripce *sigB* a jsou součástí *sigB* operonu. Transkripce z promotoru *PmazE* je nezbytná pro plnou aktivaci transkripce *sigB*. SigB ale negativně ovlivňuje transkripci *mazEF*, negativní zpětnou vazbou tedy ovlivňuje i svou transkripci. Transkripci *mazEF* též ovlivňují vnější signály, jako je tepelný šok nebo působení antibiotik. Zajímavé také je, že transkripce z promotoru *PmazE* je přímo regulována proteinem SarA (Staphylococcal accessory regulator A), což je globální regulátor exprese faktorů virulence (Bayer et al., 1996; Beenken et al., 2003; Blevins et al., 1999; Cheung et al., 1992). Zdá se, že TA modul *mazEF* představuje další úroveň regulace SigB, který je pro *S. aureus* unikátní, jeho přesný mechanismus však není plně objasněn. (Donegan and Cheung, 2009).

Zatím tedy není příliš jasné, jak je aktivita SigB u *S. aureus* regulována. Je ale zřejmé, že se regulace *sigB* u *S. aureus* a *B. subtilis* liší.



Obr. 3. Sigma B operon *B. subtilis* a *S. aureus*. Zobrazeny jsou příslušné otevřené čtecí rámce (plné šipky) a místa počátku transkripce (tenké šipky). Vyznačeny jsou sigma faktory, které regulují transkripci z příslušných promotorů. Upraveno dle (Donegan and Cheung, 2009; Hecker et al., 2007).

2.6.2 Fyziologická funkce obecné stresové odpovědi u *Staphylococcus aureus*

Bylo zjištěno, že exprese *sigB* u *S. aureus* aktivuje teplotní šok, $MnCl_2$, $NaCl$, alkalický šok prostřednictvím KOH a vstup kultury bakterií do stacionární fáze (Kullik and Giachino, 1997; Pané-Farré et al., 2006). Podle RNA analýzy Northern blot dochází k vzestupu hladiny mRNA *sigB* již mezi 1. a 3. minutou od vystavení stresu (Pané-Farré et al., 2006). Na rozdíl od aktivace *sigB* u *B. subtilis* není transkripce *sigB* *S. aureus* aktivována ethanolovým šokem (Pané-Farré et al., 2006). Aktivace SigB by mohla mít protektivní funkci v případě vystavení buňky dalšímu stresu v podobě antibiotik, avšak tato skutečnost nebyla prokázána.

Regulační a signální kaskádu obecné stresové odpovědi u *S. aureus* pod kontrolou SigB zatím nebyly na molekulární úrovni podrobně studovány. Byly provedeny dvě transkriptomické studie, jejichž cílem bylo zjistit, které geny jsou pod kontrolou faktoru SigB.

První transkriptomická studie byla vypracována DNA microarray analýzou transkripčního profilu různých kmenů *S. aureus* v pozdní exponenciální fázi, kdy je *sigB* aktivní. V této studii zjistili, že SigB ovlivňuje transkripci 251 genů, z toho 198 pozitivně a 53 negativně. Ovlivněny byly geny pro biosyntézu kapsulárních proteinů, intermediární metabolismus a mnoho dalších genů. Důležité bylo zjištění, že SigB je významný modulátor exprese faktorů virulence, pozitivně reguluje expresi adhezinů a negativně expresi toxinů a exoproteinů. Pozitivně reguluje expresi genu *sarA* (Bischoff et al., 2004). Protein SarA je globální regulátor exprese faktorů virulence (Bayer et al., 1996; Beenken et al., 2003; Blevins et al., 1999; Cheung et al., 1992). SarA protein mimo jiné aktivuje expresi *agr* lokusu (Cheung et al., 1992), což je systém regulující transkripci faktorů virulence v souvislosti s quorum sensing (Abdelnour et al., 1993; Vuong et al., 2000).

Druhá transkriptomická studie zkoumala transkripční profil *S. aureus* po působení $MgCl_2$. Bylo zjištěno, že SigB pozitivně reguluje 122 genů, mezi které patřily například geny pro syntézu kapsulárních proteinů, geny intermediárního metabolismu, geny pro virulenci, transportéry iontů a osmoprotektantu glycin betain. V této studii dále počítačovou analýzou sekvencí proteinů porovnali podobnost produktů genů pod kontrolou SigB u *B. subtilis* a *S. aureus*. Zjistili, že pouze 6 ze 122 genů, které jsou pozitivně regulovány SigB u *S. aureus* mají ortology v regulonu SigB *B. subtilis* za podmínek 60% identity na úrovni aminokyselinové sekvence. Dle autorů to naznačuje rozdílnou funkci obou regulonů u těchto bakterií (Pané-Farré et al., 2006).

Studie tvorby biofilmu u *S. aureus* dokázala, že aktivita SigB je nezbytná pro tvorbu biofilmu, která byla indukována pěstováním v médiu s 3% NaCl. Faktor SigB totiž kontroluje expresi genů *icaADBC*, jejichž produkty jsou enzymy zodpovědné za syntézu adhezinu (Polysaccharide Intercellular Adhesinu (PIA)), který zprostředkovává tvorbu biofilmu (Rachid et al., 2000).

Důležité bylo zjištění, že aktivita SigB je indukována vystavením bakterií sub-inhibiční koncentraci aminoglykosidů. Tato aktivace vedla k vzniku bakterií s SCV fenotypem a k produkci biofilmu (Mitchell et al., 2010).

Podle výsledků těchto a dalších studií se zdá, že SigB *S. aureus* nemá funkci v ochraně proti budoucím stresům tak, jak to bylo prokázáno u *B. subtilis* (Hecker et al., 2007), nebo je tato funkce minimální, ale že se spíše podílí na regulaci základních buněčných funkcích (Bischoff et al., 2004; Pané-Farré et al., 2006; Senn et al., 2005).

2.6.3 SigB a formování perzisterů u *Staphylococcus aureus*

Jak bylo řečeno v kapitole 2.5.1.2, oxidativní stres má vliv na formování perzisterů, především tím, že aktivuje SOS odpověď. Faktor SigB *S. aureus* ovlivňuje geny pro detoxifikaci reaktivních kyslíkových radikálů, pozitivně reguluje expresi genu pro katalázu *kata* (Pané-Farré et al., 2006), překvapivě ale negativně ovlivňuje expresi genu pro superoxid dismutázu *sodM* (Bischoff et al., 2004). Aktivita enzymů detoxifikujících ROS ale nebyla přímo spojena se vznikem perzistence. SigB se nejspíše nepodílí na aktivaci SOS odpovědi, jelikož represor LexA je inaktivován přímo proteinem RecA, který se aktivuje po navázání ssDNA, následně může docházet k transkripci SOS genů (Anderson and Kowalczykowski, 1998; Cirz et al., 2007). Nebylo ani zjištěno, zda se SigB aktivuje při oxidativním stresu.

K poznatkům o vzniku perzistence u *S. aureus* přispěly také studie, které se zabývaly vztahem mezi aktivitou SigB a tvorbou perzistentního fenotypu SCV. Souhlasně se studiemi, které jsem uváděla výše, bylo i u variant SCV zjištěno, že SigB kontroluje expresi faktorů virulence, konkrétně pozitivně reguluje expresi adhezinů a negativně reguluje expresi toxinů (Kahl et al., 2005; Mitchell et al., 2013; Moisan et al., 2006), což mimo jiné koresponduje s charakteristikou SCVs. Nedávná studie přinesla ucelený pohled na patogenezi SCVs v souvislosti s aktivitou SigB. Během akutní infekce je aktivní *agr* a *sarA* lokus, produkty genů pod kontrolou těchto regulátorů způsobují zánětlivou reakci. Pro ustanovení intracelulární perzistence je nezbytná kontrola těchto regulátorů prostřednictvím aktivity SigB, dochází

k utlumení produkce faktorů virulence a je navozen SCV fenotyp. Mutanti s delecí v genu *sigB* nebyli schopni tvořit SCV a během několika dnů byly eliminovány imunitním systémem (Tuchscherer et al., 2015).

Recentní studie tak naznačují, že tvorba SCV a tedy perzisterů *S. aureus* je ovlivňována prostřednictvím regulace exprese faktorů virulence sigma faktorem SigB. Že by i jiné mechanismy tvorby perzisterů byly u *S. aureus* pod kontrolou SigB zatím nebylo zjištěno.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

- referenční kmen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (Seattle 1945) (ATCC® 25923™)

- klinické izoláty *Staphylococcus aureus*: byly izolovány ze sputa pacientky s cystickou fibrózou, ročník 1998, izoláty poskytl Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol.

- 124: izolace dne 13. 1. 2010

- 286: izolace dne 17. 8. 2010, zjištěna rezistence k erythromycinu a klindamycinu

- 12/5: izolace dne 30. 11. 2011, zjištěna rezistence k erythromycinu a klindamycinu

- 12/7: izolace dne 15. 5. 2013, zjištěna rezistence k erythromycinu a klindamycinu

Dle *spa* typizace jsou izoláty 124, 286, 12/7 stejný kmen, izolát 12/5 je odlišný kmen.

3.1.2 Kultivační média

3.1.2.1 Komplexní média

- BHI (Brain-heart infusion) médium – dodáno již v tomto složení od firmy Oxoid:

- 12,5 g extrakt z mozku

- 5 g extrakt z hovězího srdce

- 10 g pepton

- 2 g glukóza

- 5 g chlorid sodný

- 2,5 g fosforečnan disodný

37 g BHI média jsme rozpustili v 1 litru destilované vody. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

- LB (Luria-Bertani) médium:

- 10 g trypton
- 5 g kvasničný autolyzát
- 10 g NaCl
- destilovaná voda

Pomocí 1 M NaOH jsme upravili pH na 7,0, doplnili jsme destilovanou vodu na objem 1 litr. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

- pro přípravu pevných půd bylo přidáno 20 g agaru na 1 litr příslušného média = 2% (w/v)

3.1.2.2 Médium BHI pro osmotický stres

V 1 litru tekutého BHI média jsme rozpustili 100 g NaCl, konečná koncentrace 10% (w/v). Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

3.1.3 Antibiotika

Název	Výrobce	Koncentrace zásobního roztoku (mg/ml)
Ciprofloxacin	Fluka	25
Co-trimoxazol	Serva (sulfametaxazol) + Duchefa (trimetoprim)	100
Gentamicin	Roth	50

Co-trimoxazol byl připraven smícháním sulfametaxazolu a trimetoprimu v poměru 19:1. Ciprofloxacin jsme rozpustili v 0,1M HCl, gentamicin jsme rozpustili v destilované vodě, co-trimoxazol v DMSO. Zásobní roztoky jsme uchovávali v -20°C. Pevné půdy s antibiotikem pro testování na rezistentní buňky jsme připravili tak, že jsme vysterilizovali médium

autoklávováním, nechali ochladit na 50°C, přidali antibiotikum a médium s antibiotikem rozlili do Petriho misek.

3.1.4 Enzymy

Název	Výrobce
Lysozym	Fluka
Proteináza K	Sigma
RNáza A	Thermo Scientific
Reverzní transkriptáza (RevertAid Reverse Transcriptase)	Thermo Scientific
Inhibitor RNáz (RiboLock RNase inhibitor)	Thermo Scientific
Taq DNA polymeráza	Thermo Scientific

Enzymy Taq DNA polymeráza a Reverzní transkriptáza dodány s pufrům.

3.1.5 Chemikálie

Název	Výrobce
Agar	Oxoid
Agaróza	Merc
DNA loading dye (6x)	Fermentas
Diethyl pykarbonát (DEPC)	Roth
Dithiotreitol	Serva
dNTP mix	Thermo Scientific
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)	Lachema
Ethanol	Lach Ner
Ethidium bromid	Sigma

Formamid	Roth
GeneRuler 1000 bp Plus DNA Ladder	Fermentas
Glycerol	Sigma
HCl	Lachema
Izopropanol	Lach Ner
Kvasničný autolyzát	Oxoid
Ledová kyselina octová	Lachema
MgCl ₂	Thermo Scientific
NaCl	Lach Ner
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	Merc
NaOH	BDH
Paraquat dichlorid hydrát	Fluka
Propidium jodid	Fluka
Random hexamer primer	Thermo Scientific
RNA Ladder Low Range	Fermentas
RNA loading dye (2x)	Fermentas
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka
Trypton	Oxoid

3.1.6 Roztoky

3.1.6.1 Pufry pro horizontální gelovou elektroforézu

TAE pufr 50x koncentrovaný

- 36,3 g Tris
- 8,57 ml ledové kyseliny octové
- 126 ml destilované vody
- 15 ml 0,5 M EDTA

TAE pufr 1x koncentrovaný

Pro elektroforézu RNA byla místo destilované vody použita voda ošetřená diethyl pykarbonátem (DEPC).

3.1.6.2 Roztok 1% NaCl (w/v)

- 1 l destilované vody
- 10 g NaCl

3.1.6.3 DEPC-H₂O

- 0,1% (w/v) diethyl pyrokarbonát (DEPC)
- destilovaná voda

DEPC-H₂O byla přes noc míchána v digestoři, poté byla dvakrát sterilizována autoklávováním.

3.1.6.4 Zásobní roztok paraquat dichloridu 0,2 M

- 50 mg paraquat dichlorid hydrátu
- 1 ml destilované vody

Zásobní roztok jsme uchovávali v -20°C.

3.1.6.5 Zásobní roztok PBS (fosfátový pufr) 0,2 M

- 2,26 g NaH₂PO₄ · 2H₂O
- 100 ml destilované vody

Roztok byl zfiltrován přes membránový filtr s průměrem póru 0,22 µm.

3.1.7 Primery pro qPCR

Název	Sekvence 5' → 3'	T _m (°C)	Délka produktu	Zdroj
GYRSAQF	ACTGATGCCGATGTGGA	52,0	150 bp	(Harraghy et al., 2005)
GYRSAQR	AACGGTGGCTGTGCAATA	52,6		
SIGSAQF	GGTTAGTTCATCGCTCACTT	53,4	200 bp	Vlastní návrh
SIGSAQR	CAATCACATCACGAAGATTTAG	51,9		
ASPSAQF	AAAATTGCTGGTATCGCTG	50,8	350 bp	(Chen et al., 2011)
ASPSAQR	TGTAAACCTTGTCTTTCTTGGT	51,9		

3.1.8 Komerční soupravy

Název	Výrobce	Použití
MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit	Epicentre	Izolace chromosomální DNA
MagJET RNA kit	Thermo Scientific	Izolace RNA
FastStart Essential DNA Green Master	Roche	Kvantitativní PCR
LIVE/DEAD® Cell Vitality Assay Kit	Molecular Probes	Rozlišení metabolicky aktivních buněk a buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou pomocí průtokové cytometrie

3.1.9 Programy

- <http://simgene.com/Primer3>
- <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Flowlogic – software pro analýzu dat průtokové cytometrie

- Apogee Histogram Software – software, který je nainstalován v cytometru Apogee A50-Micro

3.1.10 Přístroje a laboratorní vybavení

- Přístroje pro kultivaci

- Termostat Memmert
- Vzdušná třepačka NB-205 N-Biotek

- Centrifugy

- IEC Centra CL3R
- Hettich Micro 22 R
- Hettich Micro 20
- Eppendorff Centrifuge 5430

- Spektrofotometr Helios γ

- Thermo scientific NanoDrop 1000 Spectrofotometr

- PCR cycler VWR Doppio

- Real-time PCR cycler Bio-Rad IQ5

- Průtokový cytometr Apogee A50-Micro

- Fotoaparát Olympus SP-565UZ

- Zdroj pro agarózovou elektroforézu Power Pac 3000 Bio-Rad

- Magnetický stojánek DynMag Magnetic Particle Concentrator Invitrogen

- termoblok, váha, pH metr

- míchačka VWR Standard Analog Shaker

- mikroskop Carl Zeiss Jenamed 2

- UV transluminátor

- analytické váhy Keren ACJ/ACS

- UV lampa Vilber Lourmat LV-115.G

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace v autoklávu

Tekutá média, roztoky a vodu jsme sterilizovali v autoklávu při teplotě 120°C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa po dobu 20 min.

3.2.2 Práce s bakteriální kulturou

3.2.2.1 Kultivace v tekutém médiu

Naplnili jsme Erlenmeyerovu baňku BHI médiem tak, aby obsah média dosahoval maximálně 10 % z celkového objemu baňky. Médium jsme zaočkovali kulturou narostlou na pevném BHI médiu nebo v tekutém BHI médiu. Baňku jsme umístili do vzdušné třepačky a inkubovali aerobně při 37°C a 180 rpm.

3.2.2.2 Měření hustoty bakteriální populace v tekutém médiu

Ke stanovení hustoty bakteriální populace v tekutém BHI médiu jsme používali metodu měření optické hustoty kultury pomocí spektrofotometru Helios γ . K měření jsme používali vlnovou délku světla 600 nm (OD_{600}). Jako blank jsme použili BHI médium.

3.2.2.3 Uchovávání bakteriálních kmenů

Krátkodobě jsme bakteriální kultury skladovali v Petriho misce na pevném médiu při 3°C. Dlouhodobě jsme bakteriální kultury skladovali v glycerolu o celkové koncentraci 20 % (w/v) v -70°C.

3.2.3 Určení minimální inhibiční koncentrace paraquat dichloridu

Minimální inhibiční koncentraci (MIC) paraquat dichloridu (PQ) jsme se pokusili určit dvěma metodami, diluční metodou dle Peterson et al. (1981) a diskovou difuzní metodou dle Soler-García and Jerse (2004).

3.2.3.1 Diluční metoda

Do sterilních zkumavek jsme si připravili ředící řadu 1 ml BHI média s PQ o koncentracích od 10^{-3} M do 10^{-7} M + jednu zkumavku s BHI médiem bez PQ. Do každé zkumavky jsme napipetovali 1 ml exponenciální kultury *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 v BHI médiu, optická denzita této kultury byl $OD_{500} = 0,5$. Kultivovali jsme 2 h aerobně v 37°C . Změřili jsme optickou denzitu.

3.2.3.2 Disková difuzní metoda

1. Disky z filtračního papíru (Whatman) o průměru 25 cm jsme namočili do vodného roztoku paraquatu o koncentracích 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,6 μM , 0,3 μM , nechali zaschnout a sterilizovali UV lampou po dobu 30 min.
2. Zaočkovali jsme agarovou BHI plotnu: z tekuté kultury *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 v exponenciální fázi jsme napipetovali 100 μl na plochu agaru a ihned rozetřeli sterilní mikrobiologickou hokejkou.
3. Disky jsme pokladli na naočkovanou plotnu.
4. Kultivovali jsme aerobně přes noc v termostatu ve 37°C .
5. Vyhodnotili jsme inhibiční zóny.

3.2.4 **Růstová křivka**

Noční kulturu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 jsme přeočkovali do čistého vytemperovaného BHI média na $OD_{600} = 0,05$ a kultivovali aerobně ve 37°C . Po 1,5 h jsme provedli první odběr pro měření optické denzity. Dále jsme prováděli odběr a měření optické denzity každou hodinu.

3.2.5 **Krátkodobé křivky hynutí**

Pro stanovení křivky hynutí jsme testovali přežití buněk po přidání antibiotika kapkovou metodou, antibiotikum bylo přidáno k buňkám v exponenciální fázi. Použili jsme antibiotika gentamicin, ciprofloxacin a co-trimoxazol, vždy ve dvou koncentracích – 10násobek a 100násobek jejich MIC. Pro testování klinických izolátů jsme použili pouze ciprofloxacin o koncentraci 100x MIC. Doba sledování hynutí resp. přežívání buněk byla 5 h od přidání antibiotika.

3.2.5.1 Křivka hynutí s antibiotikem

1. Noční kulturu *Staphylococcus aureus* jsme přeočkovali do čistého vytemperovaného BHI média na $OD_{600} = 0,05$ a kultivovali aerobně ve 37°C a kultivovali, než kultura dosáhla $OD_{600} = 0,5$, asi 1 h a 45 min
2. Z kultury v exponenciální fázi jsme odebrali první vzorek o objemu 100 μl do mikrozkušavky s 900 μl 1% NaCl, tento okamžik jsme označili časem $t = 0$ min. Odběr jsme provedli v duplikátu
3. Ihned po odběru jsme rozdělili bakteriální kulturu rovnoměrně do dvou vytemperovaných Erlenmeyerových baněk, do jedné jsme přidali antibiotikum, druhá banka s kulturou byla kontrolní bez antibiotika. Kultury jsme dál kultivovali.
4. Odběr a jeho následné zpracování jsme prováděli každou hodinu až do času $t = 5$ h
5. V čase každého odběru jsme měřili optickou denzitu kontrolní kultury.
6. Vzorky jsme ihned po odběru zpracovali takto. Centrifugovali jsme je 5 min při 7500 rpm. Odstranili jsme supernatant a k peletu přidali 1 ml 1% NaCl. Buňky jsme resuspendovali pomocí vortexu.
7. Provedli jsme výsev na agarovou plotnu s BHI kapkovou metodou. Připravili jsme si 4 ředící řady, ředění bylo vždy 10x. Vyseli jsme vždy po dvou kapkách o objemu 10 μl z obou odebraných duplikátů a ze tří ředění.
8. Kultivovali jsme v termostatu aerobně přes noc v 37°C .

3.2.5.2 Křivka hynutí stresované kultury s antibiotikem

1. Noční kulturu *Staphylococcus aureus* jsme přeočkovali do čistého vytemperovaného BHI média na $OD_{600} = 0,05$ a kultivovali aerobně ve 37°C a kultivovali, než kultura dosáhla maximálně $OD_{600} = 0,4$, asi 1 h a 30 min
2. Kulturu jsme rozdělili do dvou vytemperovaných Erlenmeyerových baněk v poměru 2:1, kultura o menším objemu sloužila jako kontrolní bez stresu a bez antibiotik.
3. Kulturu o větším objemu jsme stresovali:
 - a. Pro navození osmotického stresu jsme kulturu převedli do centrifugační zkumavky a centrifugovali při 4 000 rpm, 37°C , po dobu 5 min, poté jsme odstranili supernatant a nahradili ho BHI s 10% NaCl o stejném objemu, kulturu jsme převedli zpět do banky.
 - b. Pro navození oxidativního stresu jsme do kultury přidali paraquat na celkovou koncentraci 0,1 μM

4. Kulturu s přidaným stresovým faktorem jsme kultivovali aerobně ve 37°C 30 min
5. Poté jsem ze stresované i kontrolní kultury odebrali první vzorek o objemu 100 µl do mikrozkušavky s 900 µl 1% NaCl, tento okamžik jsme označili časem $t = 0$ min. Odběr jsme provedli v duplikátu.
6. Ihned po odběru jsme rozdělili stresovanou bakteriální kulturu rovnoměrně do dvou vytemperovaných Erlenmeyerových baněk, do jedné jsme přidali antibiotikum, druhá baňka s kulturou byla kontrolní stresovaná bez antibiotika. Kultury jsme dál kultivovali.
7. Odběr a jeho následné zpracování jsme prováděli každou hodinu až do času $t = 5$ h. Vzorky jsme odebírali ze stresované kultury s antibiotikem i z kontrolní stresované kultury bez antibiotika.
8. V čase každého odběru jsme měřili optickou denzitu obou kontrolní kultury.
9. Dále jsme zpracovali odebrané vzorky jako v předchozí kapitole 3.2.5.1.

3.2.6 Testování na rezistentní buňky

Vybrané agarové plotny s narostlými bakteriemi z pokusu konstrukce křivek hynutí jsme přerazítkovali na BHI agarovou plotnu s antibiotikem a současně pro kontrolu na LB agarovou plotnu.

3.2.7 Sběr buněk pro izolaci RNA

3.2.7.1 Sběr buněk vystavených působení antibiotik a paraquat dichloridu pro izolaci RNA

1. Noční kulturu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 jsme přeočkovali do čistého vytemperovaného BHI média na $OD_{600} = 0,05$ a kultivovali aerobně ve 37°C.
2. Po dosažení $OD_{600} = 0,5$ odpovídající exponenciální fázi růstu, jsme přidali antibiotiku nebo paraquat dichlorid (pro navození oxidativního stresu), současně jsme dál pěstovali kulturu bez stresového faktoru jako kontrolní.
3. Vzorek z kontrolní kultury jsme následně zpracovávali stejně jako vzorek ze stresované kultury. Okamžik přidání stresového faktoru jsme označili časem $t = 0$ min.
4. Po uplynutí 10 min ($t = 10$ min) jsme z kultury sterilně odebrali 2 ml do mikrozkušavky o objemu 2 ml a centrifugovali při 7500 rpm, pokojové teplotě, po dobu 5 min. Následně jsme odstranili supernatant, mikrozkušavku s peletem jsme ponořili do tekutého dusíku a tím ho zamrazili, mikrozkušavku jsme pak ihned umístili do -20°C.

5. Další vzorek jsme odebrali v čase $t = 30$ min a zpracovali ho stejným způsobem jako při odběru v čase $t = 10$ min.

3.2.7.2 Sběr buněk vystavených osmotickému stresu pro izolaci RNA

1. Noční kulturu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 jsme přeočkovali do čistého vytemperovaného BHI média na $OD_{600} = 0,05$ a kultivovali aerobně ve 37°C .
2. Po dosažení $OD_{600} = 0,5$, odpovídající exponenciální fázi růstu, jsme kulturu rozdělili do dvou centrifugačních zkumavek a centrifugovali při 4 000 rpm, 37°C , po dobu 5 min.
3. Poté jsme z jedné zkumavky odstranili supernatant a nahradili jej BHI s 10% NaCl o stejném objemu. Z kontrolního vzorku jsme médium neodstranili a kulturu jsme v něm znovu resuspendovali.
4. Resuspendované kultury jsme ze zkumavek převedli do Erlenmeyerových baněk – tento okamžik jsme označili jako $t = 0$ min.
5. Kultivovali jsme aerobně ve 37°C . Vzorek z kontrolní kultury jsme následně zpracovávali stejně jako vzorek stresovaný.
6. Další postup byl stejný jako v kapitole 3.2.7.1, bod. 4. a 5.

3.2.8 **Izolace chromozomální DNA**

K Izolaci chromozomální DNA z bakterií *Staphylococcus aureus* kmene ATCC 25923 jsme použili komerční sadu MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit od firmy Epicentre. Postupovali jsme dle návodu přiloženého ke komerční sadě.

Lyze buněk:

1. Do mikrozkušavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml jsme odebrali sterilní mikrobiologickou kličkou 40 mg bakteriální kultury narostlé na pevném BHI médiu.
2. Přidali jsme 150 μl TE pufru a obsah mikrozkušavky jsme míchali za použití vortexu, než vznikla homogenní suspenze.
3. Přidali jsme 1 μl lysozymu.
4. Inkubovali jsme v termobloku předehřátém na 37°C po dobu 10 min.
5. Rozpustili jsme 1 μl Proteinázy K (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) v 150 μl Gram Positive Lysis Solution (lyzační roztok pro gram pozitivní bakterie).
6. Přidali jsme 150 μl Gram Positive Lysis Solution s Proteinázou K a důkladně promíchali.

7. Inkubovali jsme vzorek v 65°C po dobu 15 min, promíchali jsme pomocí vortexu každých 5 min.
8. Ochladili jsme vzorek na 37°C.
9. Umístili jsme vzorek na 5 min na led.

Precipitace DNA:

10. Přidali jsme 175 µl MPC Protein Precipitation Reagent k 300 µl lyzovaného vzorku, vzorek jsme důrazně míchali na vortexu po dobu 10 s.
11. Vzorek jsme centrifugovali při 4°C, 14 000 rpm, po dobu 10 min.
12. Převedli jsme supernatant do čisté mikrozkušavky.
13. K supernatantu jsme přidali 1 µl RNázy A (5 µg/ µl) a důkladně promíchali.
14. Inkubovali jsme ve 37°C pod dobu 30 mi.
15. Přidali jsme 500 µl izopropanolu, zamíchali jsme 30 krát převrácením zkumavky.
16. Vzorek jsme centrifugovali při 4°C, 14 000 rpm, po dobu 10 min.
17. Pomocí pipety jsme odstranili supernatant (izopropanol).
18. Pelet s DNA jsme omyli 100 µl 70% ethanolem.
19. Pelet jsme nechali uschnout při pokojové teplotě.
20. Rozpustili jsme DNA v 35 µl TE pufru.
21. Koncentraci izolované chromozomální DNA jsme změřili pomocí NanoDropu.

3.2.9 Izolace RNA

Izolovali jsme celkovou RNA ze zamražených buněk, které jsme získali postupem popsáním v kapitole 3.2.7. K izolaci jsme použili komerční sadu MagJET RNA kit od firmy Thermo scientific. Postupovali jsme dle návodu přiloženého ke komerční sadě, pozměnili jsme pouze postup při rozbíjení buněk.

1. Nejprve jsme rozpustili lyofilizovanou DNázu I v 550 µl DNáza I rozpouštěcím pufru, připravili jsme si 1x koncentrovaný reakční pufr s MgCl₂ pro DNázu I tak, že jsme 20 µl 10x koncentrovaného reakčního pufru přidali do 180 µl beznukleázové vody, k 450 µl lyzačního pufru jsme přidali 20 µl 2 M DTT.
2. Do mikrozkušavky se zamraženými buňkami jsme přidali 100 µl beznukleázové vody.
3. Obsah mikrozkušavky jsme převedli do sterilní třecí misky a pod tekutým dusíkem roztřeli na prášek.

4. Do třecí misky jsme ihned přidali 450 μ l lyzačního pufru s 10 μ l 2 M DTT. Obsah třecí misky jsme převedli do čisté mikrozkušavky.
5. Do mikrozkušavky jsme přidali 40 μ l MagJet Magnetic Beads (magnetických kuliček, na které se naváže RNA), promíchali pomocí vortexu a přidali 400 μ l 96% ethanolu. Vzorek jsme umístili do magnetického stojánku a počkali jednu minutu, než se magnetické kuličky přes stěnu mikrozkušavky naváží k magnetickému stojánku. Aniž bychom manipulovali s mikrozkušavkou, pomocí pipety jsme odstranili supernatant.
6. Přidali jsme 200 μ l 1x reakčního pufru pro DNázu I a 5 μ l DNázy I. Promíchali jsme a krátce centrifugovali. Vzorek jsme inkubovali v 37°C v termobloku umístěném na míchačce po dobu 15 min.
7. Přidali jsme 200 μ l 96% ethanolu, krátce jsme promíchali na vortexu a dále míchali převrácením mikrozkušavky po dobu 5 min.
8. Přidali jsme 700 μ l promývacího roztoku 1 (Wash buffer 1). Míchali jsme na vortexu po dobu 1 min a krátce centrifugovali. Vzorek jsme umístili do magnetického stojánku, po uplynutí 1 min jsme pomocí pipety odstranili supernatant.
9. Přidali jsme 700 μ l promývacího roztoku 2 (Wash buffer 2). Míchali jsme na vortexu po dobu 1 min a krátce centrifugovali. Vzorek jsme umístili do magnetického stojánku, po uplynutí 1 min jsme pomocí pipety odstranili supernatant.
10. Opakovali jsme krok 9.
11. Přidali jsme 100 μ l beznukleázové vody. Vzorek jsme důkladně promíchali pomocí vortexu a krátce centrifugovali. Mikrozkušavku jsme umístili do termobloku umístěném na míchačce a inkubovali v 60°C po dobu 5 min. Vzorek jsme umístili do magnetického stojánku, po uplynutí 1 min jsme supernatant přemístili do čisté mikrozkušavky a přidali 1 μ l RiboLock RNase inhibitoru.
12. Zkušavku se vzorkem jsme okamžitě umístili na led a skladovali v -70°C.
13. Provedli jsme kontrolu úspěšnosti izolace RNA pomocí horizontální gelové elektroforézy.

3.2.10 Převod RNA na cDNA

1. Do mikrozkušavky jsme napipetovali 20 μ l RNA a 2 μ l random hexamer primer (zásobní roztok 0,2 μ g/ μ l).
2. Inkubovali jsme 5 min při 70°C

3. Inkubovali jsme na ledu a přidali 8 μl RevertAid Reverse Transcriptase pufru (5x koncentrovaný), 0,8 μl dNTP mix (ZR 10mM), 1 μl RNAse inhibitor (ZR 20U/ μl) a 6,2 μl DEPC- H_2O . Celkový objem reakce 38 μl .
4. Inkubovali jsme 5 min při 25°C
5. Přidali jsme 0,2 μl RevertAid Reverse Transcriptase (ZR 200 U/ μl).
6. Inkubovali jsme 10 min při 25°C.
7. Inkubovali jsme 1 h při 42°C.
8. Pro ukončení reakce jsme inkubovali 10 min při 70°C.
9. Provedli jsme kontrolu úspěšnosti převodu RNA na cDNA pomocí horizontální gelové elektroforézy.
10. Koncentrace cDNA byla změřena pomocí NanoDropu.

3.2.11 Separace nukleových kyselin pomocí horizontální gelové elektroforézy

1. Připravili jsme si 1,5% (w/v) agarózový gel: do 35 ml 1x TAE jsme přisypali 0,525 g agarózy, rozpustili zahřátím v mikrovlnce a přelili do formičky na gel.
2. Ztuhlý gel jsme přemístili do vaničky na horizontální elektroforézu s 1x TAE –
3. Připravili jsme si vzorky na elektroforézu:
 - a. RNA: v mikrozkušavce o objemu 0,5 ml jsme smíchali 5 μl RNA, 5 μl formamidu a 5 μl RNA vzorkového pufru. Vzorky jsme inkubovali v 60°C po dobu 10 min.
 - b. DNA: v jamkách mikrotitrační destičky jsme smíchali 8 μl cDNA s 2 μl DNA vzorkového pufru.
4. Vzorky jsme napipetovali do jamek v gelu.
5. Pro separaci molekul v gelu jsme použili stejnosměrné napětí o velikosti 4V/cm².
6. Poté jsme pro vizualizaci gel dobarvili ethidium bromidem.

3.2.12 Kontrola funkčnosti primerů pro qPCR metodou standartní PCR

1. Do tenkostěnné PCR zkumavky jsme připravili reakci:

Taq pufr (s KCl)	5 μl
dNTP mix (2 mM)	5 μl

MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Přímý primer (0,1 mM)	2 µl
Reverzní primer (0,1 mM)	2 µl
Templátová DNA	200 ng – 1 µg
Taq DNA polymeráza	2 jednotky
Destilovaná voda	doplněna na konečný objem 50 µl

2. PCR reakce probíhala podle následujícího programu:

- | | | | |
|---------------------|---------|-------|-------|
| • Úvodní denaturace | 95°C | 3 min | |
| • Denaturace | 95°C | 30 s | } 35x |
| • Nasedání primerů | 50-55°C | 30 s | |
| • Elongace | 72°C | 30 s | |
| • Konec elongace | 72°C | 3 min | |

Nastavili jsme gradient teplot pro nasedání primerů, pro reakci s primery pro geny *sigB* a *gyrB* byla zvolena teplota 54°C, pro gen *asp23* 51,5°C.

Po skončení programu začalo v cycleru chlazení vzorků na 4°C.

3. Pro ověření PCR reakce jsme provedli horizontální gelovou elektroforézu.

3.2.13 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

1. Použili jsme komerční sadu pro qPCR FastStart Essential DNA Green Master od firmy Roche, postupovali jsme podle přiloženého protokolu.
2. Do mikrozkušavky o objemu 0,5 ml jsme připravili premix PCR reakce.
3. Složení jedné reakce v premixu:

FastStart Essential DNA Green Master (2x konc.)	10 µl
---	-------

Přímý primer (5 μ M)	0,8 μ l
Reverzní primer (5 μ l)	0,8 μ l
PCR Ultra H ₂ O	3,4 μ l

Výsledná koncentrace primeru 0,2 μ M.

4. Premix jsme promíchali vortexováním.
 5. Z premixu jsme napipetovali reakce po 15 μ l do 96-jamkové destičky pro PCR.
 6. Ke každé reakci v jamce jsme přidali 5 μ l templátové DNA nebo Ultra-PCR voda pro kontrolní reakce bez templátu, celkový objem reakce tak činil 20 μ l.
 7. Destičku jsme zalepili krycí fólií.
 8. Destičku jsme krátce zcentrifugovali.
 9. PCR reakce probíhala podle následujícího programu:
 - I. Úvodní denaturace 94°C 10 min
 - II. Vlastní amplifikace a detekce:
 - Denaturace 94°C 10 s
 - Nasedání primerů 55°C 10 s
 - Extenze 72°C 25 s
- } 45x
- III. HRM (high resolution melting) analýza:
 - Denaturace 94°C 10 s
 - Hybridizace 65°C 1 min
 - Kontinuální zvyšování teploty na 94°C

3.2.14 Průtoková cytometrie

Pro rozlišení metabolicky aktivních buněk a buněk s porušenou integritou cytoplazmatické membrány jsme použili komerční soupravu LIVE/DEAD® Cell Vitality Assay Kit od firmy Molecular Probes. Postupovali jsme podle přiloženého návodu. Analyzovali jsme bakterie *Staphylococcus aureus* ve v exponenciální fázi po působení antibiotik. Bakterie v exponenciální fázi jsme pěstovali stejným způsobem, jak je popsáno v kapitole 3.2.5.1 (Křivka hynutí s antibiotikem), vzorky jsme odebrali v časech T0, T1, T3 a T5 h. Před analýzou jsme bakterie obarvili fluorescenční značkou dle návodu.

1. Připravili jsme 1mM zásobní roztok C₁₂-resazurinu: obsah vialky s C₁₂-resazurinem jsme rozpustili v 100 µl DMSO, skladovali jsem v -20°C.
2. Připravili jsme čerstvý 50 µM pracovní roztok C₁₂-resazurinu: 1 mM zásobní roztok jsem 20x zředili v DMSO.
3. Připravili jsme čerstvý 1 µM pracovní roztok SYTOX Green: 10 µM zásobní roztok jsme 10x zředili v DMSO.
4. 10x koncentrovaný roztok PBS (phosphate-buffered saline) jsme v dH₂O zředili na 1x.
5. Do mikroskopů jsme z kultury odebrali 2 vzorky o objemu 1 ml.
6. Centrifugovali jsme 5 min při 7500 rpm.
7. Odstranili jsme supernatant. K peletu jsem napipetovali 100 µl 1x PBS a případně dále naředili tak, aby konečná koncentrace buněk bylo zhruba 1x10⁶/ml.
8. K jedné buněčné suspenzi jsme přidali 3 µl pracovního roztoku C₁₂-resazurinu a 3 µl pracovního roztoku SYTOX Green, druhou buněčnou suspenzi jsme ponechali neobarvenou jako kontrolu.
9. Inkubovali jsme při 37°C v termostatu po dobu 15 min.
10. Vzorek jsme zředili podle potřeby průtokové cytometrie pomocí 1x PBS, ihned umístili na led a zabránili průniku světla ke vzorkům.
11. Vzorky jsem ihned analyzovali pomocí průtokového cytometru Apogee A50-Micro. K excitaci byl použit argonový laser, který emituje záření o vlnové délce 488 nm. Nastavení napětí na fotonásobičích (PMT = photomultiplier tubes) bylo následující: SALS 200, LALS 220, Grn 448, Org 450, Red 450. Analyzován byl vzorek o objemu 130 µl, rychlost průtoku 0,75 µl/min.

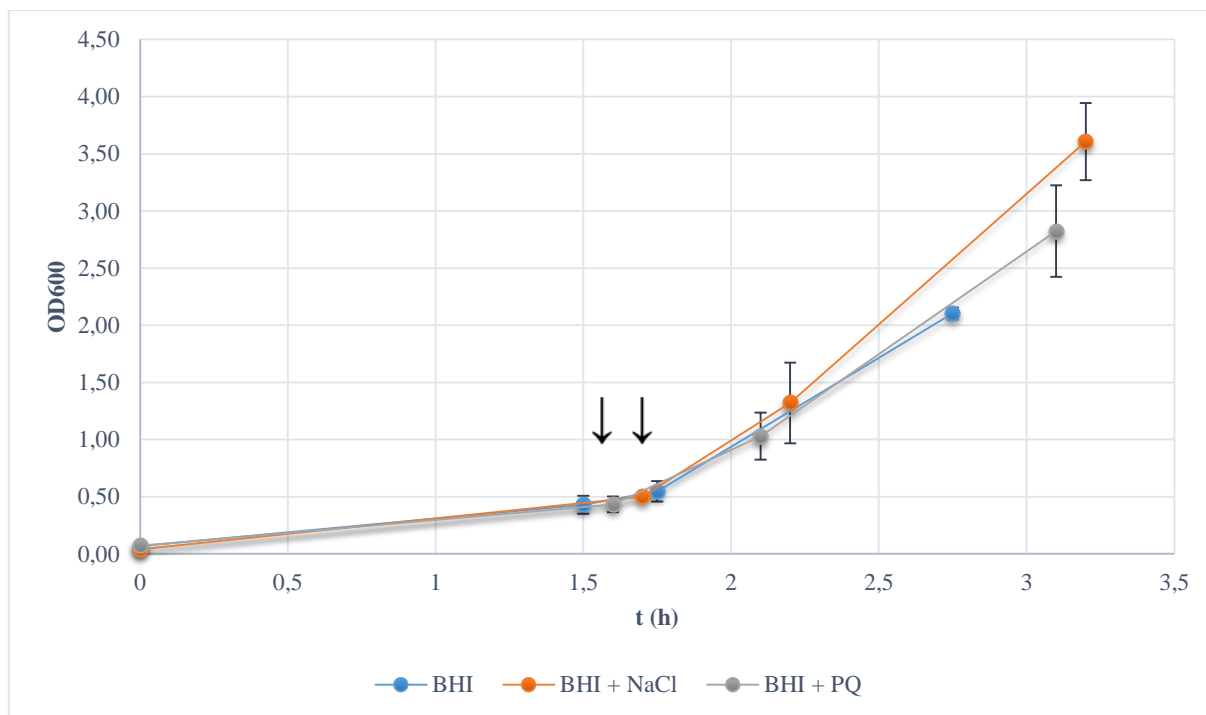
4 VÝSLEDKY

4.1 Růstové vlastnosti kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Cíl: Pro další pokusy monitorovat růstové vlastnosti referenčního kmene Staphylococcus aureus ATCC 25923 stanovením růstových křivek v BHI médiu bez antibiotik.

Abychom mohli porovnat rozdíly v růstu referenčního kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 v různých podmínkách, nejprve jsme změřili růstovou křivku v BHI médiu postupem popsáním v kapitole 3.2.4. Dále bylo nutné otestovat růst referenčního kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 v BHI médiu s přítomností stresujícího faktoru. Postup monitorování růstu v BHI médiu s 10% obsahem NaCl způsobující osmotický stres BHI médiu s paraquat dichloridem vyvolávající oxidativní stres je popsán v kapitole 3.2.5.2 (kontrola růstu měřením OD₆₀₀ kultury). Okamžik přidání stresového faktoru je v grafu naznačen šipkou (obr. 4). Z výsledků zanesených do grafu je jasně patrné, že stresové faktory neměly markantní vliv na průběh růstu bakteriální populace.

Při kultivaci byla v tekuté kultuře zjištěna přítomnost biofilmu v podmínkách bez stresového faktoru, v médiu s 10% NaCl i v médiu s paraquat dichloridem. V grafu je zaznamenáno poslední měření, kdy se biofilm v kultuře nevyskytoval.



Obr. 4. Růstová křivka *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Stanovili jsme růstovou křivku změněním optické hustoty OD₆₀₀ bakteriální kultury v BHI (modře), v BHI s 10% obsahem NaCl (oranžově) a v BHI s 0,1 μM paraquat dichloridem (šedivě). Okamžik přidání stresového faktoru je znázorněn černými šipkami. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze třech měření.

4.2 Testování citlivosti referenčního kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 k vybraným antibiotikům a paraquat dichloridu

Cíl: Stanovit pro další pokusy hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) klinicky využívaných antibiotik a určit citlivost k oxidativnímu stresu vyvolaného paraquat dichloridem.

4.2.1 Stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik

Pro pokusy v této práci jsme vybrali 3 antibiotika, která jsou častou volbou při léčbě pacientů s cystickou fibrózou – gentamicin, ciprofloxacin a co-trimoxazol. Pro další pokusy bylo stěžejní určit MIC těchto antibiotik pro referenční kmen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. MIC byla změřena v Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol mikrodiluční metodou. Hodnota MIC gentamicinu byla 1 μg/μl, ciprofloxacinu 0,125 μg/μl a co-trimoxazolu 2 μg/μl.

4.2.2 Testování citlivosti k paraquat dichloridu

Paraquat dichlorid (PQ) je běžně využíván v experimentech pro navození oxidativního stresu. PQ vytváří oxidativní stres tak, že přenáší elektrony z NADH nebo NADPH na kyslík a generuje superoxidové radikály, které jsou superoxid dismutázou přeměněny na peroxid vodíku (Wu et al., 2012b). Peroxid vodíku je většinou degradován na kyslík a vodu ale může být fentonovou reakcí přeměněn na hydroxylové radikály, které způsobují oxidativní stres (Wang and Zhao, 2009).

Pro pokusy s PQ bylo nutné určit takovou koncentraci, která bude indukovat stresovou odpověď, ale zároveň nezpůsobí výrazný pokles koncentrace živých bakterií v populaci v průběhu růstu. Před provedením samotného pokusu bylo nutné otestovat schopnost přežívání bakterií *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 s PQ, neboť v literatuře jsme nenašli tyto hodnoty pro *Staphylococcus aureus* ale pouze pro pokusy s *Escherichia coli*. Wu et al. (2012) indukovali oxidativní stresovou odpověď u *Escherichia coli* inkubační bakterií s 0,8 mM PQ.

Jako první metodu jsme zvolili diluční metodu (kap.123) k orientačnímu určení hodnot MIC PQ. Po inkubaci 3 h v tekutém BHI médiu s různými koncentracemi PQ jsme změřili optickou densitu OD₆₀₀ (tab. 1), optická densita kultury se ale v široké škále koncentrace PQ nezměnila. Podle výsledků z této metody jsme MIC PQ nemohli určit.

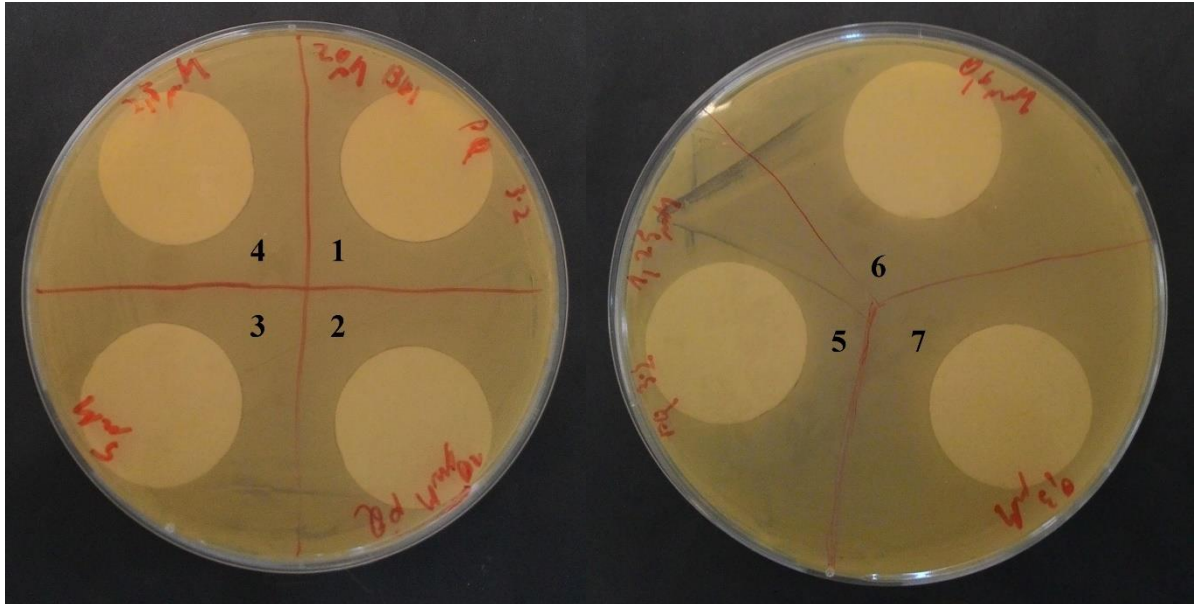
Konc. PQ	K	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M
OD ₆₀₀	3,04	2,99	2,99	3,21	3,22	3,08

Tab. 1. Optická densita kultury po 2 h pěstování s PQ o různé koncentraci

Provedli jsme pokus citlivosti na PQ podle kapitoly 3.2.5.2 - stanovení křivek hynutí výsevem na plotny z tekuté kultury kapkovou metodou kontrolní kultura s PQ bez antibiotika. Pěstovali jsme bakterie s médiem o koncentraci PQ 0,8 mM, 0,1 mM, 0,01 mM. V čase T1 (1,5 h působení PQ) došlo v porovnání s časem T0 (0,5 h po působení PQ) k nárůstu o jeden řád, což indikuje, že PQ nezpůsobil masivní hynutí bakteriální populace. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními koncentracemi nebyl opět signifikantní.

Dále jsme pro určení hodnoty MIC PQ použili diskovou difúzní metodu (kap. 3.2.3.2). Po inkubaci přes noc jsme zkontrolovali nárůst na miskách (obr. 5). Inhibiční zóny o průměru zhruba 1 mm se vytvořili okolo disků s koncentrací PQ 20 μM – 2,5 μM, průměr inhibičních

zón se zmenšoval se snižující se koncentrací PQ o desetiny mm. Podle výsledků z této metody bychom mohli jako vhodnou koncentraci PQ pro naše experimenty určit hodnotu 1 μM .



Obr. 5. Testování citlivosti k PQ diskovou difuzní metodou. Celou plochu BHI plotny jsme zaočkovali z tekuté kultury *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Na povrch zaočkované plotny jsme pokladli disky z filtračního papíru napuštěné paraquat dichloridem (PQ). Disky byly napuštěny různou koncentrací PQ, v obrázku jsou značeny čísly: 1. 20 μM , 2. 10 μM , 3. 5 μM , 4. 2,5 μM , 5. 1,25 μM , 6. 0,6 μM , 7. 0,3 μM

Jelikož změny genové exprese u *S. aureus* indukuje PQ i ve velmi nízké koncentraci 10 nM (Wolf et al., 2008), v dalších pokusech jsme nepracovali s koncentrací 1 μM PQ, ale vybrali jsme koncentraci 0,1 μM PQ. Tím jsme mohli vyloučit hynutí bakteriální populace po působení PQ. Tuto skutečnost jsme ověřili změřením růstové křivky *S. aureus* ATCC 25923 v BHI s 0,1 μM PQ, jejíž výsledek je popsán v kapitole 4.1.

4.3 Sledování vzniku perzisterů v krátkodobém časovém horizontu

Cíl: Měřením křivek hynutí sledovat toleranci bakteriální populace k působení různých antibiotik.

V první části pokusu jsme sledovali tvorbu perzistentního fenotypu bakterií v tekuté kultuře po působení antibiotik, v druhé části pokusu jsme nejprve kulturu vystavili osmotickému nebo oxidativnímu stresu a následně působení různých antibiotik. Testovali jsme bakterie v exponenciální fázi, které na rozdíl od buněk ve stacionární fázi vykazují nižší míru tolerance k antibiotikům (Lechner et al., 2012c), do budoucna budou provedeny pokusy i s buňkami ve stacionární fázi. Pro zjištění dynamiky formování perzistentního fenotypu jsme zvolili metodu výsevu buněk z tekuté kultury na agarové plotny kapkovou metodou (kap. 4.3). Tato metoda umožňuje rychlou izolaci buněk s perzistentním fenotypem využitelných pro další testování a robustní testování populační dynamiky kmene v různých podmínkách.

Pokusy jsme provedli ve třech biologických a dvou technických replikátech. S referenčním kmenem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 jsme provedli pokusy se všemi výše zmíněnými antibiotiky ve dvou koncentracích 10x a 100x MIC v podmínkách bez jiného stresu, v osmotickém stresu a v oxidativním stresu. S klinickými izoláty jsme provedli pouze testovací pokus s ciprofloxacinem o koncentraci 100x MIC bez dalšího stresu v jednom biologickém replikátu. Další pokusy s klinickými izoláty budou provedeny v budoucnu.

Jestliže se sestrojí graf počtu přeživších buněk (CFU/ml) v závislosti na čase, pokud jsou v kultuře přítomní perzisteri, takto sestavená křivka hynutí má typický bifázický průběh. To znamená, že po přidání antibiotika dochází k rychlému poklesu počtu živých buněk v kultuře o několik řádů, následované fází, kdy se po několik hodin počet živých buněk v kultuře v podstatě nemění (Balaban et al., 2004).

Časy odběrů budou značeny v textu pro lepší přehlednost zkratkou T a číslovkou času vyjádřených v hodinách, např. pro čas odběru po dvou hodinách od přidání antibiotika T2.

Rozdíly mezi jednotlivými biologickými replikáty mohou být způsobeny stochastickou povahou vzniku perzistentního fenotypu (Wiuff et al., 2005).

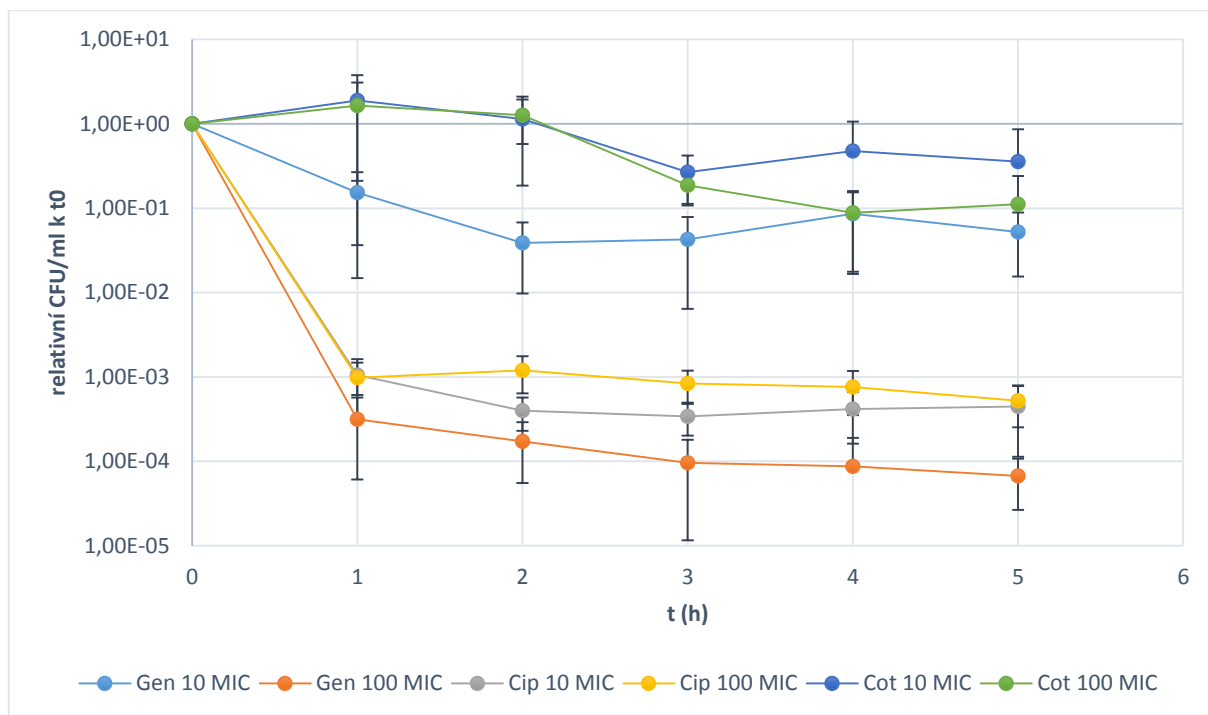
Počty přeživších buněk jsme korelovali na počet výchozích buněk v čase T0, a to tak, že jsme počet buněk v čase T0 určili číslem 1, v grafech tedy není znázorněn absolutní počet

buněk, ale pokles (nárůst) v porovnání s časem T0. Výpočet korelace jsme tedy provedli podle vzorce $x = \text{CFU}_{T(0-5)} / \text{CFU}_{T0}$, kde x = relativní počet buněk (CFU/ml) v časech T1-5 vztažených k počtu buněk v T0. V pokusech s nestresovanou kulturou byl čas T0 okamžik těsně před přidáním antibiotika, v pokusech se stresovanou kulturou byl čas T0 okamžik půl hodiny po přidání stresového faktoru a zároveň těsně před přidáním antibiotika.

4.3.1 Křivky hynutí v podmínkách s antibiotikem

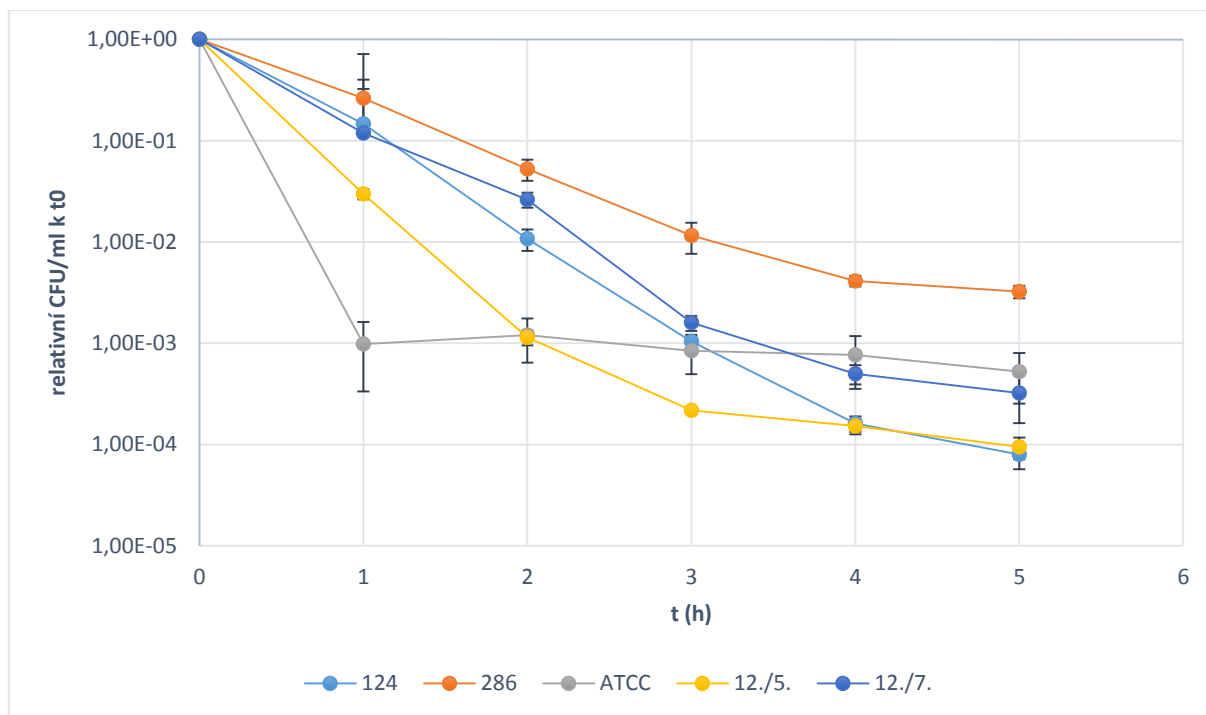
Sledovali jsme počet přeživších buněk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 po působení antibiotik po dobu pěti hodin (kap. 4.3.1). Použili jsme antibiotika gentamicin, ciprofloxacin a co-trimoxazol ve dvou různých koncentracích, 10-ti násobnou MIC (10x MIC) a 100 násobnou hodnotu MIC (100x MIC). Hodnoty MIC jednotlivých antibiotik jsou uvedené v kapitole 4.2.1. Výsledky jsme zanesli do grafu (Obr. 6). Po použití gentamicinu 10x MIC došlo k poklesu zhruba o jeden řád, u gentamicinu 100x MIC zhruba o čtyři řády, průběh této křivky hynutí vykazuje pro populaci obohacenou populaci typické bifázické hynutí. Počet bakterií v kultuře s ciprofloxacinem 10x i 100 x MIC poklesl o tři až tři a půl řádu bez závislosti na koncentraci antibiotika, i tato křivka má bifázický průběh. Při pokusu s co-trimoxazolem měla křivka hynutí stejný průběh při použití antibiotika o koncentraci 10x i 100x MIC. V časech T1 a T2 počet bakterií v populaci mírně stoupl, do konce pokusu došlo k poklesu o jeden řád. Co-trimoxazol je kombinované antibiotikum složené z sulfamethoxazolu a trimethoprimu, které interferují s metabolismem kyseliny listové, kterou bakterie přeměňují na thymidin, puriny a některé aminokyseliny (Hawser et al., 2006). Tyto látky jsou ale obsažené v komplexním médiu. Tím vysvětlujeme nízkou účinnost co-trimoxazolu v tomto uspořádání experimentu. Co-trimoxazol tedy není vhodný pro *in vitro* studie působení antibiotik na bakteriální populaci.

Odpověď populace bakterií kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na působení antibiotik tedy není u všech antibiotik stejná, v případě gentamicinu záleží, jestli je použita koncentrace 10x MIC nebo 100x MIC.



Obr. 6. Křivky hynutí *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 v BHI médiu s různými antibiotiky. Kultura byla kultivována s různými antibiotiky ve dvou koncentracích 10x a 100x MIC. Z tekuté kultury byly každou hodinu odebrány vzorky a vysety na plotnu BHI. V grafu je znázorněn počet přeživších bakterií v různých podmínkách. Gen = gentamicin, Cip = ciprofloxacin, Cot = co-trimoxazol. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů. Osa y je zobrazena v logaritmickém měřítku při základu 10.

Dále jsme stanovili křivku hynutí po působení ciprofloxacinu o koncentraci 100x MIC u klinických izolátů *Staphylococcus aureus* a průběh křivky porovnali s křivkou pro referenční kmen (Obr. 7). Byl proveden pouze jeden biologický replikát, jde tedy jen o testovací pokus. Oproti referenčnímu kmeni u klinických izolátů nedošlo k tak prudkému poklesu počtu buněk v čase T1, na konci pokusu ale byl pouze kmen 286 úspěšnější v přežití než kmen referenční.

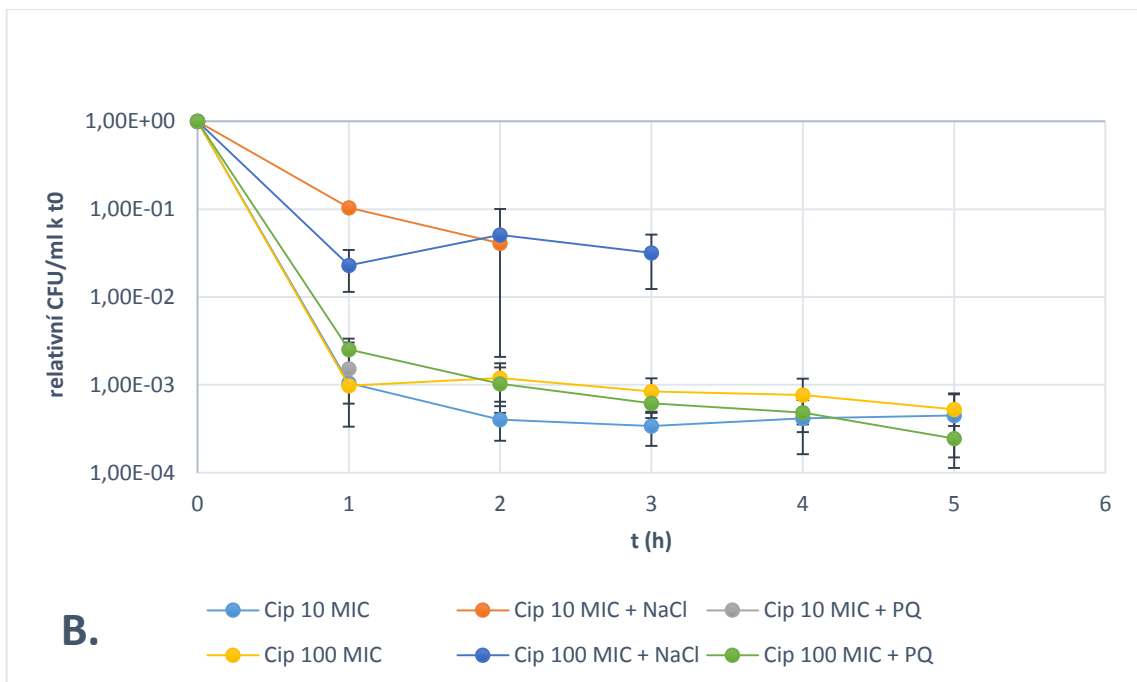
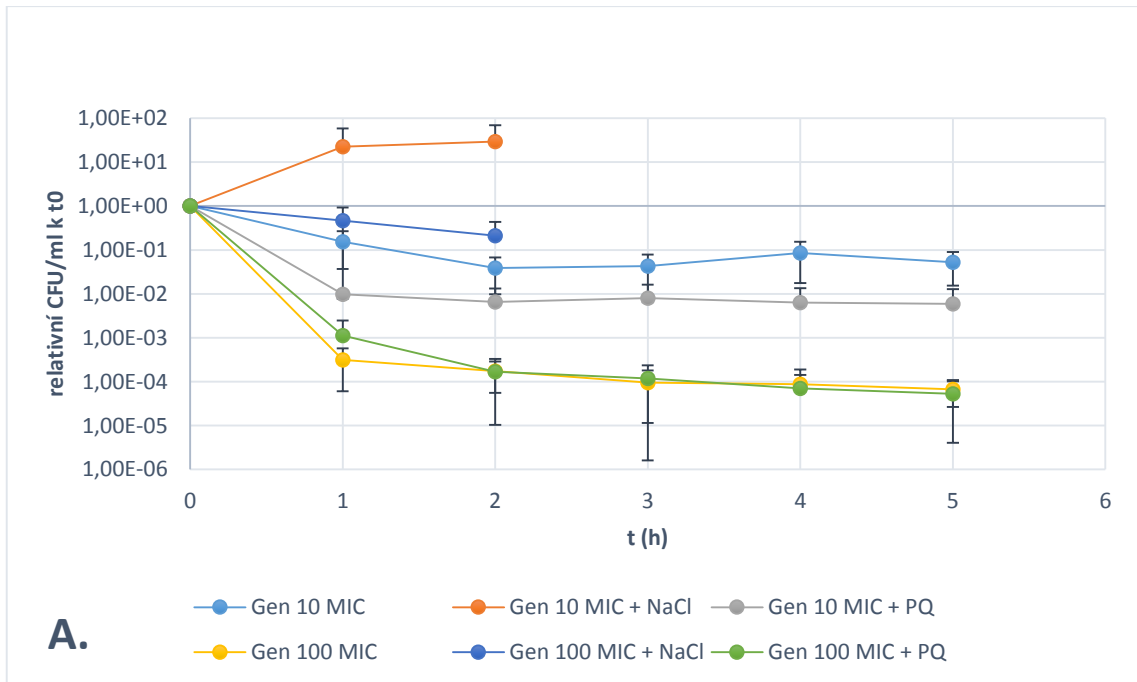


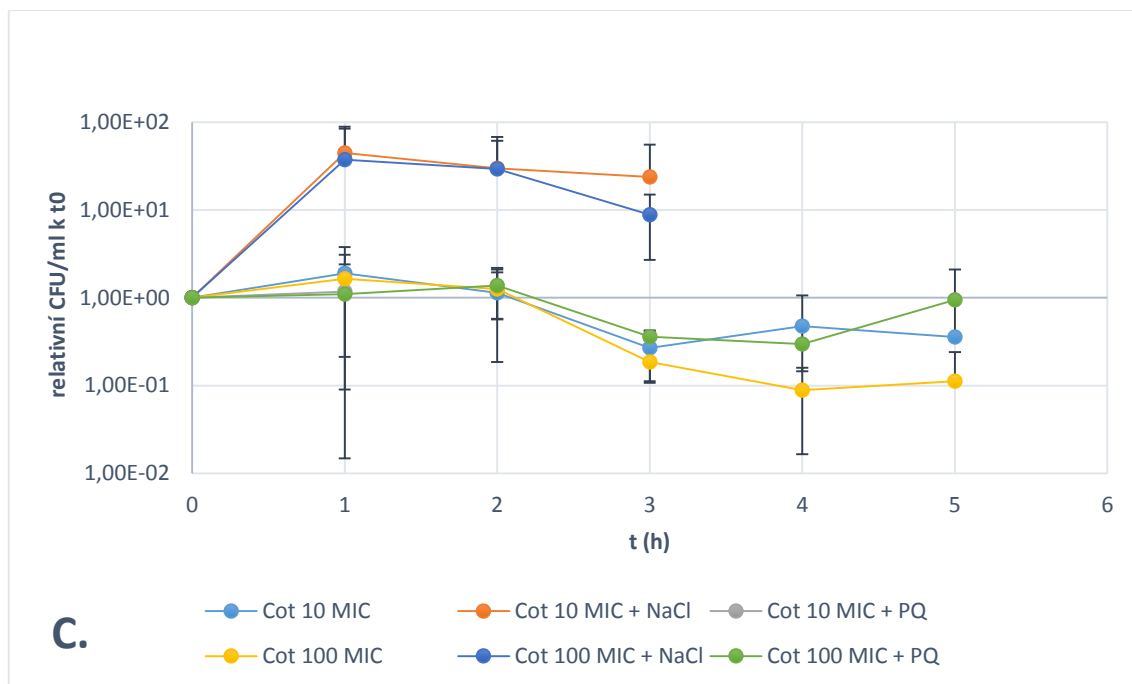
Obr. 7. Křivka hynutí klinických izolátů a referenčního kmene *Staphylococcus aureus* po působení ciprofloxacinu o koncentraci 100 x MIC. Jednotlivé kmeny byly kultivovány s ciprofloxacinem o koncentraci 100x MIC pro referenční kmen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Z tekuté kultury byly každou hodinu odebrány vzorky a vysety na plotnu BHI. V grafu je znázorněn počet přeživších bakterií. Legenda v grafu označuje různé kmeny popsané v kapitole 3.1.1. Chybové úsečky označují standartní odchylky ze dvou technických replikátů v případě klinických izolátů a tří biologických replikátů v případě referenčního kmene. Osa y je zobrazena v logaritmickém měřítku při základu 10.

4.3.2 Křivky hynutí stresované kultury s antibiotikem

Podle literatury (kap. 2.5.1) dochází při vystavení bakterií environmentálnímu stresu a tedy aktivaci stresové odpovědi ke zvýšení poměru perzisterů v bakteriální populaci. Testovali jsme růst ve stresových podmínkách, které se vyskytují v plicích pacientů s cystickou fibrózou (CF). Oxidativní stres je v plicích vyvoláván působením reaktivních kyslíkových radikálů uvolňovaných polymorfonukleárními leukocyty (Hull et al., 1997), osmotický stres je důsledkem samotného onemocnění u pacientů s CF, hlenová vrstva je hustší a s vyšším obsahem chloridových iontů než u zdravých lidí (Henderson et al., 2014a). Oxidativní stres jsme vyvolali přidáním PQ ke kultuře v tekutém BHI médiu, osmotický stres jsme navodili pěstováním bakterií v BHI médiu s 10% NaCl (kap. 3.2.5.2). Sestrojením grafů jsme porovnali průběh křivek hynutí bakteriální kultury po působení antibiotik bez jiného stresu, s osmotickým stresem a oxidativním stresem (obr. 8 A. B. C.). Po působení PQ byla míra přežívání pro všechna antibiotika stejná jako

v kultuře bez stresu. Ovšem po navození osmotického stresu byla míra přežití po působení všech antibiotik vyšší než v kultuře bez stresu. Tento experiment musel být ukončen po 3 – 4 hodinách, jelikož se v kultuře začal tvořit biofilm, poslední čas zanesený v grafu je poslední, kdy se v tekuté kultuře biofilm neobjevil.



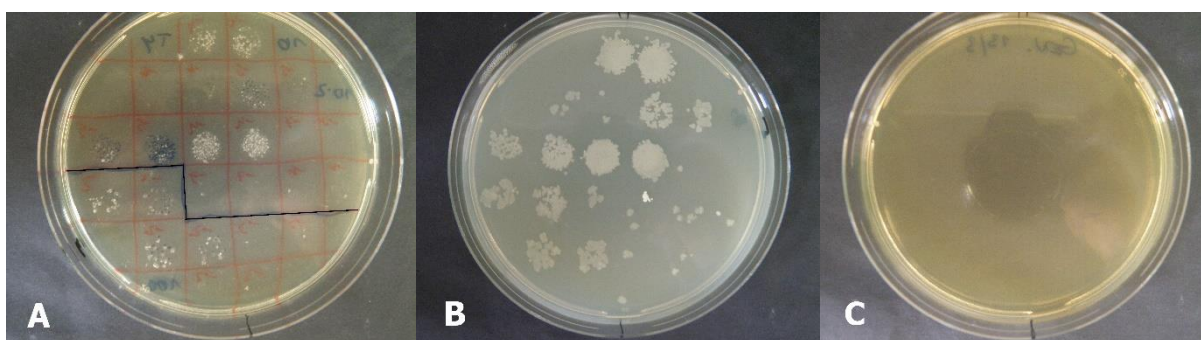


Obr. 8. Křivky hynutí stresované a nestresované kultury *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 po působení různých antibiotik. Kultura byla kultivována s různými antibiotiky ve dvou koncentracích 10x a 100x MIC. Půl hodiny před přidáním antibiotika byla stresována BHI s 10% NaCl (oranžově a tmavě modře) nebo 1 μM paraquat dichloridem PQ (šedivě a zeleně). Kultura, která před přidáním antibiotik nebyla stresována (kontrolní kultura) je označena světle modře a žlutě. Z tekuté kultury byly každou hodinu odebírány vzorky a vysety na plotnu BHI. V grafu je znázorněn počet přeživších bakterií v různých podmínkách. **A**) působení antibiotika gentamicinu (Gen) na kulturu *S. aureus* v různých podmínkách, **B**) působení antibiotika ciprofloxacinu (Cip) na kulturu *S. aureus* v různých podmínkách. **C**) působení antibiotika co-trimoxazolu (Cot) na kulturu *S. aureus* v různých podmínkách. Chybové úsečky označují standardní odchylky ze tří biologických replikátů. Osa y je zobrazena v logaritmickém měřítku při základu 10.

4.3.3 Testování na rezistentní mutanty

Cíl: otestovat, zda bakterie, které přežily působení antibiotik (kap. 3.2.5), představují perzistentní fenotypové varianty a nikoliv rezistentní mutanty.

Kulturu narostlou na BHI plotně z experimentů stanovení křivek hynutí bylo nutné otestovat, zda populace představuje opravdu perzistentní a ne rezistentní buňky. Nárůst na BHI misce jsme přerazítkovali na BHI plotnu s antibiotikem a LB plotnu bez antibiotika (kap. 3.2.6). Testování jsme provedli pouze s vybranými plotnami, jedno testování je zobrazeno na obrázku (obr. 9). Tímto způsobem jsme nezajistili žádné rezistenty, můžeme tedy říci, že izolované bakterie opravdu byli perzisteři.



Obr. 9. Testování na rezistynty razítkováním. **A:** Plotna z křivky hynutí, 4 h po působení gentamicinu na kulturu stresovanou PQ, horní část misky 10 MIC, dolní část misky 100 MIC. **B:** Miska A přerazítkovaná na plotnu s LB médiem. **C:** Miska A přerazítkovaná na plotnu s BHI média a gentamicinem o koncentraci 100 MIC.

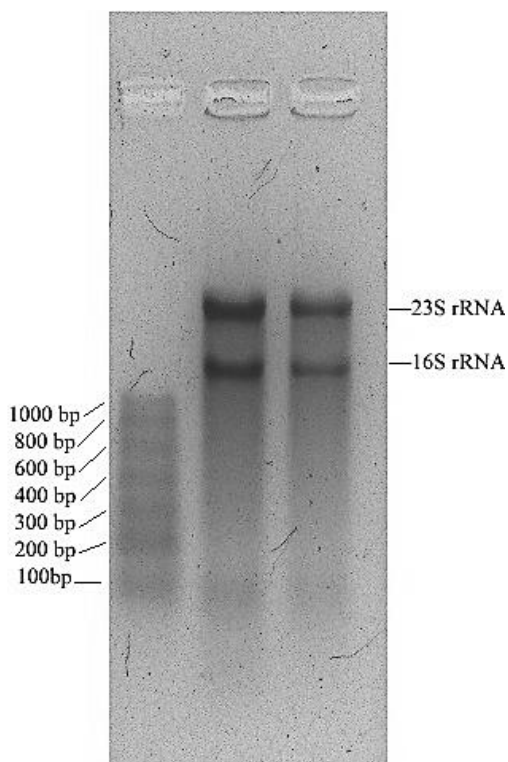
4.4 Sledování exprese genu *sigB* metodou kvantitativní PCR

Cíl: Určit, zda se po působení antibiotik a environmentálního stresu zvyšuje exprese *sigB*

Na základě poznatků z literatury popsanych v kapitole 2.6 víme, že transkripce alternativního sigma faktor SigB je indukována různými environmentálními vlivy a že má vliv na expresi mnoha dalších genů. SigB u *B. subtilis* má protektivní funkci vůči působení různých stresů. Naším cílem bylo určit míru exprese *sigB* u *S. aureus* v různých stresových podmínkách. Tyto výsledky jsme pak porovnali s křivkami hynutí, abychom zjistili, zda existuje spojitost mezi expresí *sigB* a mírou perzistence bakterií.

4.4.1 Izolace celkové RNA

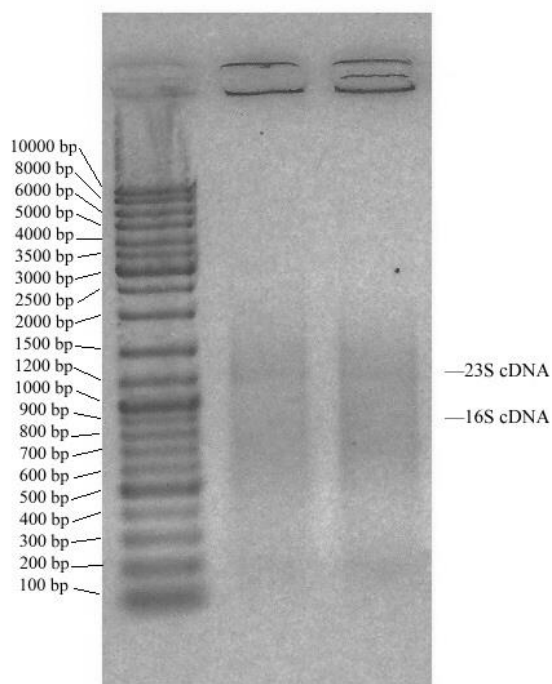
Dle literatury dochází k transkripci *sigB* operonu dochází již během 2 – 12 minuty po expozici stresovým faktorem (Pané-Farré et al., 2006). Izolovali jsme celkovou RNA (kap. 3.2.9) z buněk, které byly vystaveny stresu po dobu 10 min a 30 min (kap. 3.2.7). Stresové podmínky byly vytvořeny působením následujících látek, 10x MIC gentamicin, 100x MIC gentamicin, 100x MIC ciprofloxacin, 100x MIC co-trimoxazol 0,1 μ M PQ a pěstování v BHI médiu s 10% obsahem NaCl. Úspěšnost izolace jsme ověřili pomocí horizontální gelové elektroforézy (kap. 3.2.11, obr. 10).



Obr. 10. Příklad kontroly kvality izolované RNA gelovou elektroforézou

4.4.2 Převod celkové RNA na cDNA

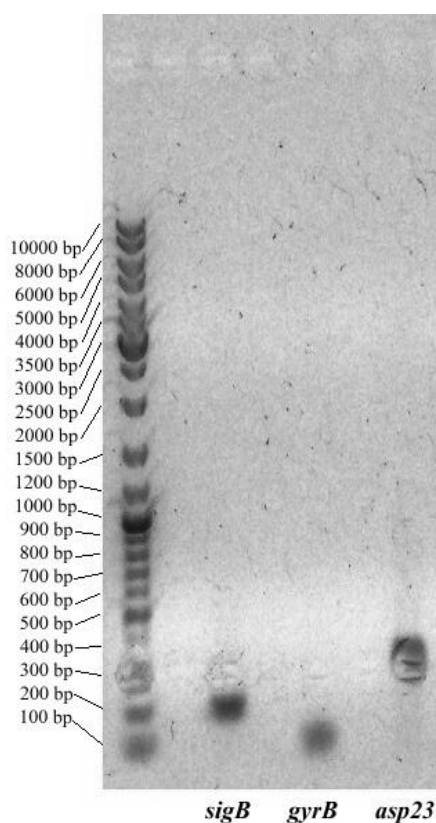
Úspěšně izolovanou celkovou RNA jsme převedli na cDNA postupem pospaným v kapitole 3.2.10. Úspěšnost tohoto procesu jsme zkontrolovali na horizontální gelové elektroforéze (kap. 3.2.11, obr. 11). Koncentraci a čistotu cDNA jsme změřili pomocí přístroje NanoDrop. Koncentrace cDNA se pohybovala v rozmezí zhruba 100 – 1000 ng/μl. Čistotu vzorku reflektují hodnoty poměru absorbancí vzorku při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm. V čistém vzorku by se měl index 260/280 pohybovat kolem 1,8 a index 260/230 v rozmezí 1,8 – 2,2. Odchýlené hodnoty znamenají znečištění.



Obr. 11. Příklad kontroly kvality cDNA gelovou elektroforézou

4.4.3 Testování primerů metodou standartní PCR

Metodou standartní PCR jsme testovali funkčnost primerů pro kvantitativní PCR (kap. 3.2.12). Primery byly konstruovány pro detekci provozního genu *gyrB* (podjednotka B DNA gyrázy), genu *sigB* (faktor RNA polymerázy sigma B) a genu *asp23* (protein alkalického šoku, který je přímo aktivován faktorem sigma B, používá se pro detekci exprese faktoru sigma B (Gertz et al., 1999)). Sekvence primerů jsou sepsány v kapitole 3.1.7. Provedli jsme PCR reakci, kde jako templát sloužila chromozomální DNA *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (kap. 3.2.8). Úspěšnost PCR a tedy funkčnost primerů jsem ověřili horizontální gelovou elektroforézou z PCR reakce (obr. 12). Velikost proužků pro jednotlivé PCR reakce odpovídala očekávané délce PCR produktu, *sigB* 200 bp, *gyrB* 150 bp, *asp23* 350 bp.



Obr. 12. Elektroforéza PCR produktů. Velikost PCR produktů genu *sigB* odpovídá 200 bp, *gyrB* 150 bp, *asp23* 350 bp.

4.4.4 Kvantitativní PCR (qPCR)

Ke kvantifikaci vybraných transkriptů ve vzorků metodou qPCR jsme využili FastStart Essential DNA Green Master sadu od firmy Roche (kap. 3.2.13) a Real-time PCR cycler Bio-Rad IQ5. Při amplifikaci transkriptu se do malého žlábků DNA interkaluje barvivo SYBR Green I a je měřena jeho fluorescence resp. cyklus, ve kterém dojde k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, tento cyklus se označuje C_T (cycle of treshold). Hodnota C_T odráží množství transkriptu ve vzorku. Gen *gyrB* sloužil jako vnitřní standard, geny *sigB* a *asp23* byly cílové geny. Templátem byla cDNA (kap. 3.2.10).

Pro stanovení standartní křivky byla templátem chromozomální DNA (kap. 3.2.8) o známé koncentraci 57,76 ng/ μ l, 5,776 ng/ μ l, 0,5776 ng/ μ l a 0,05776 ng/ μ l, koncentrace chromozomální DNA v jedné reakci byla tedy 14,44 ng/ μ l, 1,444 ng/ μ l, 0,1444 ng/ μ l a 0,01444 ng/ μ l. Ze sklonu standartní křivky byla softwarem cycleru vypočtena efektivita amplifikace pro

jednotlivé dvojice primerů. Pokud je efektivita 100 %, každý cyklus se množství DNA zdvojnásobí, efektivita tedy odpovídá hodnotě 2. V našem případě se efektivita amplifikace pohybovala v hodnotách 1,85 – 1,63.

Pokus byl proveden ve dvou technických replikátech, kvantifikace hladiny mRNA genu *sigB* byla provedena ve třech biologických replikátech, pro gen *asp23* pouze ve dvou biologických replikátech.

4.4.4.1 Kvantifikace exprese

Expresi studovaných genů v různých podmínkách jsme vyhodnotili metodou $\Delta\Delta C_T$. Míra exprese cílového genu (*sigB* a *asp23*) je porovnávána s mírou exprese referenčního genu (*gyrB*), hodnota C_T vzorku byla odečtena od hodnoty C_T kontroly. Hladiny mRNA vzorků (s antibiotikem, PQ nebo NaCl) byly takto normalizovány na relativní množství mRNA v kontrolním vzorku K (bez antibiotik, PQ nebo NaCl). Ve výpočtu je zahrnuta efektivita amplifikace (Pfaffl, 2001). Výpočet je tedy následující:

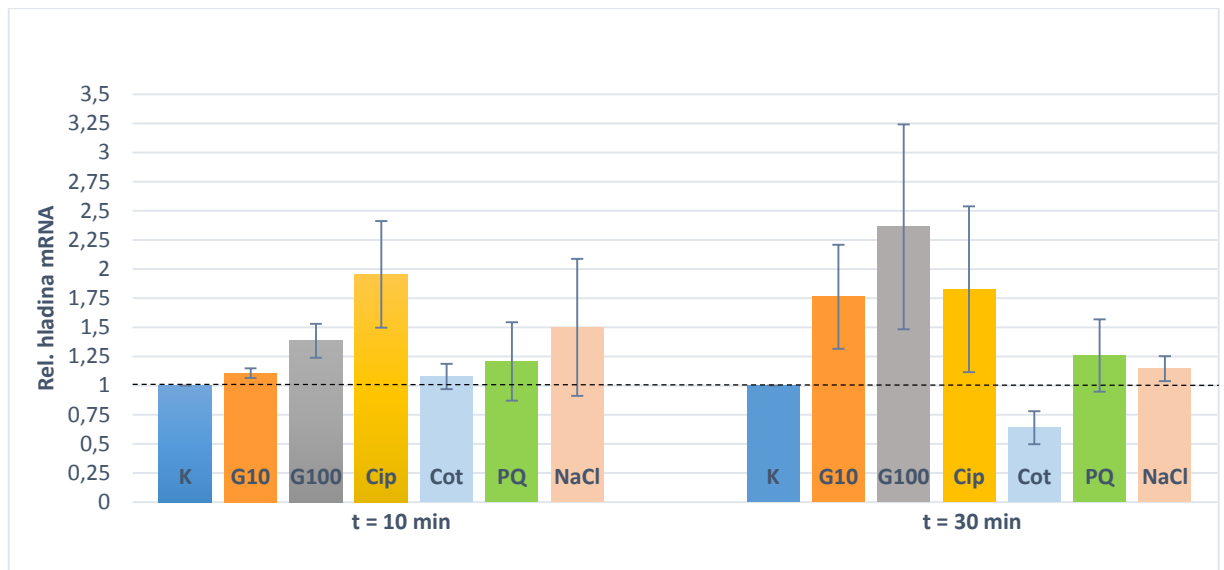
$$R = \frac{\text{cílový gen}}{\text{referenční gen}} = \frac{E^{\Delta C_T(\text{kontrola-vzorek})}}{E^{\Delta C_T(\text{kontrola-vzorek})}}$$

E = efektivita (1,85 – 1,63 pro jednotlivé dvojice primerů). C_T = prahový cyklus (threshold cycle). Výsledkem (R = ratio) je tedy relativní míra exprese cílového genu ve sledovaných podmínkách (vzorek) v porovnání se standartními podmínkami (kontrola).

Pro výpočet jsme využili průměr naměřených C_T z technických duplikátů, které se lišili maximálně o 0,4.

Pokus kvantifikace exprese *sigB* jsme provedli ve třech biologických replikátech, do grafu jsme zanesli průměr ze třech biologických replikátů (obr. 13). Do výsledků jsme nezanesli dvě odchýlené hodnoty – 2. biologický replikát vzorku co-trimoxazol 100x MIC 10 min a 2. biologický replikát vzorku co-trimoxazol 100x MIC 30 min.

Výsledky jsme zanesli do grafů.

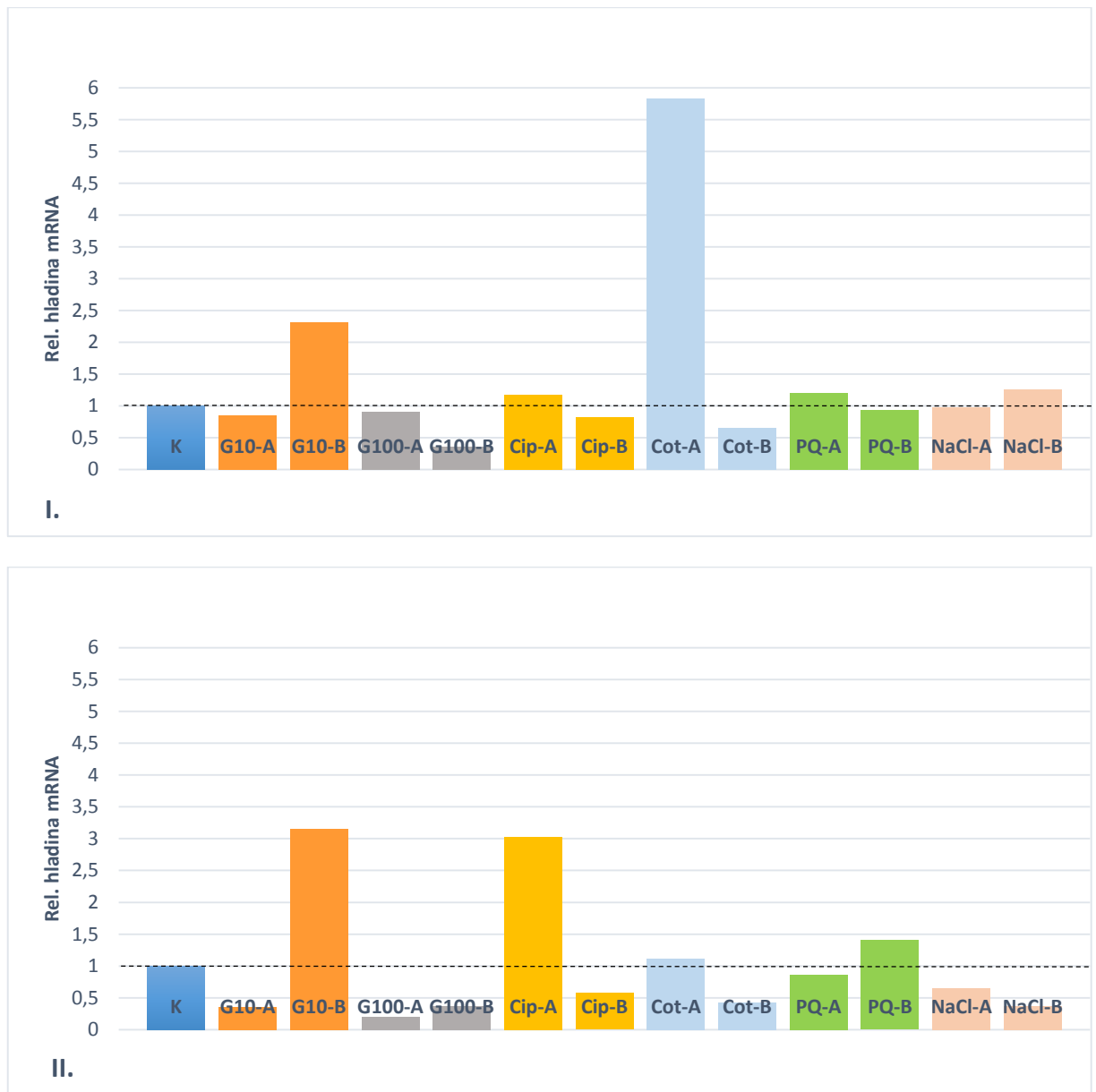


Obr. 13. Relativní hladina mRNA genu *sigB* v různých podmínkách kultivace v časech odběru 10 min a 30 min. K vyhodnocení jsme použili metodu $\Delta\Delta C_T$. Hladiny mRNA vzorků (stresované) byly normalizovány na relativní množství mRNA v kontrolním vzorku K (nestresovaný). Chybové úsečky označují standartní odchylky ze tří biologických replikátů. **K** = kontrolní kultura, **G10** = gentamicin 10x MIC, **G100** = gentamicin 100 x MIC, **Cip** = ciprofloxacin 100x MIC, **Cot** = co-trimoxazol 100x MIC, **PQ** = paraquat 0,1 μ M, **NaCl** = BHI s 10% NaCl.

Relativní hladina mRNA *sigB* byla téměř ve všech studovaných podmínkách vyšší než ve standartních podmínkách kromě kultivace s co-trimoxazolem 100x MIC v čase 30 min, kdy byla relativní exprese *sigB* nižší.

Rozdíly mezi jednotlivými biologickými replikáty bychom mohli přisuzovat stochasticitě molekulárních procesů (Elowitz et al., 2002).

Pokus kvantifikace exprese genu *asp23* jsme provedli ve dvou biologický replikátech, do grafu jsme zanesli výpočet z obou biologický replikátů zvlášť (obr. 14).



Obr. 14. Relativní hladina mRNA genu *asp23* v různých podmínkách kultivace. K vyhodnocení jsme použili metodu $\Delta\Delta C_T$. Hladiny mRNA vzorků (stresované) byly normalizovány na relativní množství mRNA v kontrolním vzorku K (nestresovaný). **I.** – čas odběru 10 min. **II.** – čas odběru 30 min. **A** – 1. biologický replikát. **B** – 2. biologický replikát. **K** = kontrolní kultura, **G10** = gentamicin 10x MIC, **G100** = gentamicin 100 x MIC, **Cip** = ciprofloxacin 100x MIC, **Cot** = co-trimoxazol 100x MIC, **PQ** = paraquat 0,1 μ M, **NaCl** = BHI s 10% NaCl.

Z grafů je patrné, že jednotlivé výsledky biologických replikátů se lišily ve čtyřech případech. Pokud bychom sledovali celkový trend exprese *asp23* ve vytvořených podmínkách a opominuli bychom vychýlené hodnoty, mohli bychom konstatovat, že relativní hladina

mRNA genu *asp23* stresované kultury se oproti kontrolní kultuře nezvyšuje. Pro ověření těchto výsledků je ale samozřejmě nutné provést i třetí biologický replikát.

4.5 Měření vitality buněk metodou průtokové cytometrie

Cíl: Využitím komerční sady LIVE/DEAD vitality kit určit vitalitu populace buněk po působení antibiotik.

Poznatky z literatury naznačují, že bakteriální populace není složena z buněk ve stejném fyziologickém stavu, i když je vystavena stejným vnějším vlivům, ale vyznačuje se fenotypovou heterogenitou. Po vystavení bakteriální kultury účinkům antibiotik dochází k eliminaci většiny buněk, přežije populace perzisterů. Bylo zjištěno, že existují minimálně dva typy perzisterů, nerostoucí v dormantním stavu a pomalu rostoucí (Balaban et al., 2004). Navození stavu dormance se zdá být jedním z velice častých strategií přežití perzisterů (Keren et al., 2004a; Shah et al., 2006). Cílem tohoto pokusu bylo metodou průtokové cytometrie rozlišit fyziologický stav buněk a rozdělit je na mrtvé s porušenou membránou, živé s intaktní membránou metabolizující a živé s intaktní membránou nemetabolizující. Poslední zmíněná populace by měla představovat bakterie ve stavu dormance.

K rozlišení fyziologického stavu metodou průtokové cytometrie jsme použili komerční sadu LIVE/DEAD vitality kit, která obsahovala dvě fluorescenční značky, nebarevný C₁₂-resazurin, který je v metabolicky aktivních buňkách redukován NADH/NADPH na červený C₁₂-resorufin a zelený SYTOX Green, který se váže na DNA u buněk s porušenou membránou, což jsou většinou mrtvé buňky. Postup přípravy vzorků a měření je popsán v kapitole 3.2.14.

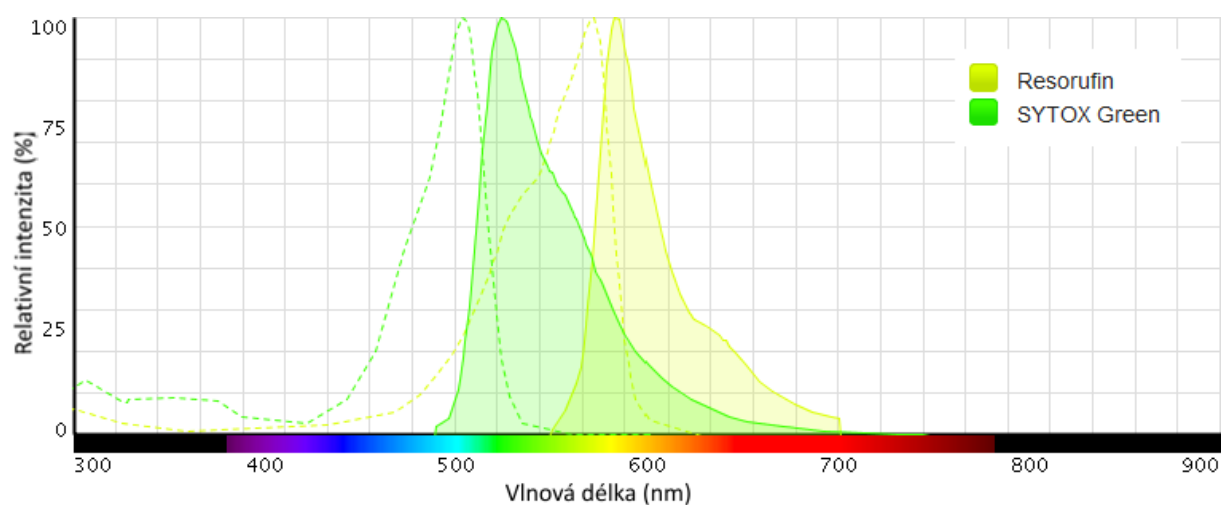
Analyzovali jsme referenční kmen *S. aureus* ATCC 25923 a čtyři klinické izoláty popsané v kapitole 3.1.1. Referenční kmen *S. aureus* jsme testovali na antibiotika gentamicin o koncentrací 10x a 100x hodnoty MIC a ciprofloxacin 100x MIC, klinické izoláty na ciprofloxacin 100x MIC. Testování *S. aureus* ATCC 25923 s gentamicinem o koncentraci 10x a 100x MIC bylo provedeno v biologickém triplikátu, ostatní měření pouze v biologickém duplikátu.

Pro vyhodnocení bylo nejprve nutné provést kompenzaci na překrývání emisních spekter obou barev. Jelikož se nám nepodařilo správně naměřit jednobarevné kontroly a provést automatickou kompenzaci, určili jsme kompenzaci empiricky podle překryvu emisních spekter

(obr. 15). Kompenzaci jsme provedli v programu Apogee Histogram Software. Výsledné hodnoty kompenzace jsou zapsané v tabulce 2.

	Odpočet Grn	Odpočet Org	Odpočet Red
Z Grn	X	50	80
Z Org	10	X	30
Z Red	100	50	X

Tab. 2. Hodnoty kompenzace

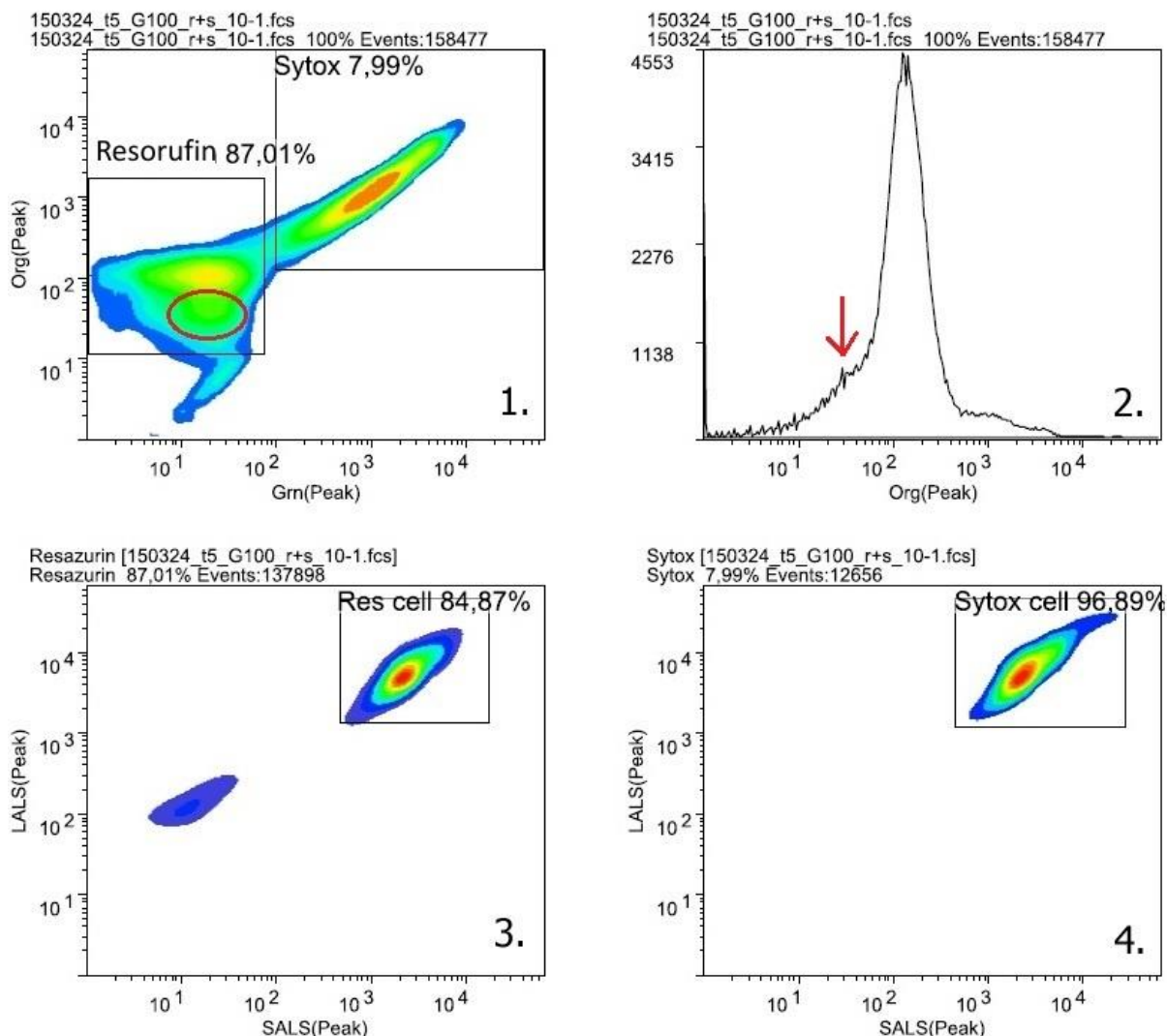


Obr. 15. Zobrazení překryvu fluorescenčních spekter barev SYTOX Green a Resorufin: excitace přerušovaná čára, emise plná čára. Zdroj <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home.html> Fluorescence spectra viewer.

Výsledky jsme vyhodnotili v programu Flowlogic za použití zobrazení v bodovém diagramu zelená versus oranžová fluorescence (Obr. 16.1). Populace se měla rozdělit do tří skupin (Cronin and Wilkinson, 2008a):

- intaktní metabolicky aktivní buňky, které redukovali bezbarvý C₁₂-resazurin na červený C₁₂-resorufin (červená ale ne zelená fluorescence)
- buňky s porušenou membránou s obarvenou DNA (zelená ale ne červená fluorescence)
- intaktní ale metabolicky neaktivní buňky (ani zelená, ani červená fluorescence)

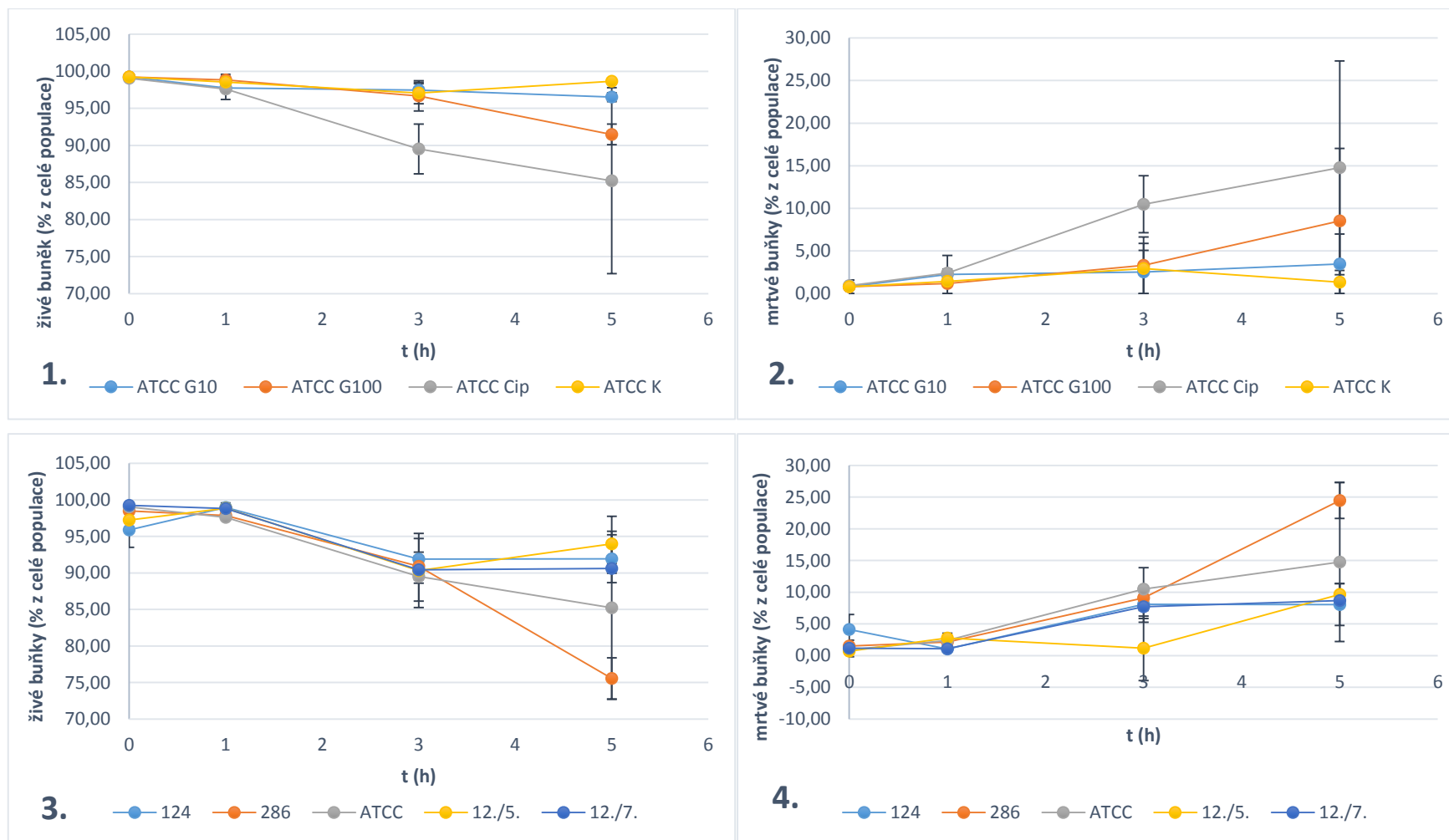
Z našich výsledků ale nebylo možné tři populace zcela rozlišit. Rozdíl ve fluorescenci mezi živými metabolicky aktivními a neaktivními buňkami se zdál být velmi malý, navíc jsme detekovali tak vysoké pozadí, že tuto populaci nebylo možné samostatně zanalyzovat. Malá populace živých metabolicky neaktivních buněk je na obrázku (obr. 16.1) vyznačena červenou elipsou, na histogramu intenzity oranžové fluorescence (obr. 16.2) lze vidět mírný vrchol méně fluoreskující populace označený červenou šipkou. U všech měření byla tato subpopulace vždy minoritní, dosahovala hodnot pouze zlomku procenta. Rozlišování živých nemetabolizujících buněk jsme proto opomenuli a spolu s metabolizujícími buňkami jsme je zařadili do skupiny živých buněk oproti buňkám mrtvým. Bodový diagram jsme rozdělili na dva regiony – resorufin+ buňky živé a sytox+ buňky mrtvé. Přesný gating jsme nemohli provést, jelikož se fluorescence a tvar populací v jednotlivých vzorcích měnil, což mohlo být způsobeno vysokým pozadím částic z pufru a autofluorescencí buněk samotných. Populaci buněk jsme určili v zobrazení SALS (velikost) versus LALS (granulozita), postupným zředováním bakteriální kultury a změřením samotného PBS pufru. V zobrazení bodového diagramu SALS versus LALS se v populaci resorufin+ oddělily body, které představují buňky, od bodů, které jsou jen pozadí (obr. 16.3). Stejným způsobem jsme analyzovali populaci sytox+ (obr. 16.4).



Obr. 16. Příklad výsledků zpracovaných v programu Flowlogic. Vzorek *S. aureus* ATCC 25923 po pěti hodinách kultivace s gentamicinem o koncentraci 100x hodnoty MIC. Zobrazení je v logaritmičném měřítku **1.** Bodový diagram zelená vs. oranžová fluorescence, obraz je rozdělen na dva region – pro sytox+ mrtvé buňky a resazutin+ (respektive resorufin+) živé buňky Červenou elipsou je označena malá populace živých metabolicky neaktivních buněk. **2.** Histogram oranžové fluorescence, červenou šipkou je naznačen mírný vzestup fluorescence značící přítomnost druhé menší a méně intenzivněji fluoreskující populace živých metabolicky neaktivních buněk. **3.** Bodový diagram SALS (velikost) vs. LALS (granulozita) regionu resazurin+ událostí, gating je proveden na buňky, zbylé body jsou pozadí. **4.** Bodový diagram SALS (velikost) vs. LALS (granulozita) regionu sytox+ událostí, gating je proveden na buňky, ostatní body jsou pozadí.

Výsledkem této analýzy bylo procento živých a mrtvých buněk (bez pozadí) z celkového počtu naměřených událostí. Jelikož jsme analyzovali v zobrazení bodového diagramu SALS (velikost) versus LALS na rozlišení buněk a pozadí pouze body v regionech resazurin+ a sytox+, bylo nutné provést takový přepočít, abychom jako výsledek neměli

procento živých a mrtvých buněk (bez pozadí) z celkového počtu naměřených událostí, ale z celkového počtu buněk. Tento přepočítání jsme udělali pomocí trojčlenky, tedy podle vzorce $(100 * \% \text{ res buňky}) / (\% \text{ res buňky} + \% \text{ sytox buňky})$ pro živé buňky. Procenta jsou z celkového počtu událostí. Hodnoty získané tímto výpočtem jsme zanesli do grafů zvlášť pro živé buňky (Obr. 16.1, Obr. 16.3) a mrtvé buňky (Obr. 16.2, Obr. 16.4). Pro lepší přehlednost jsme do grafu vynesli průměrné hodnoty získané měřeními ve třech i ve dvou biologických replikátech.



Obr. 17. % živých a mrtvých buněk z celkové populace. Data byla získána metodou průtokové cytometrie s použitím LIVE/DEAD vitality kit. Na ose x je zobrazena doba působení antibiotika, na ose y % živých nebo mrtvých buněk z celkové populace. Chybové úsečky označují standartní odchylky. **1.** % živých buněk *S. aureus* ATCC po působení různých antibiotik. **2.** % mrtvých buněk *S. aureus* ATCC po působení různých antibiotik. **3.** % živých buněk klinických izolátů *S. aureus* a *S. aureus* ATCC po působení ciprofloxacinu 100x MIC. **4.** % mrtvých buněk klinických izolátů *S. aureus* a *S. aureus* ATCC po působení ciprofloxacinu 100x MIC.

V případě měření fyziologického stavu referenčního kmene *S. aureus* ATCC 25923 bylo zjištěno v čase T5 největší množství mrtvých buněk v případě vzorku s ciprofloxacinem 100x MIC (15 %), dále pak s gentamicinem 100x MIC (9 %) a gentamicinem 10x MIC (3 %). V kontrolním vzorku (bez antibiotik) nebylo zaznamenáno výrazné hynutí buněk. V případě měření klinických izolátů a referenčního kmene *S. aureus* s ciprofloxacinem o koncentraci 100x MIC bylo nejvíce mrtvých buněk zaznamenáno v případě kmenu 286 (24 %), pak v referenčním kmenu (15 %), další tři klinické izoláty obsahovali přibližně stejně velkou populaci mrtvých buněk (kolem 9 %). Kontrolní vzorek (bez antibiotik) klinických izolátů vždy obsahoval < 1 % mrtvých buněk, tato data jsme pro lepší přehlednost nezobrazovali.

5 DISKUZE

Bakterie *Staphylococcus aureus* jsou běžnou součástí bakteriální flóry lidské kůže a měkkých tkání. Za určitých okolností mohou způsobovat různě závažné kožní infekce, záněty plic a srdce až závažné septické stavy a intoxikace. Jako každé infekce se i ty způsobené bakteriemi *S. aureus* léčí antibiotiky. Již několik let po zavedení antibiotik do klinické praxe bylo jasné, že antibiotika nejsou „magic bullet“, jak byla v té době nazývána, byla objevena rezistence u bakterií a do dnes je zkoumání mechanismů rezistence cílem mnoha vědeckých studií. V roce 1944 byl ale objeven i jiný fenomén odolnosti bakterií vůči antibiotikům, byl nazván perzistence. Perzisteri jsou fenotypové varianty, které jsou odolné k antibiotikům, i když nenesou geny pro rezistence k antibiotikům (Bigger, 1944).

Perzisteri *S. aureus* se často vyskytují v plicích pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) a jsou příčinou neúspěšnosti léčby pneumonií (Valenza et al., 2008). Po zdánlivém vyléčení infekce podáváním antibiotik se po čase znovu objeví projevy infekce. Kmeny izolované ze sputa těchto pacientů jsou většinou stejné před léčbou i při znovuobjevení po léčbě, což naznačuje, že tyto perzisteri zůstávají v plicích pacientů skryti před působením antibiotik a imunitního systému (Fodor et al., 2012). Nejvíce studovaný perzistentní fenotyp *S. aureus* izolovaný z plic pacientů s CF jsou fenotypové varianty tzv. trpasličí kolonie small-colony variants (SCVs) (Kahl et al., 1998).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala studiem fenoménu perzistence u bakterií *S. aureus*. Práce je součástí projektu laboratoře Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, který má za cíl charakterizovat perzistenci bakterií *S. aureus* u pacientů s CF. Mezi cíle mé diplomové práce patřilo studium perzistence na populační úrovni, které jsme provedli měřeními křivek hynutí za působení různých antibiotik v nestresových a stresových podmínkách. Dále jsme metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) chtěli zjistit, zda se po působení antibiotik a environmentálního stresu zvyšuje exprese alternativního sigma faktoru *sigB*. Vzhledem k tomu, že SigB moduluje obecnou stresovou odpověď a u bakterií *B. subtilis* má protektivní funkci vůči budoucím stresům, cílem bylo zjistit, zda existuje vztah mezi vznikem perzisterů a expresí *sigB*. Čtvrtý cíl byl metodou průtokové cytometrie charakterizovat fyziologický stav buněk v populaci po působení antibiotik. Tyto všechny pokusy byly prováděny na referenčním kmeni *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (Seattle 1945) (ATCC[®] 25923[™]). Cílem celého projektu je ale charakterizovat vznik perzistenci také u klinických izolátů *Staphylococcus aureus* ze sputa pacientů s CF. Proto byly

některé pokusy v mé diplomové práci provedeny i s klinickými izoláty. Tyto pokusy byly ale pouze testovací a závěry z výsledků těchto pokusů jsou pouze orientační.

Prvním cílem diplomové práce bylo měřením křivek hynutí zjistit toleranci bakteriální populace k působení různých antibiotik v nestresových a stresových podmínkách. Nejprve bylo ale nutné charakterizovat testovaný kmen *S. aureus* ATCC 25923 a změřit růstové křivky bez antibiotik (kap. 4.1). A dále vzhledem k následujícím pokusům, kdy jsme měřili hynutí bakteriální populace po působení antibiotik v nestresované kultuře, v kultuře s 0,1 μM PQ a v kultuře s 10% NaCl, bylo nutné nejprve změřit růstové křivky při těchto stresech, aby se dal vyloučit vliv stresových podmínek na průběh přežívání bakterií. Měřili jsme optickou densitu OD_{600} bakteriální kultury v tekutém BHI médiu, v tekutém BHI médiu s 0,1 μM paraquat dichloridem (PQ) a v tekutém BHI médiu s 10% NaCl. PQ byl použit pro navození oxidativního stresu. Na základě výsledků popsaných v kapitole 4.2.2 jsme určili koncentraci PQ, která navodí oxidativní stres, ale zároveň nebude mít větší vliv na růst bakteriální populace. Tyto stresy jsme zvolili proto, že v plicích pacientů s CF jsou bakterie vystaveny oxidativnímu stresu, který je navozen reaktivními kyslíkovými radikály, které jsou uvolňovány polymorfonukleáry (Hull et al., 1997). Osmotický stres je způsoben samotným onemocněním, hlenová vrstva v plicích je hustší s vyšší koncentrací chloridových iontů (Henderson et al., 2014b). Zvolené koncentrace stresových faktorů významně nesnižily schopnost přežívání, průběh růstových křivek (Obr. 4) byl za všech podmínek obdobný, nebyl tedy pozorován vliv stresového faktoru na průběh růstu. Během růstu v BHI médiu bez stresu, s PQ i s NaCl, se v kultuře objevil zhruba po třech hodinách od zaočkování biofilm. Růstovou křivku bylo tedy možné měřit jen do toho okamžiku. Biofilm se u bakterií *S. aureus* tvoří v reakci na osmotický stres (Lim et al., 2004; Rachid et al., 2000) a oxidativní stres (Kulkarni et al., 2012). Proč se ale biofilm tvořil i v kultuře bez stresu nevíme a tento jev nebyl popsán v literatuře.

Dále jsme přistoupili k měření křivek hynutí. Jelikož jsou ze sputa pacientů s CF nejčastěji izolované perzistentní varianty SCVs, původní záměr byl spolu s křivkami hynutí určovat i fenotyp kolonií perzistentní populace, která v našich pokusech přežila působení antibiotik. Z důvodu časové a finanční náročnosti tohoto provedení, kdy bychom museli z jednoho odběru a jednoho ředění vysít bakteriální kulturu na jednu celou misku, jsme od toho záměrů upustili. Místo toho jsme zavedli kapkovou metodu výsevu, která je popsána v kapitole 3.2.5, při použití této metody nelze fenotyp kolonií určit. Z několika pilotních pokusů je ale zřejmé, že SCV varianty vznikají i při pěstování v laboratorních podmínkách a nejen při

interakci s hostitelem. Zvolenou kapkovou metodou jsme ale mohli provést robustní šetření dynamiky vzniku perzistenci v různých podmínkách.

Změřili jsme křivky hynutí nestresované kultury *S. aureus* ATCC 25923 v tekutém BHI médiu (kap. 3.2.5.1). Testovali jsme přežívání bakterií po působení třech antibiotik vždy v koncentraci 10 a 100 násobku hodnoty MIC (hodnoty MIC pro jednotlivá antibiotika jsou uvedené v kap. 4.2.1), která se používají v klinické praxi k léčbě infekcí u pacientů s CF. Použili jsme antibiotika gentamicin, ciprofloxacin a co-trimoxazol. Stejná antibiotika o těchto dvou koncentracích jsme použili i v případě sledování hynutí stresované bakteriální populace. Počty přeživších bakterií jsou znázorněny v grafu (Obr. 6). Křivky hynutí změřené v podmínkách přítomnosti antibiotik gentamicinu 100x MIC, ciprofloxacinu 10x MIC a ciprofloxacinu 100x MIC mají bifázický průběh typický pro bakteriální populaci obohacenou o perzistery (Balaban et al., 2004). Křivky hynutí s antibiotiky gentamicin 10x MIC, co-trimoxazol 10x a cotrimoxazol 100x MIC vykazovaly větší odolnost. V případě co-trimoxazolu to bude z důvodu nevhodnosti použití tohoto antibiotika pro *in vitro* studie, jak bylo diskutováno v kapitole 4.3.1. Rozdílné průběhy křivek hynutí po působení různých antibiotik naznačují, že neexistuje jednotná strategie, jak se vyrovnat působení všech antibiotik, což koresponduje s poznatky v literatuře (kap. 2.4).

Provedli jsme jeden testovací pokus přežívání čtyř klinických izolátů *S. aureus* působení ciprofloxacinu 100x MIC. Z jednoho pokusu nemůžeme vyvozovat závěry, ale dle výsledků z tohoto pokusu se přežívání klinických izolátů významně neliší od přežívání referenčního kmene *S. aureus* ATCC 25923, mírně zvýšená tolerance byla zjištěna pouze u kmene 286 (Obr. 7). Do budoucna budou v rámci tohoto projektu provedeny křivky hynutí s klinickými izoláty se všemi výše zmíněnými antibiotiky. Tímto pokusem jsme navázali na práce týmu S. Lechner (Lechner et al., 2012a) a jejich výsledky rozšířili o další antibiotika.

Dále nás zajímalo, zda navození stresu před působením antibiotik má vliv na tvorbu perzisterů. Jak je známo, osmotický stres aktivuje alternativní sigma faktor SigB a tím spouští obecnou stresovou odpověď (Pané-Farré et al., 2006), která má u bakterií *B. subtilis* protektivní funkci proti působení dalších stresů (Hecker et al., 2007). I když se zdá, že SigB u *S. aureus* reguluje spíše bazální buněčné funkce (Bischoff et al., 2004), změřili jsme křivku hynutí bakteriální populace, která byla před přidáním antibiotik nejprve po dobu 30 min vystavena osmotickému stresu vyvolaným pěstováním v BHI médiu s 10% NaCl (kap. 3.2.5.2). Ve všech případech přežilo působení antibiotik o 1 – 2,5 řádu více bakterií v porovnání s nestresovanou kulturou (Obr. 8). To naznačuje, že adaptační mechanismy osmotického stresu mohou též

podpořit navození perzistence. V kultuře se ale během pokusu objevil biofilm, tento jev je popsán v literatuře (Lim et al., 2004; Rachid et al., 2000). V porovnání s tvorbou biofilmu v kultuře bez antibiotik se v kultuře s antibiotiky gentamicin o koncentraci 10x MIC, cotrimoxazol 10x a cotrimoxazol 100x MIC vytvořil biofilm asi o hodinu později. Tvorba biofilmu je u *S. aureus* mimo jiné indukována sub-inhibiční koncentrací některých antibiotik prostřednictvím sigma faktoru SigB (Mitchell et al., 2008), stejně tak tvorba biofilmu v reakci na osmotický stres je regulována faktorem SigB (Rachid et al., 2000). Tvorba biofilmu je tedy výsledkem reakce na několik signálů. Nejspíš proto se biofilm v kultuře vystavené osmotickému stresu v přítomnosti těchto antibiotik objevil později.

Bylo zjištěno, že bakterie *E. coli* vystavené oxidativnímu stresu lépe přežívají působení fluorochinolových antibiotik (Wu et al., 2012a). V našem pokusu jsme bakteriální kulturu *S. aureus* ATCC 25923 nejprve půl hodiny kultivovali s 0,1 μM PQ, který navozuje oxidativní stres, poté jsme ke kultuře přidali antibiotikum a změřili přežívání jeho působení (kap. 3.2.5.2). Výsledkem takto provedeného pokusu bylo, že oxidativní stres vyvolaný 0,1 μM PQ nezpůsobuje změny ve schopnosti přežít v přítomnosti ani jednoho použitého antibiotika (Obr. 8). Možným vysvětlením by mohla být nízká koncentrace PQ, která nevyvolala oxidativní stres, ale podle literatury dochází ke změně expresního profilu u *S. aureus* již po působení 10 nM PQ (Wolf et al., 2008), nebo naopak moc vysoká koncentrace PQ, díky níž došlo následkem oxidativního stresu k úbytku bakterií a tak se případná zvýšená schopnost přežívání antibiotika na počtu přeživších bakterií nemohla projevit. Tým Y. Wu navodil oxidativní stres u *E. coli* 0,8 mM PQ. Pro kontrolu jsme v jednom pokusu navodili oxidativní stres také 0,8 mM PQ a poté změřili křivku hynutí s ciprofloxacinem, i tak nedošlo ke změně v počtu bakterií (nepublikovaná data). Naopak hynutí populace způsobené vysokou koncentrací PQ jsme vyloučili změřením růstové křivky kultury v BHI médiu s 0,1 μM PQ (kap. 4.1). Zdá se tedy, že oxidativní stres u *S. aureus* na rozdíl od *E. coli* neovlivňuje citlivost k fluorochinolonom.

Dalším cílem mé diplomové práce bylo metodou qPCR určit expresi alternativního sigma faktoru *sigB* v různých podmínkách shodných s podmínkami měření křivek hynutí v předchozích experimentech (kap. 3.2.5). Stanovili jsme míru exprese přímo genu *sigB* a dále také míru exprese genu *asp23*, který je pod kontrolou SigB (Donegan and Cheung, 2009; Gertz et al., 1999; Giachino et al., 2001). Jelikož je transkript *sigB* detekovatelný již během 2 – 12 min od vystavení stresu (Pané-Farré et al., 2006), celkovou RNA jsme izolovali z buněk, které byly vystaveny stresovým podmínkám po dobu 10 min a 30 min. Stresové podmínky byly navozeny působením antibiotik gentamicinu 10x a 100x MIC, ciprofloxacinu 100x MIC, co-

trimoxazolu 100x MIC a dále pak navozením oxidativního stresu vyvolaném 0,1 μ M PQ a osmotického stresu vyvolaném kultivací v BHI s 10% NaCl. Vzhledem k charakteru experimentů a to porovnání exprese za nestresových a stresových podmínek, jsme výsledky z qPCR vyhodnotili metodou $\Delta\Delta C_T$ srovnáním hodnot pro nestresované a stresované kultury.

Relativní hladina *sigB* mRNA byla v čase odběru 10 min nejvyšší v případě kultivace s ciprofloxacinem, nejnižší při kultivaci s co-trimoxazolem. V čase odběru 30 min byla relativní hladina mRNA *sigB* nejvyšší při kultivaci s gentamicinem 100x MIC a nejnižší v podmínkách kultivace s co-trimoxazolem (Obr. 13).

Stanovení míry exprese *asp23* bylo provedeno jen v duplikátu, proto jsme do grafu zanesli výsledky z obou měření a ne jejich průměr (Obr. 14). V porovnání s kontrolním vzorkem, který nebyl vystaven žádnému stresu, byla exprese *asp23* zvýšena v případě 1. biologického replikátu u vzorků co-trimoxazol 10 min a ciprofloxacin 30 min, v případě 2. biologického replikátu u vzorků gentamicin 10x MIC 10 min a gentamicin 10x MIC 30 min. Relativní exprese *asp23* v ostatních vzorcích byla nižší nebo přibližně na stejné úrovni jako v kontrolním vzorku. Měření hladiny exprese genu *asp23*, jehož produkt je protein alkalického šoku, se běžně používá ke stanovení aktivity SigB, jelikož transkripce tohoto genu je pod přímou kontrolou faktoru SigB (Donegan and Cheung, 2009; Gertz et al., 1999; Giachino et al., 2001). V tomto experimentu ale nebylo možné aktivitu SigB prostřednictvím exprese *asp23* určit.

Porovnali jsme expresní profil genu *sigB* a průběh křivky hynutí pro stejné podmínky. Relativní exprese genu *sigB* v podmínkách 30 min od přidání antibiotik koreluje s průběhem křivek hynutí se stejným antibiotikem, tak, že v případě největšího úbytku v populaci bakterií (gentamicin 100x MIC) je relativní exprese *sigB* nejvyšší. Naopak v případě nejnižšího úbytku v populaci bakterií (co-trimoxazol 100x MIC) je relativní exprese *sigB* nejnižší. Míra úbytku bakterií v populaci a míra exprese *sigB* v podmínkách s ciprofloxacin 100x MIC leží mezi těmito hraničními hodnotami. Lze tedy tvrdit, že působení antibiotik gentamicinu a ciprofloxacinu v těchto podmínkách indukuje expresi *sigB* a spouští tak stresovou odpověď. Nepotvrzuje to ale hypotézu, že by exprese SigB měla protektivní charakter.

Ze stanovení křivek hynutí po osmotickém stresu je jasně patrné, že osmotický stres způsobuje zvýšení tvorby perzisterů o 1 – 2,5 řádu v porovnání s nestresovanou kulturou. Při porovnání expresního profilu *sigB* v různých podmínkách se zdá, že stresová odpověď na působení antibiotiky je oproti odpovědi na osmotický stres opožděná, což může být vysvětleno rozdílnou regulací odpovědi na tyto odlišné stimuly. Je možné, že v případě osmotického stresu

dosáhla hladina transkriptu *sigB* vrcholu kolem 10. minuty, proto ve 30. minutě již došlo k jejímu poklesu. Naše výsledky naznačují, že aktivita *sigB* za podmínek osmotického stresu se může podílet na zvýšené toleranci k antibiotikům, stále je to ale pouze hypotéza, kterou je potřeba dále testovat.

V případě křivek hynutí za podmínek oxidativního stresu nebyl oproti křivce hynutí nestresované kultury žádný rozdíl v počtu perzisterů. I když u *E. coli* je perzistence navozena vystavením oxidativnímu stresu ((Wu et al., 2012a), nebyla publikována žádná studie, která by dokazovala, že oxidativní stres aktivuje transkripci *sigB*. Stejně tak v naší studii jsme zaznamenali jen mírný nárůst *sigB* transkriptu. Je tedy velmi pravděpodobné, že neexistuje vztah mezi aktivací *sigB* oxidativním stresem a formováním perzisterů.

Posledním cílem diplomové práce bylo metodou průtokové cytometrie charakterizovat fyziologický stav buněk v populaci. Pro tyto účely jsme použili komerční sadu LIVE/DEAD vitality kit, která obsahovala dvě fluorescenční značky, zelený SYTOX Green, který značí mrtvé buňky a bezbarvý C₁₂-resazurin, který je metabolicky aktivními buňkami redukován na červený C₁₂-resorufin. Tato komerční sada fluorescenčních značek je určena pro analýzu eukaryotních buněk, dobře se ale osvědčila i u bakterií (Cronin and Wilkinson, 2008a, 2008b). Výhodou této sady je, že lze rozlišit živé buňky, které jsou ale metabolicky neaktivní, jež pravděpodobně představují buňky v dormantním stavu.

Z výsledků našeho měření ale bohužel nebylo možné tuto dormantní populaci kvantifikovat, jelikož rozdíl fluorescence mezi těmito dvěma populacemi v tomto nastavení experimentu byl velmi malý (obr. 16.1, obr. 16.2). Dormantní populace představovala jen desetiny procent buněk z celkové populace a byla obtížně odlišitelná od celkové resorufin+ populace a pozadí. Aby tato populace mohla být lépe analyzovatelná, bylo by nejspíš potřeba zvýšit napětí na oranžovém fotonásobiči. Napětí na fotonásobičích bylo nastaveno technikem firmy, která zajišťovala zapůjčení demo verze Apogee A50-Micro na naší fakultě. Jednalo se při tom o první možnost na naší fakultě změřit na průtokovém cytometru bakterie, stejně tak pro naši laboratoř to byla první zkušenost s touto metodou. Proto také nejsou výsledky z této metody optimální.

Výsledek z tohoto experimentu tedy nebylo rozlišení bakteriální populace na buňky ve třech fyziologických stavech. Detekovali jsme jen buňky buď živé, nebo mrtvé. Jelikož populace živých metabolicky neaktivních buněk byla špatně odlišitelná od živých metabolicky aktivních, analyzovali jsme tyto dvě subpopulace jako jednu populaci živých buněk (Obr. 17).

Takto jsme analyzovali přežívání referenčního kmene *S. aureus* působení antibiotik gentamicinu o koncentraci 10x a 100x MIC a ciprofloxacinu 100x MIC. Dále jsme analyzovali přežívání klinických izolátů *S. aureus* působení ciprofloxacinu 100x MIC.

Porovnali jsme výsledky z tohoto experimenty s výsledky z experimentu křivek hynutí. V obou experimentech došlo k největšímu úbytu živých buněk v kultuře referenčního kmene v podmínkách s ciprofloxacinem 100x MIC a gentamicinem 100x MIC, naopak k nejmenšímu poklesu došlo v podmínkách s gentamicinem 10x MIC.

Z klinických izolátů dle výsledků z průtokové cytometrie nejhůře přežíval kmen 286, který naopak dle výsledků z měření křivek hynutí přežíval nejlépe. Křivky hynutí s klinickými izoláty byly provedeny ale pouze v jednom biologickém replikátu, tudíž z těchto výsledků nelze vyvozovat závěry.

Ve výsledcích z těchto dvou přístupů měření přežívání populace testovaných kmenů s antibiotiky souhlasil pokles přeživších bakterií při měření křivek hynutí s poměrem živých a mrtvých buněk v populaci naměřených průtokovou cytometrií s výjimkou kmene 286. Při tomto přístupu jsme pozorovali, že se vitalita populace buněk v průběhu působení antibiotik postupně snižovala. Metodou průtokové cytometrie bylo zjištěno, že poměr živých a mrtvých buněk je v čase T5 zhruba 80 % živých vs. 20 % mrtvých.

Přestože jsme experiment nedovedli do konkrétních závěrů, dá se shrnout, že tato metoda může po optimalizaci velmi dobře sloužit k rychlé charakterizaci fyziologického stavu bakteriální populace po působení antibiotik a dalších stresových faktorů, a tím charakterizovat složení perzistentní populace přeživších bakterií.

6 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo zavedení metody pro efektivní sledování vzniku perzisterů, sledovat toleranci bakteriální populace k působení různých antibiotik v krátkodobém časovém horizontu, zjistit, zda existuje spojitost mezi stresem, expresí *sigB* a vznikem perzistence a metodou průtokové cytometrie charakterizovat fyziologický stav buněk v populaci po působení antibiotik. V diplomové práci jsme dosáhli těchto výsledků:

1. Zavedli jsme metodu křivek hynutí, která slouží k efektivnímu sledování vzniku perzisterů.
2. Metodou křivek hynutí jsme charakterizovali přežívání populace *S. aureus* působení antibiotik gentamicinu, ciprofloxacinu a co-trimoxazolu.
3. Metodou křivek hynutí jsme zjistili, že osmotický stres zvyšuje počet perzisterů v bakteriální populaci, naopak po navození oxidativního stresu se je počet perzisterů stejný jako v nestresované kultuře.
4. Metodou kvantitativní PCR jsme určili expresní profil *sigB* u *S. aureus* v různých podmínkách. Zjistili jsme, že antibiotika působení antibiotik zvyšuje transkripci *sigB*.
5. Porovnali jsme průběh křivek hynutí a expresní profil *sigB* a zjistili, že za podmínek největšího hynutí bakteriální populace je relativní hladina transkriptu *sigB* nejvyšší. Dále tyto výsledky naznačují možnou spojitost mezi expresí *sigB* a zvětšením frakce perzisterů po osmotickém stresu, toto tvrzení je ale stále pouze hypotéza.
6. Metodou průtokové cytometrie jsme určili poměr živých a mrtvých buněk po působení různých antibiotik, nepovedlo se nám kvantifikovat dormantní populaci bakterií, jelikož představovala pouze malou frakci obtížně odlišitelnou od populace živých metabolizujících buněk a pozadí, tuto metodu je třeba dále optimalizovat.

7 SEZNAM LITERATURY

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C., and Tarkowski, A. (1993). The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect. Immun.* *61*, 3879–3885.
- Abele-Horn, M., Schupfner, B., Emmerling, P., Waldner, H., and Göring, H. (2000). Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection* *28*, 53–54.
- Abraham, E.P., and Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Nature* *146*, 837-837
- Adams, K.N., Takaki, K., Connolly, L.E., Wiedenhof, H., Winglee, K., Humbert, O., Edelstein, P.H., Cosma, C.L., and Ramakrishnan, L. (2011). Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism. *Cell* *145*, 39–53.
- Agarwal, H., Verrall, R., Singh, S.P., Tang, Y.-W., and Wilson, G. (2007). Small colony variant *Staphylococcus aureus* multiorgan infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *26*, 269–271.
- Anderson, D.G., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Reconstitution of an SOS Response Pathway: Derepression of Transcription in Response to DNA Breaks. *Cell* *95*, 975–979.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* *2*, 2006.0008.
- Balaban, N. (2011). Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 768–775.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* *305*, 1622–1625.
- Balaban, N.Q., Gerdes, K., Lewis, K., and McKinney, J.D. (2013). A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 587–591.
- Baumert, N., von Eiff, C., Schaaff, F., Peters, G., Proctor, R.A., and Sahl, H.-G. (2002). Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* *N 8*, 253–260.
- Bayer, M.G., Heinrichs, J.H., and Cheung, A.L. (1996). The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *178*, 4563–4570.

- Beenken, K.E., Blevins, J.S., and Smeltzer, M.S. (2003). Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect. Immun.* *71*, 4206–4211.
- Bentrup, K.H. zu, and Russell, D.G. (2001). Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.* *9*, 597–605.
- Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., and Duncan, K. (2002). Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* *43*, 717–731.
- Bigger, J. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *The Lancet* *244*, 497–500.
- Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bächi, B., and Projan, S. (2004). Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* σ B Regulon. *J. Bacteriol.* *186*, 4085–4099.
- Black, D.S., Kelly, A.J., Mardis, M.J., and Moyed, H.S. (1991). Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol.* *173*, 5732–5739.
- Blevins, J.S., Gillaspy, A.F., Rehtin, T.M., Hurlburt, B.K., and Smeltzer, M.S. (1999). The *Staphylococcal* accessory regulator (*sar*) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene (*cna*) in an *agr*-independent manner. *Mol. Microbiol.* *33*, 317–326.
- Brooun, A., Liu, S., and Lewis, K. (2000). A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 640–646.
- Cashel, M., and Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* *221*, 838–841.
- Chen, L., and Wen, Y. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int. J. Oral Sci.* *3*, 66–73.
- Chen, H.-Y., Chen, C.-C., Fang, C.-S., Hsieh, Y.-T., Lin, M.-H., and Shu, J.-C. (2011). Vancomycin activates σ (B) in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* resulting in the enhancement of cytotoxicity. *PLoS One* *6*, e24472.
- Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projan, S.J., and Fischetti, V.A. (1992). Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6462–6466.

- Cirz, R.T., Jones, M.B., Gingles, N.A., Minogue, T.D., Jarrahi, B., Peterson, S.N., and Romesberg, F.E. (2007). Complete and SOS-Mediated Response of *Staphylococcus aureus* to the Antibiotic Ciprofloxacin. *J. Bacteriol.* *189*, 531–539.
- Cronin, U.P., and Wilkinson, M.G. (2008a). Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and physiology of *Bacillus cereus* vegetative cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *35*, 1695–1703.
- Cronin, U.P., and Wilkinson, M.G. (2008b). Physiological response of *Bacillus cereus* vegetative cells to simulated food processing treatments. *J. Food Prot.* *71*, 2168–2176.
- Davis, S.C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W.H., and Mertz, P.M. (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen.* *16*, 23–29.
- Deora, R., Tseng, T., and Misra, T.K. (1997). Alternative transcription factor sigmaSB of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus sar. *J. Bacteriol.* *179*, 6355–6359.
- Donegan, N.P., and Cheung, A.L. (2009). Regulation of the mazEF toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on sigB expression. *J. Bacteriol.* *191*, 2795–2805.
- Dörr, T., Lewis, K., and Vulić, M. (2009). SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* *5*.
- Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* *8*.
- von Eiff, C., Bettin, D., Proctor, R.A., Rolauffs, B., Lindner, N., Winkelmann, W., and Peters, G. (1997). Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *25*, 1250–1251.
- Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., and Swain, P.S. (2002). Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science* *297*, 1183–1186.
- Eng, R.H., Padberg, F.T., Smith, S.M., Tan, E.N., and Cherubin, C.E. (1991). Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* *35*, 1824–1828.
- Fasani, R.A., and Savageau, M.A. (2013). Molecular mechanisms of multiple toxin–antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E2528–E2537.

- Fodor, A.A., Klem, E.R., Gilpin, D.F., Elborn, J.S., Boucher, R.C., Tunney, M.M., and Wolfgang, M.C. (2012). The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations. *PLoS ONE* 7, e45001.
- Fournier, B., and Hooper, D.C. (1998). Mutations in Topoisomerase IV and DNA Gyrase of *Staphylococcus aureus*: Novel Pleiotropic Effects on Quinolone and Coumarin Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 121–128.
- Fu, Z., Tamber, S., Memmi, G., Donegan, N.P., and Cheung, A.L. (2009). Overexpression of MazFSa in *Staphylococcus aureus* Induces Bacteriostasis by Selectively Targeting mRNAs for Cleavage. *J. Bacteriol.* 191, 2051–2059.
- Fung, D.K.C., Chan, E.W.C., Chin, M.L., and Chan, R.C.Y. (2010). Delineation of a Bacterial Starvation Stress Response Network Which Can Mediate Antibiotic Tolerance Development. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1082–1093.
- Gao, W., Chua, K., Davies, J.K., Newton, H.J., Seemann, T., Harrison, P.F., Holmes, N.E., Rhee, H.-W., Hong, J.-I., Hartland, E.L., et al. (2010). Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. *PLoS Pathog.* 6.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013). Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA. *Mol. Cell* 52, 248–254.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ohlsen, K., Hacker, J., and Hecker, M. (1999). Regulation of sigmaB-dependent transcription of sigB and asp23 in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol. Gen. Genet.* MGG 261, 558–566.
- Giachino, P., Engelmann, S., and Bischoff, M. (2001). ζ B Activity Depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 1843–1852.
- Goerke, C., and Wolz, C. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 300, 520–525.
- Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1997). Human β -Defensin-1 Is a Salt-Sensitive Antibiotic in Lung That Is Inactivated in Cystic Fibrosis. *Cell* 88, 553–560.
- Gomez, J.E., and McKinney, J.D. (2004). *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* 84, 29–44.

- Hammes, W.P. (1976). Biosynthesis of Peptidoglycan in *Gaffkya homari*, The Mode of Action of Penicillin G and Mecillinam. *Eur. J. Biochem.* *70*, 107–113.
- Hansen, S., Lewis, K., and Vulić, M. (2008). Role of Global Regulators and Nucleotide Metabolism in Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 2718–2726.
- Harraghy, N., Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P., and Herrmann, M. (2005). *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 1789–1800.
- Harrison-Balestra, C., Cazzaniga, A.L., Davis, S.C., and Mertz, P.M. (2003). A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. AI* *29*, 631–635.
- Haseltine, W.A., and Block, R. (1973). Synthesis of Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Requires the Presence of a Codon-Specific, Uncharged Transfer Ribonucleic Acid in the Acceptor Site of Ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *70*, 1564–1568.
- Häußler, S., Tümmler, B., Weißbrodt, H., Rohde, M., and Steinmetz, I. (1999). Small-Colony Variants of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* *29*, 621–625.
- Hawser, S., Lociuoro, S., and Islam, K. (2006). Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. *Biochem. Pharmacol.* *71*, 941–948.
- Hecker, M., Pané-Farré, J., and Uwe, V. (2007). SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Related Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 215–236.
- Henderson, A.G., Ehre, C., Button, B., Abdullah, L.H., Cai, L.-H., Leigh, M.W., DeMaria, G.C., Matsui, H., Donaldson, S.H., Davis, C.W., et al. (2014a). Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J. Clin. Invest.* *124*, 3047–3060.
- Henderson, A.G., Ehre, C., Button, B., Abdullah, L.H., Cai, L.-H., Leigh, M.W., DeMaria, G.C., Matsui, H., Donaldson, S.H., Davis, C.W., et al. (2014b). Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J. Clin. Invest.* *124*, 3047–3060.
- Hull, J., Vervaart, P., Grimwood, K., and Phelan, P. (1997). Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* *52*, 557–560.
- Johnson, P.J.T., and Levin, B.R. (2013). Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* *9*, e1003123.

- Kahl, B., Herrmann, M., Everding, A.S., Koch, H.G., Becker, K., Harms, E., Proctor, R.A., and Peters, G. (1998). Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* *177*, 1023–1029.
- Kahl, B.C., Belling, G., Becker, P., Chatterjee, I., Wardecki, K., Hilgert, K., Cheung, A.L., Peters, G., and Herrmann, M. (2005). Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Associated with Extensive Alterations in Regulator and Virulence Gene Expression Profiles. *Infect. Immun.* *73*, 4119–4126.
- Kayama, S., Murakami, K., Ono, T., Ushimaru, M., Yamamoto, A., Hirota, K., and Miyake, Y. (2009). The role of *rpoS* gene and quorum-sensing system in ofloxacin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* *298*, 184–192.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., and Lewis, K. (2004a). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* *230*, 13–18.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., and Lewis, K. (2004b). Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *186*, 8172–8180.
- Keren, I., Minami, S., Rubin, E., and Lewis, K. (2011). Characterization and Transcriptome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Persisters. *mBio* *2*, e00100–e00111.
- Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., Mulcahy, L.R., and Lewis, K. (2013). Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species. *Science* *339*, 1213–1216.
- Kint, C.I., Verstraeten, N., Fauvart, M., and Michiels, J. (2012). New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* *20*, 577–585.
- Klapper, I., Gilbert, P., Ayati, B.P., Dockery, J., and Stewart, P.S. (2007). Senescence can explain microbial persistence. *Microbiology* *153*, 3623–3630.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., and Collins, J.J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* *130*, 797–810.
- Korch, S.B., Henderson, T.A., and Hill, T.M. (2003). Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol. Microbiol.* *50*, 1199–1213.
- Kulkarni, R., Antala, S., Wang, A., Amaral, F.E., Rampersaud, R., LaRussa, S.J., Planet, P.J., and Ratner, A.J. (2012). Cigarette Smoke Increases *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation via Oxidative Stress. *Infect. Immun.* *80*, 3804–3811.

- Kullik, I., and Giachino, P. (1997). The alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. *Arch. Microbiol.* *167*, 151–159.
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q., and Leibler, S. (2005). Bacterial Persistence. *Genetics* *169*, 1807–1814.
- Kwan, B.W., Valenta, J.A., Benedik, M.J., and Wood, T.K. (2013). Arrested Protein Synthesis Increases Persister-Like Cell Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 1468–1473.
- LaFleur, M.D., Kumamoto, C.A., and Lewis, K. (2006). *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3839–3846.
- LaFleur, M.D., Qi, Q., and Lewis, K. (2010). Patients with Long-Term Oral Carriage Harbor High-Persister Mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 39–44.
- Lam, J., Chan, R., Lam, K., and Costerton, J.W. (1980). Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* *28*, 546–556.
- Lannergård, J., Eiff, C. von, Sander, G., Cordes, T., Seggewiß, J., Peters, G., Proctor, R.A., Becker, K., and Hughes, D. (2008). Identification of the Genetic Basis for Clinical Menadione-Auxotrophic Small-Colony Variant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 4017–4022.
- Lechner, S., Lewis, K., and Bertram, R. (2012a). *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *22*, 235–244.
- Lechner, S., Patra, P., Klumpp, S., and Bertram, R. (2012b). Interplay between population dynamics and drug tolerance of *Staphylococcus aureus* persister cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *22*, 381–391.
- Lechner, S., Lewis, K., and Bertram, R. (2012c). *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *22*, 235–244.
- Leung, V., and Lévesque, C.M. (2012). A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance. *J. Bacteriol.* *194*, 2265–2274.
- Levin, B.R., and Rozen, D.E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 556–562.
- Lewis, K. (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 999–1007.
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 48–56.

- Lewis, K. (2010a). Persister Cells and the Paradox of Chronic Infections: Dormant persister cells are tolerant to antibiotics and are largely responsible for recalcitrance of chronic infections. *Microbe Mag.* 5, 429–437.
- Lewis, K. (2010b). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T., and Lee, C.Y. (2004). Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 722–729.
- Liu, Y., and Imlay, J.A. (2013). Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* 339, 1210–1213.
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532.
- Luidalepp, H., Jöers, A., Kaldalu, N., and Tenson, T. (2011). Age of Inoculum Strongly Influences Persister Frequency and Can Mask Effects of Mutations Implicated in Altered Persistence. *J. Bacteriol.* 193, 3598–3605.
- Luzzatto, L., Apirion, D., and Schlessinger, D. (1968). Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 60, 873–880.
- Maamar, H., and Dubnau, D. (2005). Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol. Microbiol.* 56.
- Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2014). Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell* 157, 539–548.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jørgensen, M.G., and Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13206–13211.
- Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W., and Boucher, R.C. (1998). Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease. *Cell* 95, 1005–1015.
- McCune, R.M., and Tompsett, R. (1956). Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. *J. Exp. Med.* 104, 737–762.
- Mc Dermott, W. (1958). Microbial Persistence. *Yale J. Biol. Med.* 30, 257–291.
- McDermott, W. (1959). Inapparent infection. *Public Health Rep.* 74, 485–500.
- Van Melderen, L. (2001). Molecular interactions of the CcdB poison with its bacterial target, the DNA gyrase. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 537–544.

- Melter, O., and Radojevič, B. (2010). Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. *Folia Microbiol. (Praha)* 55, 548–558.
- Metzger, S., Sarubbi, E., Glaser, G., and Cashel, M. (1989). Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated. *J. Biol. Chem.* 264, 9122–9125.
- Mitchell, G., Lamontagne, C.-A., Brouillette, E., Grondin, G., Talbot, B.G., Grandbois, M., and Malouin, F. (2008). *Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* 70, 1540–1555.
- Mitchell, G., Brouillette, E., Séguin, D.L., Asselin, A.-E., Jacob, C.L., and Malouin, F. (2010). A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb. Pathog.* 48, 18–27.
- Mitchell, G., Fugère, A., Pépin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E.H., Cantin, A.M., and Malouin, F. (2013). SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *PLoS One* 8, e65018.
- Miyazaki, E., Chen, J.-M., Ko, C., and Bishai, W.R. (1999). The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (orf159) Gene Encodes an Anti-Sigma Factor of SigB. *J. Bacteriol.* 181, 2846–2851.
- Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, C.L., Langlois-Bégin, P., Michaud, S., and Malouin, F. (2006). Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* 188, 64–76.
- Möker, N., Dean, C.R., and Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules. *J. Bacteriol.* 192, 1946–1955.
- Moyed, H.S., and Bertrand, K.P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* 155, 768–775.
- Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S., and Lewis, K. (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Bacteriol.* 192, 6191–6199.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., et al. (2011). Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria. *Science* 334, 982–986.

- Orman, M.A., and Brynildsen, M.P. (2013). Dormancy Is Not Necessary or Sufficient for Bacterial Persistence. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 3230–3239.
- Ozbudak, E.M., Thattai, M., Lim, H.N., Shraiman, B.I., and van Oudenaarden, A. (2004). Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. *Nature* *427*, 737–740.
- Palma, M., and Cheung, A.L. (2001). ζ B Activity in *Staphylococcus aureus* Is Controlled by RsbU and an Additional Factor(s) during Bacterial Growth. *Infect. Immun.* *69*, 7858–7865.
- Palma, M., Bayer, A., Kupferwasser, L.I., Joska, T., Yeaman, M.R., and Cheung, A. (2006). Salicylic acid activates sigma factor B by rsbU-dependent and -independent mechanisms. *J. Bacteriol.* *188*, 5896–5903.
- Pandey, D.P., and Gerdes, K. (2005). Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* *33*, 966–976.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., and Hecker, M. (2006). The sigmaB regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *296*, 237–258.
- Peterson, E., Fairshter, R., Morrison, J., and Cesario, T. (1981). Effects of the herbicide paraquat dichloride on bacteria of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* *41*, 327–328.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45–e45.
- Proctor, R.A., Balwit, J.M., and Vesga, O. (1994). Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect. Agents Dis.* *3*, 302–312.
- Proctor, R.A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J.N., and Arbeit, R.D. (1995). Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *20*, 95–102.
- Quinton, P.M. (2008). Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *The Lancet* *372*, 415–417.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., and Ziebuhr, W. (2000). Alternative Transcription Factor ζ B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate. *J. Bacteriol.* *182*, 6824–6826.
- Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* *5A*, 355–367.
- Ramage, G., Martínez, J.P., and López-Ribot, J.L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* *6*, 979–986.

- Razvi, S., Quittell, L., Sewall, A., Quinton, H., Marshall, B., and Saiman, L. (2009). Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the united states, 1995 to 2005. *Chest* 136, 1554–1560.
- Reisin, I.L., Prat, A.G., Abraham, E.H., Amara, J.F., Gregory, R.J., Ausiello, D.A., and Cantiello, H.F. (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J. Biol. Chem.* 269, 20584–20591.
- Roggenkamp, A., Sing, A., Hornef, M., Brunner, U., Autenrieth, I.B., and Heesemann, J. (1998). Chronic Prosthetic Hip Infection Caused by a Small-Colony Variant of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2530–2534.
- Rotem, E., Loinger, A., Ronin, I., Levin-Reisman, I., Gabay, C., Shores, N., Biham, O., and Balaban, N.Q. (2010). Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 12541–12546.
- Schaaff, F., Bierbaum, G., Baumert, N., Bartmann, P., and Sahl, H.-G. (2003). Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 427–435.
- van Schaik, W., and Abee, T. (2005). The role of σ B in the stress response of Gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 218–224.
- Schuster, C.F., Mechler, L., Nolle, N., Krismer, B., Zelder, M.-E., Götz, F., and Bertram, R. (2015). The MazEF Toxin-Antitoxin System Alters the β -Lactam Susceptibility of *Staphylococcus aureus*. *PloS One* 10, e0126118.
- Schwiebert, E.M., Egan, M.E., Hwang, T.-H., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Cutting, G.R., and Guggino, W.B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81, 1063–1073.
- Senn, M.M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., Flückiger, U., Berger-Bächi, B., and Bischoff, M. (2005). Molecular Analysis and Organization of the σ B Operon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 8006–8019.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., and Lewis, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 6, 53.
- Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., and Nudler, E. (2011). H2S: A Universal Defense Against Antibiotics in Bacteria. *Science* 334, 986–990.

- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J., and Greenberg, E.P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* *407*, 762–764.
- Smirnova, N., Scott, J., Voelker, U., and Haldenwang, W.G. (1998). Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* sigB Operon Mutations That Suppress the Loss of the Negative Regulator RsbX. *J. Bacteriol.* *180*, 3671–3680.
- Soler-García, Á.A., and Jerse, A.E. (2004). A *Neisseria gonorrhoeae* catalase mutant is more sensitive to hydrogen peroxide and paraquat, an inducer of toxic oxygen radicals. *Microb. Pathog.* *37*, 55–63.
- Stewart, G.R., Robertson, B.D., and Young, D.B. (2003). Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* *1*, 97–105.
- Sufya, N., Allison, D. g., and Gilbert, P. (2003). Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J. Appl. Microbiol.* *95*, 1261–1267.
- Tuchscherr, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., Eiff, C. von, Peters, G., Becker, K., and Löffler, B. (2010). *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Adapted Phenotypes for Intracellular Persistence. *J. Infect. Dis.* *202*, 1031–1040.
- Tuchscherr, L., Medina, E., Hussain, M., Völker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R.A., Becker, K., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* *3*, 129–141.
- Tuchscherr, 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., et al. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog* *11*, e1004870.
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., and Tomasz, A. (1986). The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J. Gen. Microbiol.* *132*, 1297–1304.
- Unoson, C., and Wagner, E.G.H. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *70*, 258–270.
- Valenza, G., Tappe, D., Turnwald, D., Frosch, M., König, C., Hebestreit, H., and Abele-Horn, M. (2008). Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* *7*, 123–127.

- Veening, J.-W., Hamoen, L.W., and Kuipers, O.P. (2005). Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *56*, 1481–1494.
- Vega, N.M., Allison, K.R., Khalil, A.S., and Collins, J.J. (2012). Signaling-Mediated Bacterial Persister Formation. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 431–433.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E.G.H., and Altuvia, S. (2004). The Small RNA IstR Inhibits Synthesis of an SOS-Induced Toxic Peptide. *Curr. Biol.* *14*, 2271–2276.
- Vuong, C., Saenz, H.L., Götz, F., and Otto, M. (2000). Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* *182*, 1688–1693.
- Wang, X., and Zhao, X. (2009). Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 1395–1402.
- Ward, K.H., Olson, M.E., Lam, K., and Costerton, J.W. (1992). Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J. Med. Microbiol.* *36*, 406–413.
- Wayne, L.G., and Sohaskey, C.D. (2001). Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* *55*, 139–163.
- Wellinghausen, N., Chatterjee, I., Berger, A., Niederfuehr, A., Proctor, R.A., and Kahl, B.C. (2009). Characterization of Clinical *Enterococcus faecalis* Small-Colony Variants. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 2802–2811.
- Wiuuff, C., Zappala, R.M., Regoes, R.R., Garner, K.N., Baquero, F., and Levin, B.R. (2005). Phenotypic Tolerance: Antibiotic Enrichment of Noninherited Resistance in Bacterial Populations. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 1483–1494.
- Wolf, C., Hochgräfe, F., Kusch, H., Albrecht, D., Hecker, M., and Engelmann, S. (2008). Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: Diverse responses to different oxidants. *PROTEOMICS* *8*, 3139–3153.
- Wood, T.K., Knabel, S.J., and Kwan, B.W. (2013). Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.02636–13.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., et al. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* *109*, 317–325.
- Wu, S., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (1996). Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J. Bacteriol.* *178*, 6036–6042.

Wu, Y., Vulić, M., Keren, I., and Lewis, K. (2012a). Role of Oxidative Stress in Persister Tolerance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4922–4926.

Wu, Y., Vulić, M., Keren, I., and Lewis, K. (2012b). Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4922–4926.