

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

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: MIKROBIOLOGIE

Studijní obor: N-MIKR



Bc. Nikola Hloucalová

Vliv adaptačních mutací na vznik perzisterů u *Staphylococcus aureus*

Effect of adaptive mutations on persister formation in *Staphylococcus aureus*

Typ závěrečné práce:
Diplomová práce

Vedoucí práce:
RNDr. Irena Lichá, CSc.

Konzultant:
RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D.

Praha, 2022

Univerzita Karlova

Čestné prohlášení

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

V Praze, 9.8.2022

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla upřímně poděkovat vedoucí diplomové práce RNDr. Ireně Liché, CSc. za její ochotu, odborné rady a především čas, který mi věnovala i přes mimořádně obtížné podmínky. Velice si vážím vstřícného vedení a trpělivosti, jakožto i možnosti častých osobních konzultací.

Současně bych ráda poděkovala konzultantovi RNDr. Alešovi Ulrychovi, Ph.D. za jeho přínos pro výzkumnou část této diplomové práce a za možnost využít k výzkumu laboratoř buněčné signalizace v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i.

Dále děkuji laborantce Lucii Jánské za vynikající technickou asistenci a přípravu materiálů pro prováděné experimenty.

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2020-2022 za finanční podpory grantu Ministerstva zdravotnictví AZV 17-30460A/2017.

ABSTRAKT

Perzistence představuje přechodný stav, ve kterém jsou bakteriální buňky schopny přežít antibiotickou léčbu. Nastává stochasticky u malé části populace a umožňuje přeživším buňkám opakovaně vyvolat infekci. Velikost subpopulace perzisterů může být ovlivněna adaptačními mutacemi vzniklými v době chronické infekce v genech souvisejících s regulací přechodu mezi virulentní formou a tvorbou biofilmu. Pro regulaci vstupu a výstupu z perzistence má významnou roli též mezibuněčná komunikace a molekuly produkované buňkami do prostředí. Předpokládá se, že perzistence u *S aureus* je ovlivňována především PSM moduliny a molekulami AIP, jež se účastní mechanismu Quorum sensing.

Hlavním cílem práce bylo objasnit, jak adaptační mutace vzniklé u klinických izolátů získaných od dvou pacientek s diagnostikovanou cystickou fibrózou ovlivňují schopnost perzistovat. Dále bylo cílem stanovit, jak se v souvislosti s perzistencí mění membránový potenciál a metabolická aktivita a určit, jaký vliv mají extracelulární molekuly produkované do kultivačního média na růstové parametry studovaných izolátů.

Metodou TD testu a určením míry perzistence stanovením CFU bylo zjištěno, že u izolátů pacientky 2 nedošlo v průběhu chronické infekce ke vzniku adaptačních mutací ovlivňujících perzistenci, zatímco u třech později odebraných chronologických izolátů pacientky 1 byla prokázána zvýšená schopnost perzistovat. Stav perzistence nastával u těchto izolátů hlubší s obtížnějším přechodem na aktivně rostoucí formu. Dále byl měřením buněčných populací na průtokovém cytometru potvrzen rozdílný účinek na ztrátu membránového a redox potenciálu u antibiotik s odlišným mechanismem působení a byla měřena velikost populace exprimující gen *sigB*. Podařilo se optimalizovat metodu kontinuálního měření optické denzity, která umožnila prokázat vliv extracelulárních molekul obsažených ve sterilním supernatantu na rychlost růstu, hynutí po působení antibiotik a na vyrůstání z perzistence po odeznění účinku antibiotik. V závislosti na zjištěných datech byly diskutovány hypotézy vlivu vzniklých adaptačních mutací.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, Perzistence, Adaptační mutace, Agr systém, PSM, AIP

ABSTRACT

Persistence represents a transient state during which are bacterial cells able to survive antibiotic treatment. Only a small subpopulation of cells enter this state, these cells are then capable of causing disease recurrence. The size of a persister subpopulation is influenced by adaptive mutations formed during a chronic disease in genes related to transition of cells between a virulent form and biofilm formation. Regulation of entering and exiting persistence is also influenced by intercellular communication and by molecules produced into the cell surroundings. It is assumed that this effect is caused by PSM modulines and AIP molecules which take part in Quorum sensing mechanism.

The main aim of this thesis was to clarify how adaptive mutations of clinical isolates obtained from two patients diagnosed with cystic fibrosis influence the ability to persist. Another aim was to determine changes in membrane potential and metabolic activity while entering persistence and to establish the effect of extracellular molecules produced into the culture medium on growth parameters of the studied isolates.

By using techniques of TD test and establishment of persistence rate by CFU determination, it was found that the isolates obtained from patient 2 did not acquire adaptive mutations affecting persistence whereas three last obtained chronological isolates from patient 1 showed increased ability to persist. These isolates formed deeper persisters with reduced transition into a growing form. By measuring cell populations using flow cytometer, differences within membrane and redox potential between antibiotics with diverse mechanisms of action were confirmed. A method of continuous measurement of optical density was successfully optimized due to which it was possible to demonstrate the effect of extracellular molecules produced into a sterile supernatant on growth rate, the slope of killing curve and on waking up from a state of persistence.

Key words: *Staphylococcus aureus*, adaptive mutations, Persistence, Agr system, PSM, AIP

OBSAH

ÚVOD	10
CÍLE PRÁCE	11
PŘEHLED LITERATURY	12
1 Charakteristika <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2 Patogenita <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1 Nozokomiální infekce.....	14
2.2 Akutní a chronický průběh onemocnění	14
3 Globální regulátory virulence u <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.1 Agr systém	16
3.1.1 Varianty AIP	18
3.1.2 Quorum sensing	20
3.2 Rodina proteinů SarA	21
4 Stresová odpověď u <i>Staphylococcus aureus</i>	22
4.1 Alternativní sigma faktor B	22
4.2 Stringentní odpověď u <i>S. aureus</i>	24
5 Faktory virulence	25
5.1 Leukocidiny a hemolyziny.....	25
5.2 PSM peptidy	26
6 Perzistence	28
6.1 Biofilm u <i>S. aureus</i>	30
6.2 SCV fenotyp	31
7 Membránový a redoxní potenciál	32
MATERIÁL A METODY	33
8 Materiál	33
8.1 Bakteriální kmeny.....	33
8.2 Plazmidy	36
8.3 Bakteriofágy	36
8.4 Antibiotika	37
8.4.1 Antibiotika přidávaná k rostoucí kultuře.....	37
8.4.2 Antibiotika pro selekci na pevných médiích	38
8.4.3 Antibiotické disky	39
8.4.4 Stanovení MIC	39
8.5 Kultivační média.....	39
8.5.1 BHI médium.....	39
8.5.2 Obohacené BHI médium.....	39
8.5.3 TSB médium	40
8.5.4 Top Agar	40
8.5.5 SM médium.....	40
8.6 Roztoky a chemikálie.....	41
8.6.1 Konzervace kmenů.....	41
8.6.2 Průtoková cytometrie	41
8.6.3 TD test a křivky hynutí	42

8.6.4	Transdukce	42
8.6.5	Izolace plazmidu	42
8.6.6	Horizontální gelová elektroforéza	43
8.7	Enzymy	43
9	Metody.....	44
9.1	Sterilní práce	44
9.2	Konzervace kmenů	44
9.3	Příprava buněčné kultury.....	44
9.3.1	Příprava sterilního supernatantu z noční kultury	44
9.4	Stanovení MIC	45
9.5	TD Test.....	45
9.6	Křivky hynutí	46
9.6.1	Křivky hynutí získané stanovením CFU.....	46
9.7	Transdukce plazmidu pCNSigBtet.....	47
9.7.1	Příprava fágového lyzátu	47
9.7.2	Transdukce plazmidu.....	47
9.7.3	Izolace plazmidu ze <i>Staphylococcus aureus</i>	47
9.7.4	Analýza DNA pomocí horizontální gelové elektroforézy	48
9.8	Průtoková cytometrie	49
9.8.1	Měření membránového potenciálu	49
9.8.2	Měření metabolické aktivity pomocí průtokové cytometrie	50
9.9	Kontinuální měření optické denzity	51
9.9.1	Měření růstové křivky	51
9.9.2	Měření vyrůstání z perzistence	51
9.9.3	Měření hynutí během působení oxacilinu.....	52
VÝSLEDKY	53	
10.1	Stanovení MIC	53
10.2	TD test.....	54
10.3	Křivky hynutí	58
10.3.1	Míra perzistence	66
10.4	Průtoková cytometrie	67
10.4.1	Detekce buněk se sníženým membránovým potenciálem	67
10.4.2	Stanovení exprese <i>sigB</i> a měření metabolické aktivity.....	71
10.5	Kontinuální měření OD ₆₀₀	75
10.5.1	Růstové křivky.....	76
10.5.2	Rychlost hynutí.....	80
10.5.3	Vyrůstání z perzistence.....	83
DISKUZE.....	87	
SOUHRN.....	98	
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	99	

SEZNAM ZKRATEK

Agr	„Accessory gene regulator“, dvoukomponentový systém regulující virulenci
AIP	„Auto-Inducing-Peptide“, molekuly Agr systému účastníci se Quorum sensing
BHI	Bujón „Brain-Heart-Infusion“, živné médium
CFU	„Colony forming units“, jednotky tvořící kolonii
GFP	Zelený fluorescenční protein
HTH motiv	Helix-turn-helix, strukturní motiv proteinu schopný vázat se na DNA
CHIPS	Chemotaxis Inhibitory Protein of <i>Staphylococcus aureus</i> “, protein blokující receptory neutrofilů
MIC	Minimální inhibiční koncentrace, nejnižší koncentrace antibiotika potlačující růst bakterií
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , kmeny <i>S. aureus</i> rezistentní k protistafylokokovým penicilinům, u nichž je rezistence způsobena změnou aktivního místa transpeptidáz
NETs	Neutrofilní extracelulární pasti (Neutrophil Extracellular Traps)
OD	Optická denzita
PBP	„Penicillin-Binding Proteins“, enzymy zodpovědné za transpeptidaci při syntéze peptidoglykanu
PIA	Polysacharidový intracelulární adhezin
PSMs	„Phenol Soluble Modulin-like peptides“, peptidy způsobující lyzi neutrofilů
PVL	Panton-Valentinův Leukocidin
ROS	„Reactive Oxygen Species“, kyslíkové radikály poškozující DNA
RPM	„Revolutions per minute“, otáčky za minutu
RSH	RelA–SpoT homolog, syntáza (p)ppGpp
SCCmec	Stafylokoková chromozomová kazeta mec, mobilní genetický element
SCV	„Small Colony Variants“, varianty kmenů tvořící malé kolonie
TSB	„Tryptophan Soy Broth“, komplexní živné médium
TD test	Diskový test pro detekci perzistentních a tolerantních buněk
VISA	„Vancomycin-Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i> “, kmeny <i>S. aureus</i> se silnější vrstvou peptidoglykanu méně citlivé k vankomycinu
VRSA	„Vancomycin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> “, kmeny <i>S. aureus</i> rezistentní k vankomycinu, rezistence je způsobena změnou koncového dipeptidu při syntéze peptidoglykanu

ÚVOD

Staphylococcus aureus je častým oportunním patogenem způsobujícím různorodé typy onemocnění, od méně závažných kožních infekcí až po život ohrožující sepse. U více než jedné třetiny lidí kolonizuje kůži bez vyvolání onemocnění, avšak může způsobovat sekundární infekce komplikující léčbu jiných nemocí. Mezi takové onemocnění patří mimo jiné také cystická fibróza, u které je spolu s bakteriálním druhem *Pseudomonas aeruginosa* hlavním původcem plicních infekcí. Během cystické fibrózy se v plicích produkuje zvýšené množství hlenu, jenž vytváří optimální podmínky pro osídlení bakteriemi. Malé množství bakterií *S. aureus* zde v perzistentním stavu přetrvává i po antibiotické léčbě a po jejím odeznění jsou tyto bakterie schopné opakovaně vyvolat onemocnění. Navíc se u těchto izolátů z chronických infekcí kumulují adaptační mutace zlepšující schopnost v organizmu perzistovat.

Perzistentní buňky jsou takové bakteriální buňky, jež v dormantním stavu dokáží přežít působení antibiotik a další nepříznivé vlivy prostředí. Po jejich odeznění se perzistentní buňky navrátí do svého metabolicky aktivního stavu, ve kterém jsou opět schopny reprodukce. Vstup do perzistence je náhodný proces, ke kterému dochází stochasticky u malé subpopulace buněk, nicméně stresové podmínky zvyšují pravděpodobnost přechodu do perzistentního stavu. Na rozdíl od rezistence není tato schopnost geneticky kódovaná a populace vzniklá dělením buněk přeživších perzisterů nejeví vyšší pravděpodobnost tvořit perzistery.

U *Staphylococcus aureus* se hlavním regulátorem pro přechod do perzistentního stavu zdá být dvoukomponentový systém Agr, který řídí mechanismus Quorum sensing pro vnímání hustoty buněk v okolí. Aktivovaný Agr systém pozitivně reguluje virulenci a zároveň inhibuje přechod do perzistentního stavu. Inaktivován bývá během stresové odpovědi nepřímo přes alternativní sigma faktor σ^B RNA polymerázy kódovaný genem *sigB*. Ačkoliv schopnost perzistovat není dána geneticky, mutace v souvisejících genech Agr systému mohou zvyšovat či snižovat frekvenci přechodu do stavu perzistence. V této diplomové práci byly zkoumané izoláty s mutacemi v operonu *sigB* a v genu *agrA* pro regulátor odpovědi dvoukomponentového systému a byl porovnáván jejich vliv na schopnost izolátů perzistovat. Celkem devět testovaných izolátů pocházelo od dvou pacientek s cystickou fibrózou, přičemž primoizoláty byly odebrané v momentě stanovení diagnózy a další chronologické izoláty byly odebrány s půlročním až ročním odstupem. Izolace proběhla v nemocnici FN Motol a příbuznost získaných izolátů byla stanovena MLST genotypizací.

CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovit míru perzistence a posoudit, zda u chronologických izolátů dochází ke změně ve schopnosti kmenů perzistovat v závislosti na zjištěných adaptačních mutacích.

Dalším cílem bylo určit podíl buněk se sníženým membránovým potenciálem a nižší metabolickou aktivitou po působení vybraných antibiotik a výsledky porovnat se zjištěnou mírou perzistence jednotlivých izolátů.

Cílem, který vyplynul během experimentů, bylo prověřit vliv extracelulárních molekul produkovaných do kultivačního média na růstové parametry studovaných izolátů.

Podle využitých experimentálních přístupů byly hlavní cíle rozděleny do následujících dílčích cílů:

- *Pomocí TD testu porovnat schopnost izolátů přecházet do perzistentní formy*
- *Monitorováním průběhu křivek hynutí po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu metodou stanovení CFU určit míru perzistence jednotlivých izolátů*
- *Porovnat u izolátů podíl buněk se sníženým membránovým a redoxním potenciálem po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu. Zároveň stanovit míru exprese genu sigB v jednotlivých subpopulacích*
- *Porovnat účinky působení sterilních supernatantů od vybraných izolátů na růstovou rychlost, na rychlost hynutí po působení oxacilinu a schopnost vyrůstání z perzistence po působení ciprofloxacinu a oxacilinu.*

1 Charakteristika *Staphylococcus aureus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou grampozitivní a řadí se do kmene Firmicutes, třídy Bacilli a řádu Lactobacillales. Jedná se o nesporulující a nepohyblivé koky. Po rodu *Propionibacterium* jsou stafylokoky druhou nejčastější komenzální skupinou bakterií osidlující lidskou kůži (Byrd et al. 2018). Rozdělujeme je na koaguláza-negativní a koaguláza-pozitivní podle jejich schopnosti rozkládat fibrinogen na fibrin. Tento fenomén se projevuje shlukováním buněk v tekutém médiu po přidání plazmy. Nejčastěji se vyskytujícími stafylokoky bývají koaguláza-negativní *S. epidermis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* nebo *S. lugdunensis*. *Staphylococcus aureus* je jedním z mála koaguláza-pozitivních stafylokoků a lze ho proto snadno určit (Finkelstein & Sulkin 1958, Sperber & Tatini 1975).

Oportunně patogenní *Staphylococcus aureus* je bakterie kolonizující nejen kůži, ale i hrdlo, a především nosní dutinu. Vyskytuje se u 20 až 30 % lidské populace, aniž by hostitelům způsoboval zdravotní komplikace, avšak kolonizace zvyšuje riziko vzniku onemocnění (Parlet et al. 2019). Bývá původcem kožních infekcí jako jsou abscesy, impetigo, celulitidy, folikulitidy, furunkly a karbunkly. Způsobovat může i infekce jiných tkání a orgánů, z nichž je možno jmenovat endokarditidy, sinusitidy, sekundární pneumonie, osteomyelitidy, enterokolitidy či bakteriémie. K rozvoji infekce dochází většinou u imunokompromitovaných pacientů, po chirurgickém zákroku nebo po zranění kůže. Je zodpovědný především za nozokomiální infekce vzniklé v nemocničním prostředí a představuje zvýšené riziko také pro novorozence a pacienty s cystickou fibrózou. V souvislosti s nemocničním prostředím může docházet k tvorbě biofilmu na chirurgických implantátech a cizích tělesech (př. katetr, kanyla, kardiostimulátor, endoprotéza). Biofilm poskytuje bakteriím ochranu před imunitním systémem, proto je při léčbě nutné cizí těleso nebo implantát opět vyjmout (Tong et al. 2015).

2 Patogenita *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus napadá tkáň a orgány po celém těle. Při průniku do organismu spouští prozánětlivou imunitní odpověď. Svými toxiny a buněčnými strukturami indukuje tvorbu interleukinu IL-8, který aktivuje migraci neutrofilních granulocytů do místa infekce. Granulocyty po fagocytóze uzavřou bakterie do fagozomů a aktivují mechanismy pro jejich zničení, mezi něž patří degranulace, produkce kyslíkových radikálů (ROS), sekrece cytokinů a syntéza leukotrienů. *S. aureus* uniká rozpoznání imunitním systémem tvorbou polysacharidového pouzdra nebo biofilmu, ale brání se i aktivně produkcí tzv. CHIPS molekul blokujících receptory neutrofilů nebo molekul blokujících komplement. Pokud dojde k fagocytóze, je bakterie schopná způsobit lyzi neutrofilů svými cytolytickými leukotoxiny. Oxidativnímu stresu se bakterie brání produkcí katalázy a superoxid dismutázy (DeLeo et al. 2009). Některé virulentní kmeny jsou schopny po fagocytóze uvnitř granulocytů přežít a zůstat tak chráněny před rozpoznáním imunitním systémem. Zároveň se tímto způsobem mohou rozšířit do dalších částí těla (G. Y. C. Cheung et al. 2014).

Během cystické fibrózy, u které *S. aureus* často kolonizuje plíce pacientů, dochází k imunitní odpovědi zvýšenou tvorbou neutrofilních extracelulárních pastí, tzv. NETs. Jsou tvořeny extracelulární DNA a antimikrobiálními neutrofilními granulemi. *S. aureus* produkuje nukleázy degradující NETs a je tak schopný se jejich účinku aktivně bránit (Herzog et al. 2019).

S. aureus se při kultivaci na standartních živných médiích, jako je BHI či TSB, projevuje typickým žlutým zbarvením, za něhož je zodpovědný produkovaný karotenoidní pigment stafyloxantin. Po chemické stránce se jedná o membránově vázaný triterpenoid, který se podílí na udržování integrity a stabilizaci cytoplazmatické membrány. K rigiditě membrány přispívá zvýšením uspořádání alkylových řetězců membránových lipidů. Také brání oxidativnímu účinku imunitního systému detoxifikací ROS, čímž přispívá k virulenci (Mishra et al. 2011).

2.1 Nozokomiální infekce

Staphylococcus aureus je častou bakterií způsobující nozokomiální onemocnění, tedy infekce vzniklé v souvislosti s hospitalizací v nemocničním prostředí. Jedná se o sekundární infekce, které mohou zhoršovat průběh a komplikovat léčbu jiných probíhajících nemocí a způsobovat vyšší morbiditu a mortalitu. Nejčastěji jde o pneumonální infekce, méně často o infekce krevního řečiště nebo močových cest. Nemocnice je místem, kde se nozokomiální infekce snadno šíří a často je původcem kmen *S. aureus* rezistentní k meticilinu, tzv. kmen MRSA. Vysoké riziko přenosu je nejen na operačních sálech a u dialyzačních jednotek, ale také přes transfúzní jednotky, vodu nebo zavedený katetr. Kolonizace bakterií *S. aureus* ve spojitosti s podstoupením invazivního lékařského výkonu je vysokým rizikem vzniku nozokomiálních infekcí (Nimer 2022).

2.2 Akutní a chronický průběh onemocnění

Bakteriální buňky *in vivo* jsou v neustálém kontaktu s vnějšími podněty, které rozhodují o jejich specializaci a tím ovlivňují, k jakému průběhu infekce bude docházet. *S. aureus* je schopen přecházet mezi dvěma formami, které mohou vyvolat buď akutní nebo chronickou infekci. Mohou žít jednak ve formě rozptýlených individuálních buněk, nebo jako součást společenstva tvořícího biofilm. Samostatně žijící buňky produkují toxiny a způsobují krátkodobé akutní infekce či bakteriémii. Buňky v biofilmu vedou spíše k trvajícimu chronickému onemocnění (Lister & Horswill 2014).

V těle se vyskytují oba typy buněk a průběh nemoci závisí na jejich vzájemném poměru. V rozhodnutí o buněčném osudu je důležitý Agr regulační systém, jehož působení je detailně popsáno dále. Jeho zvýšená produkce nejspíše vyvolá přechod na planktonní buněčnou formu (Boles & Horswill 2008). Naopak tvorba biofilmu nastává spíše při expresi genu *sigB* kódujícího sigma podjednotku RNA polymerázy, jehož produkt funguje jako represor *agr*. V případě chronické infekce je tvorba biofilmu podstatná. Biofilm totiž buňky lépe chrání jak proti mechanismům imunitního systému, tak proti antibiotikům, což bývá jedním z důvodů jejich obtížné léčby. U chronických infekcí jsou často nalézány izoláty s defekty v *agr* genech. Tyto mutanty vykazují sníženou hemolýzu a jsou schopny tvořit silnější biofilm (García-Betancur et al. 2017).

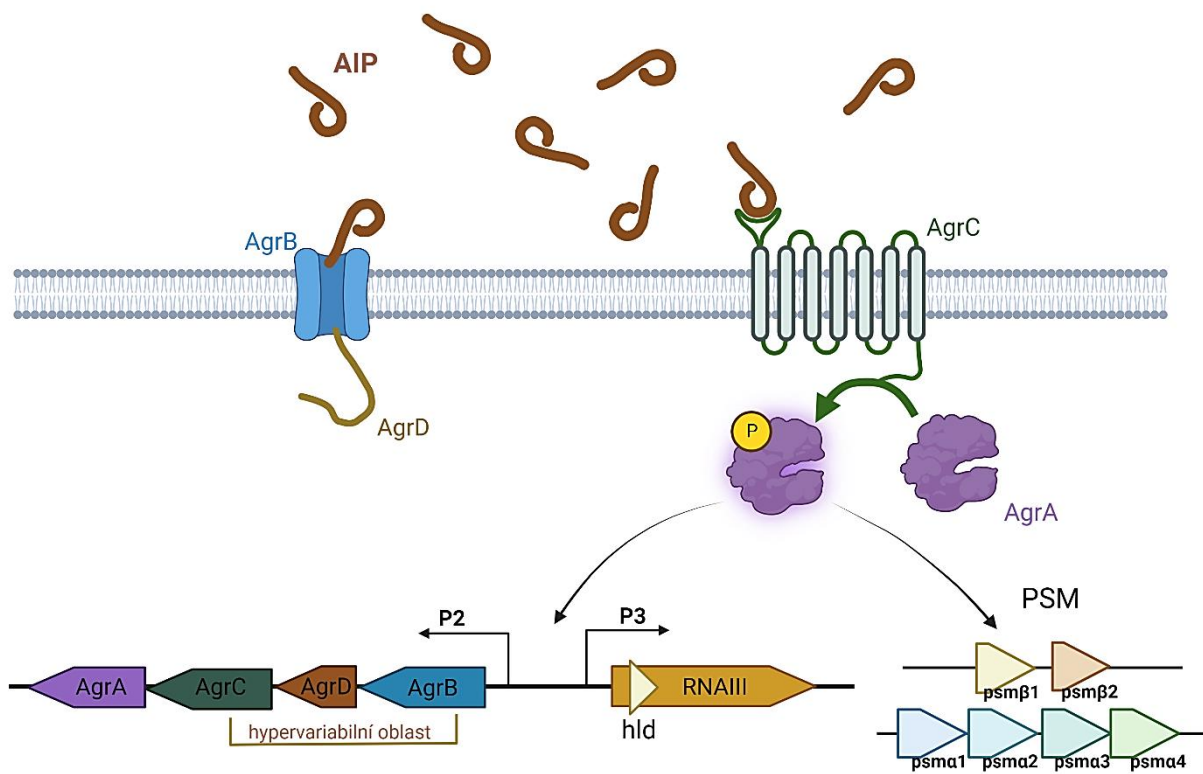
Rozdíly mezi osudy buněk jsou dány jejich fenotypem, přestože genotypově jsou buňky identické. Přechod mezi dvěma výše zmíněnými formami je odezvou na lokální signály během

infekce. Příkladem lokálních signálů, kterým jsou buňky v těle vystaveny, mohou být Mg^{2+} ionty, jejichž zvýšená koncentrace vyvolává vyšší míru exprese *sigB* a směřuje k tvorbě biofilmu. Mg^{2+} ionty svou vazbou stabilizují teichoové kyseliny a zvyšují rigiditu buněčné stěny. Během dlouhotrvajících infekcí probíhá kolonizace *S. aureus* především v místech vyššího obsahu Mg^{2+} , tedy v kostech a ledvinách. Zde bakterie tvoří biofilm, jenž může vést ke vzniku chronických infekcí. Z těchto míst se buňky periodicky rozptylují a přispívají k akutnímu průběhu infekce. V srdeční tkáni, kde je naopak nižší koncentrace Mg^{2+} , se vyskytuje vyšší podíl bakterií s aktivním Agr systémem. (García-Betancur et al. 2017).

3 Globální regulátory virulence u *Staphylococcus aureus*

3.1 Agr systém

Agr lokus kóduje dvoukomponentový systém zodpovědný za mechanismus Quorum sensing a zdá se být centrálním regulačním systémem pro přechod mezi chronickou a akutní infekcí. Jeho aktivace je závislá na zpětnovazebné smyčce přes autoindukční peptidy (AIP), které sám kóduje a na jejichž impulsy aktivuje faktory virulence. Obsahuje dva promotory (P2 a P3) opačně směřujících transkripčních jednotek RNAII a RNAIII, jejichž expresi reguluje prostřednictvím kódovaného regulátoru AgrA. Mechanismus tohoto dvoukomponentového systému je zobrazen na obrázku 1.



Obrázek 1: Mechanismus působení a uspořádání genů Agr systému

Z promotoru P2 se spouští transkripce operonu *agrACDB*. Produkty translace jsou proteiny účastníci se Quorum sensing mechanismu, kdy AgrD je prekurzorem signální molekuly AIP, AgrB je transmembránový protein pro maturaci AIP a jejich přenosu vně buňku, kde jsou zachyceny histidinovou kinázou AgrC, jež se autofosforyluje a přenáší fosfát na protein AgrA. AgrA~P umožňuje expresi genů operonu P2 a při překročení hranice ve své koncentraci aktivuje expresi RNAIII. Současně AgrA~P aktivuje expresi *psm* genů. Geny *psm*β1-2 se nacházejí na odlišném lokusu než *psmA*1-4 a gen *hld* pro δ toxin (*psm*γ) se nachází v rámci transkripční jednotky RNAIII. U genů AgrC, AgrD a AgrB je vyznačena hypervariabilní oblast, která se liší mezi Agr typy I - IV. Ilustrace byla vytvořena v BioRender.com

Operonem P2 jsou kódovány geny *agrA*, *agrC*, *agrD* a *agrB*. Gen *agrD* kóduje prekurzor cyklického oligopeptidu AIP. Je proteolyticky štěpen a sekretován z buňky přes transmembránový protein AgrB, jenž v membráně tvoří pór a současně plní funkci endopeptidázy umožňující maturaci AIP. Z AgrD dojde k odstranění C-terminálního konce, zacyklením C-koncové domény a cysteinu se vytvoří thiolaktonový kruh a posléze dojde k proteolýze N-koncové domény. Maturované AIP peptidy jsou složeny ze 7-9 aminokyselin a obsahují pětičlennou strukturu thiolaktonu, který je zřejmě rozpoznáván receptorem. N-konec slouží k aktivaci AIP a jeho absence inhibuje virulenci (Lyon et al. 2000).

AgrC je 7x membránou procházející histidinová kináza sloužící jako senzor. Svou N-koncovou doménou interaguje s nahromaděnými AIP molekulami vně buňky. Po navázání AIP dojde k autofosforylaci koncového histidinu na C-terminální doméně v cytoplazmě. Následují konformační změny a fosforylace aspartátu u regulátoru AgrA. Tím dochází ke spuštění kaskády pro aktivaci genů akutní fáze a genů vlastního operonu (L. Wang et al. 2014).

Fosforylovaný AgrA~P je nejdůležitějším prvkem kaskády, jelikož jeho koncentrace rozhoduje o tom, zda buňka přejde do disperzní formy a bude produkovat virulentní faktory či bude přetrvávat ve formě biofilmu. Vazbou AgrA~P do promotoru P2 je tento promotor aktivován a dochází k dalšímu zvyšování koncentrace AgrA. Současně aktivuje expresi genů *psmA*, β pro virulenci a váže se na promotor P3, čímž aktivuje expresi regulační *rnaIII* pro tvorbu dalších cytolytických toxinů. Vazba do promotorů P2 a P3 se odehrává v místech přímých repetitivních intergenových oblastí. Promotorové oblasti jsou téměř identické, avšak k promotoru P2 má AgrA~P vyšší afinitu. Podmínkou aktivace méně citlivého promotoru P3 je překročení hranice kritické koncentrace AgrA~P. Buňky, u kterých dojde ke zvýšení koncentrace AgrA~P získávají schopnost virulence a bývají zodpovědné za akutní infekci. Naopak buňky, u kterých nedojde k překročení této hranice v koncentraci AgrA~P nebudou mít aktivované geny pro virulenci, zatímco geny spojené s tvorbou biofilmu, které jsou běžně Agr systémem inhibovány, budou exprimovány (West & Stock 2001, Koenig et al. 2004).

Operon promotoru P3 kóduje molekulu RNAIII. Je to regulační sRNA podstatná pro transkripci i translaci genů exotoxinů a dalších virulentních faktorů akutní fáze. Zároveň ve své transkripční jednotce obsahuje gen *hld* pro hemolyzin delta, jeden z hlavních virulentních faktorů schopný lyzovat lidské erythrocyty. RNAIII působí dvojitým účinkem, jednak umožňuje produkci virulentních faktorů akutní fáze a jednak způsobí snížení exprese genů pro syntézu extracelulárních polysacharidů a adhezivních proteinů potřebných k tvorbě biofilmu. Syntézu proteinů pro adhezi buněk reprimuje RNAIII přímo, zatímco transkripci genů kódujících toxiny

a genů pro disperzi buněk aktivuje nepřímo přes regulační proteiny MgrA, Rot a další transkripční regulátory. (Boisset et al. 2007).

Při translaci α -toxinu působí RNAIII jako antisense RNA. Svou vazbou na *hla* mRNA brání intramolekulárnímu párování bází, čímž odkrývá místo pro nasednutí ribozomu a umožňuje iniciaci translace. V jiných případech působí jako antisense RNA tak, že vazbou na mRNA iniciaci translace inhibuje, tomu se děje u mRNA kódující adheziny a jiné proteiny spojené s adhezí a biofilmem. Mezi inhibované patří mRNA pro protein A nebo pro transkripční regulátor Rot. K regulaci na translační úrovni slouží 3' doména RNAIII (Morfeldt et al. 1995).

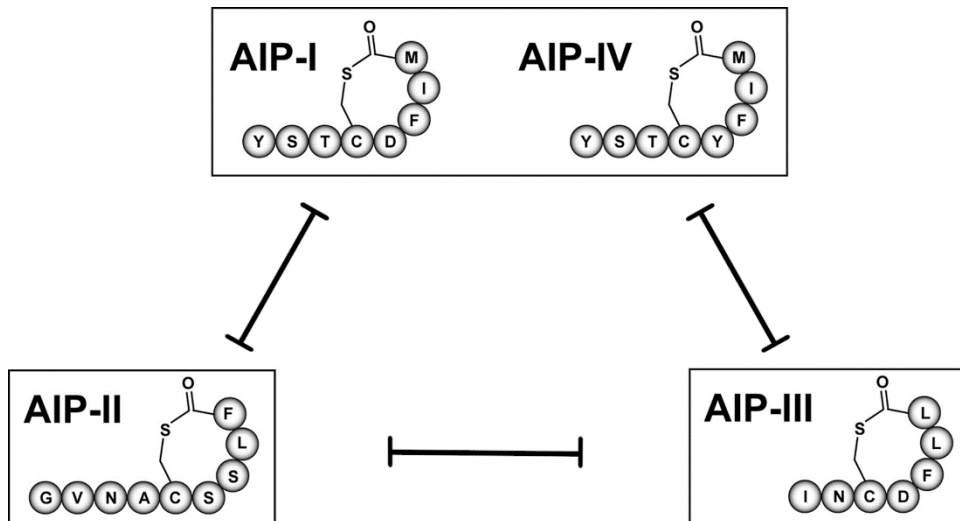
3.1.1 Varianty AIP

Kmeny bakterií *S. aureus* produkují různé varianty autoindukčních molekul, které jsou kódovány genem *agrD*. Bylo zjištěno, že toto je způsobeno genetickou variabilitou Agr systému v genech nejen pro AIP (*agrD*), ale také pro kinázu AgrC i transportní protein AgrB. Hypervariabilní oblast se nachází v části *agr* operonu zobrazené na obrázku 1. Jedná se o 2/3 genu *AgrB*, gen *AgrD* a N-terminální část *AgrC*. Protein AgrA je mezi všemi kmeny *S. aureus* naopak vysoce konzervovaný (Ji et al. 1997).

U rodu *Staphylococcus* bylo nalezeno více než 20 různých alel Agr systému, z toho se čtyři vyskytují u druhu *Staphylococcus aureus*. (Dufour et al. 2002) Kmeny se podle variabilní části Agr lokusu rozlišují na Agr typy I-IV. Ačkoliv na buňky vlastního kmene působí AIP pozitivně a aktivují virulenci, u kmenů s odlišným Agr typem aktivitu Agr systému inhibují. Inhibice jinými variantami AIP je reverzibilní a umožňuje tak odezvu na výskyt konkurence. (Geisinger et al. 2009) Tento mechanismus funguje i mezi ostatními druhy bakterií a v přirozeném prostředí vede k převážením početnějšího druhu bakterií nad jiným. Struktura typů AIP I a IV se liší pouze v jedné aminokyselině a vzájemně se neinhibují, ba naopak přidání AIP typu IV k buňkám *S. aureus* typu I vede k mírné aktivaci Agr, asi o 2/3 slabší než jakou mírou dochází k aktivaci vlastními AIP (Jarraud et al. 2000).

Nejčastěji se vyskytujícím typem u zdravých jedinců jsou bakterie Agr typu I, zatímco u nemocných pacientů bývá častěji nalézán Agr typ III. Zastoupení bakterií s odlišnými Agr typy může být typické také pro jednotlivá onemocnění. Agr Typ III bývá nejčastěji spojován se syndromem toxického šoku a *S. aureus* typu IV často způsobuje stafylokokový syndrom opárené kůže u novorozenců. Bakterie s Agr typem I bývají spíše původci bakteriemií. Tyto výsledky však nejsou jednoznačné a není jisté, zda Agr typ ovlivňuje formu infekce. (Jarraud

et al. 2000, Bibalan et al. 2014). Struktura oligopeptidů AIP všech čtyř typů je zobrazena na obrázku 2, kde je současně znázorněna jejich vzájemná interference, tedy inhibice nevlastním Agr typem s výjimkou typů I a IV, které se vzájemně aktivují (Malone et al. 2007).



Obrázek 2: Rozdíly v aminokyselinové sekvenci čtyř typů autoindukčních oligopeptidů (AIP) a jejich vzájemné působení. AIP typy I a IV se liší pouze v jedné aminokyselině a vzájemně se aktivují, zatímco mezi ostatními typy AIP dochází k inhibici Agr systému. Převzato a upraveno podle Malone. et. al 2007.

In vivo při počátku infekce dochází k rapidnímu pomnožení bakteriálních buněk a až poté dochází k aktivaci genů Agr systému, produkci toxinů a dalších faktorů virulence a k vyvolání nespecifické imunitní odpovědi. Virulentní faktory, především exotoxiny, poskytují bakteriím ochranu proti leukocytům (Wright et al. 2005).

3.1.2 Quorum sensing

Agr systém má důležitou úlohu v Quorum sensing mechanismu. Quorum sensing bakteriím slouží jako forma vnitrodruhové komunikace mezi buňkami, která jim umožňuje vzájemně si předávat signály a reagovat na změny v hustotách populace. Buňky vycítí přítomnost dostatečného množství buněk v okolí po nahromadění extracelulárních autoinduktorů a rozmanitými mechanismy na signál reagují. U gramnegativních bakterií je autoinduktorem nejčastěji acyl homoserin lakton. U *Staphylococcus aureus* jsou jím oligopeptidy AIP (Bassler 2002).

Funkce Agr systému tkví v rozpoznání přechodu populace do postexponenciální fáze, kdy přepne produkci adhezivních proteinů na produkci toxinů a umožní disperzi buněk. Během akutní infekce, kdy je Agr systém aktivovaný, nedochází k tvorbě biofilmu. Kromě vnímání hustoty populace tento dvoukomponentový systém slouží rovněž k detekci prostředí, například nahromadění AIP po endocytóze způsobí aktivaci Agr systému a produkci virulentních faktorů napomáhajících úniku z endozomu (Jabbari et al. 2012, Jenul & Horswill 2018).

Aktivní Agr systém je nutný pro rozpad biofilmu zpět na citlivé planktonní buňky. Při absenci agr operonu je produkce toxinů výrazně snížena, zatímco produkce proteinů pro adhezi a proteinů spojených s buněčnou stěnou je zvýšena (Xu et al. 2017). Buňky s nefunkčním Agr systémem tvoří robustní biofilm, u kterého téměř nedochází k diseminaci. Rozpadu biofilmu brání rovněž přidání glukózy do média, která má za následek snížení pH a tím reprimuje RNAIII (Boles & Horswill 2008).

3.2 Rodina proteinů *SarA*

Jako rodina *SarA* proteinů se označují proteiny *SarA*, *SarR*, *SarS*, *Rot*, *MgrA* a jejich dalších 6 homologů (*SarT*, *SarU*, *SarX*, *SarZ*, *SarV*, *SarY*). Jsou to DNA vazebné proteiny, které se svým HTH motivem (helix-turn-helix) vážou do velkého žlábků cílové DNA, zatímco svým motivem winged helix, složeným z několika α helixů a β listů, interagují s malým žlábkem DNA (A. L. Cheung et al. 2008).

SarA spolu s *Agr* systémem slouží k regulaci exprese genů pro virulenci. Je kódován třemi překrývajícími se transkripty *sarA* lokusu s promotory P1, P2 a P3. Je zodpovědný za regulaci dvoukomponentového regulačního systému *Agr*, jehož exprese v postexponenciální fázi zvyšuje vazbou do promotoru P2 a umožňuje syntézu toxinů. Současně reprimuje tvorbu exoproteáz, které by štěpily α toxin a PSM molekuly (phenol soluble moduline-like peptides), čímž umožňuje jejich akumulaci. (Zielinska et al. 2011) Během exponenciálního růstu naopak indukuje tvorbu proteinů pro adhezi a proteinu A, čímž přispívá k tvorbě biofilmu. (Lister & Horswill 2014).

SarR má opačnou funkci než *SarA*, byť se jeho vazebné místo v promotoru P2 *Agr* lokusu částečně překrývá. Působí jako represor, jelikož na rozdíl od transkripčních aktivátorů *AgrA* a *SarA* nezpůsobuje ohyb DNA. *SarR* reprimuje transkripci nejen genů *Agr* systému, ale částečně i transkripci *SarA* (Reyes et al. 2011).

SarS je rovněž DNA vazebný protein, jehož hlavní funkcí je aktivace transkripce genu *spa* pro protein A, jenž tvoří buněčnou stěnu, ale je i součástí matrix tvořící biofilm. Také brání transkripci genu *hla* pro α -hemolyzin.

Transkripční regulátor *Rot* je považován za antagonistu *Agr* regulátoru, vzhledem k jeho inhibičnímu působení na transkripci toxinů. Při přechodu do virulentní formy je *Rot* protein reprimován molekulou RNAIII, dojde k umožnění produkce genů toxinů a proteinů pro disperzi buněk a naopak je inhibována exprese genů povrchových proteinů. Za běžných podmínek je konstitutivně transkribován. Jeho regulace probíhá na translační úrovni vazbou RNAIII na *rot* mRNA, kde brání nasednutí ribozomu a iniciaci translace. Tento RNAIII-mRNA duplex je rozpoznán RNázou III, která enzymaticky *rot* mRNA štěpí (Boisset et al. 2007).

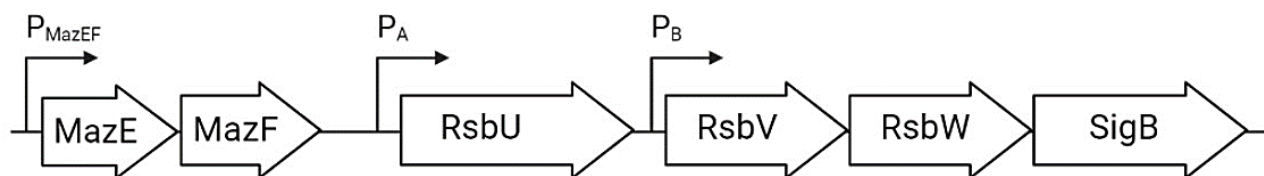
MgrA je zřejmě rovněž z části regulován pomocí RNAIII na translační úrovni. V tomto případě RNAIII naopak stabilizuje *mgrA* mRNA a umožňuje její transkripci. *MgrA* je transkripční faktor, který reguluje více než 350 genů a virulenci ovlivňuje analogicky k účinkům *AgrA*, tj. způsobuje nadprodukcí toxinů a dalších virulentních proteinů a naopak snižuje expresi genů povrchových proteinů (Gupta et al. 2015, Luong et al. 2006).

4 Stresová odpověď u *Staphylococcus aureus*

4.1 Alternativní sigma faktor B

Gen *sigB* kóduje alternativní sigma faktor obecné stresové odpovědi σ^B (SigB), jenž je aktivovaný při přechodu do stacionární fáze. Jeho zvýšená aktivita byla popsána po působení různých stresů, včetně vystavení buněk kyselému prostředí, alkoholu a teplotnímu šoku (Chan et al. 1998). Bylo nalezeno minimálně 251 genů, jejichž exprese je přímo či nepřímo ovlivňována sigma faktorem B, z nichž 198 genů je regulováno pozitivně a 53 genů je v přítomnosti SigB reprimováno (Bischoff et al. 2004).

Operon *sigB* se skládá ze 4 genů – *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* a *sigB*. Všechny geny tohoto operonu jsou exprimovány již během exponenciální fáze a regulace aktivity probíhá posttranslačně při přechodu do fáze stacionární. K transkripci genů *sigB* operonu dochází společně s geny *MazEF* ze 3 promotorů: P_{MazEF} , slabého promotoru P_A a na *sigB* závislého P_B , viz obrázek 3. P_{MazEF} je aktivován přes regulátor *SarA* během teplotního šoku či při působení antibiotik a je negativně regulován proteinem SigB, jenž reprimuje vlastní transkripci. Současně jsou tímto promotorem transkribovány geny *MazEF* toxin-antitoxin systému (Donegan & Cheung 2009).

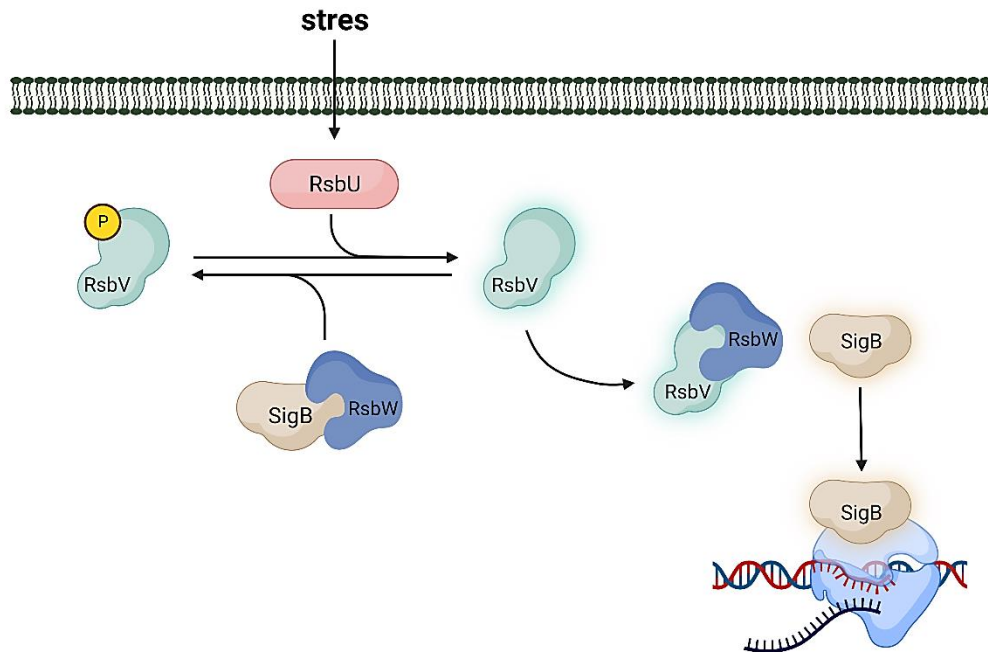


Obrázek 3: Operon *sigB* s geny *RsbU*, *RsbV*, *RsbW* a *SigB*, který je regulovaný třemi promotory P_{MazEF} , P_A a P_B . Součástí operonu jsou geny pro *MazEF* systém. Obrázek byl vytvořen v BioRender.com

Protein *RsbW* představuje anti-sigma faktor, jenž za běžných okolností tvoří komplex se SigB a tím jej inhibuje (Miyazaki et al. 1999). Za stresových podmínek je aktivován jeho antagonist *RsbV*, který vyvázáním *RsbW* aktivuje alternativní sigma faktor SigB. Aktivace tohoto anti-anti-sigma faktoru probíhá defosforylací fosfatázou *RsbU*, která tím reaguje na vzniklý stresový signál (Senn et al. 2005). Mechanismus aktivace SigB je znázorněn na obrázku 4.

Vliv SigB na virulenci není prozatím zcela probádaný. Bylo prokázáno, že reguluje expresi *sarA*, u něhož se pravděpodobně jedná o pozitivní regulaci. Současně je jedním z důsledků aktivního SigB snížení exprese *RNAIII*, které však patrně probíhá nezávisle na

působení SarA (Bischoff et al. 2001). SigB má opačný účinek než molekula RNAlII, tj. transkripce exoenzymů a toxinů je ovlivňována negativně, zatímco geny pro adheziny jsou naopak při zvýšené koncentraci SigB exprimovány. Ve spojitosti s virulencí má tedy opačnou funkci než Agr systém. Indukuje tvorbu biofilmu a směřuje spíše k chronické infekci. Současně zvyšuje expresi genů pro žlutý pigment stafyloxantin (Falkow et al. 2006).



Obrázek 4: Regulace aktivity alternativního sigma faktoru B. Při stresových podmínkách je aktivní fosforyláza RsbU, která defosforyluje anti-anti-sigma faktor RsbV. Ten je v defosforylovaném stavu aktivní a váže anti-sigma faktor RsbW, čímž ho vyvazuje ze sigma faktoru SigB. Uvolněný SigB tvoří komplex s RNA polymerázou a umožňuje transkripci genů stresové odpovědi. Ilustrace byla vytvořena v BioRender.com

4.2 Stringentní odpověď u *S. aureus*

Stringentní odpověď je vyvolána stresem, na nějž se bakterie snaží přizpůsobit změnou fenotypu pomocí zvýšení syntézy molekul alarmonu guanozin tetrafosfátu a pentafosfátu (p)ppGpp.

Signálem pro vznik stringentní odpovědi je především limitace živin, během které se do ribozomu vážou nenabitě tRNA a indukují tvorbu (p)ppGpp, za jejichž syntézu je u *Staphylococcus aureus* zodpovědná syntáza RSH. Ta se váže na ribozom s deacetylovanou tRNA a katalyzuje přenos pyrofosfátu z ATP na ribózu molekuly GTP pro syntézu pppGpp nebo molekuly GDP pro syntézu ppGpp. Enzym RSH má současně aktivitu pro degradaci (p)ppGpp. V bazální hladině je (p)ppGpp syntetizováno i během exponenciální fáze. Během stresových podmínek akumulace (p)ppGpp způsobí v buňce pokles GTP, jehož úbytek vyvolá snížení replikace, transkripce i translace. Většina genů stringentní odpovědi je pomocí (p)ppGpp aktivována nepřímo přes CodY (Geiger et al. 2014).

Ke stringentní odpovědi dochází také po fagocytóze, kde syntáza RSH nezávisle na CodY během stringentní odpovědi aktivuje rovněž syntézu PSM α,β peptidů. Molekuly PSM napomáhají úniku z fagozomu, což je příčinou jejich schopnosti přežít intracelulárně v buňkách makrofágů a neutrofilů. Aktivace syntézy PSM probíhá mechanismem, při kterém nedochází ke změnám v expresi genů Agr systému (Geiger et al. 2012).

5 Faktory virulence

Staphylococcus aureus produkuje velké množství virulentních faktorů, které jsou zodpovědné za jeho schopnost způsobovat závažná onemocnění. Některé z nich bývají kódovány na mobilních genetických elementech a přítomnost těchto faktorů se liší u jednotlivých kmenů v závislosti na horizontálním přenosu. Jiné virulentní faktory naopak bývají kódovány v jádru genomu a vyskytují se téměř u všech kmenů. Mezi hlavní faktory virulence se řadí PSM peptidy, α -hemolysin a δ -hemolysin (Hodille et al. 2016).

5.1 Leukocidiny a hemoliziny

Neutrofilní leukocyty v místě infekce fagocytují bakteriální buňky, čemuž se *S. aureus* brání tvorbou toxinů, které bílé krvinky lyzují. Tyto toxiny se obecně nazývají leukocidiny. Jejich struktura je tvořena dvěma charakteristickými proteinovými podjednotkami tvořícími póry v lipidické dvouvrstvě membrány cílové buňky. *S. aureus* způsobující infekce u člověka produkuje pět typů leukocidinů: Panton-Valentinův leukocidin (PVL), γ -hemolysin AB a CB, Leukocidin ED (LukED) a Leukocidin GH (LukAB) (Spaan et al. 2017).

Dalším virulentním faktorem, který patří do skupiny hemolysinů, je α -toxin, jinak nazýván α -hemolysin. Tento cytolytický toxin tvořící póry v membráně je hlavním virulentním faktorem u komunitní pneumonie vyvolané kmenem MRSA. V těle působí hemolyticky, tj. způsobuje rozpad červených krvinek narušením jejich cytoplazmatické membrány. Na buněčném povrchu tvoří homoheptamer, ze kterého se posléze vytvoří transmembránový pór v podobě β -barelu. Pórem jsou propouštěny draselné a vápenaté ionty, což vede k nekrotické smrti cílové buňky. α -toxin je ve formě polypeptidu kódovaný genem *hla*. Jeho exprese je regulována přes proteiny lokusů *agr*, *sarA* a *sae*. Dalším hemolysinem je β -hemolysin hydrolyzující sfingomyelin v plazmatické membráně cílové buňky (Xiong et al. 2006, Vandenesch et al. 2012).

5.2 PSM peptidy

PSM peptidy rovněž působí cytolyticky na leukocyty, mimo ně i na erytrocyty a další buňky, a to narušením jejich membrán. Po chemické stránce se jedná o krátké amfipatické α helikální peptidy. Své jméno získaly díky přechodu do fenolové fáze během fenol-chloroformové extrakce. V těle hostitele svým působením vyvolávají prozánětlivou odpověď. Vyskytují se především u kmenů komunitních infekcí, u nichž vedou ke zvýšené virulenci, nicméně je lze v menší míře najít i u méně virulentních kmenů, kde mají odlišnou funkci. Kromě cytolytické aktivity jsou totiž zodpovědné také za strukturaci biofilmu a tvorbu kanálků pro dopravu živin k nižším vrstvám biofilmu. Dále byla prokázána jejich účast na rozpadu biofilmu během akutní fáze infekce. Expres těchto imunomodulinů je přímo pozitivně regulována pomocí regulátoru AgrA a absence *agr* genů má za následek represí exprese *psm* genů. To vede ke vzniku silnějšího biofilmu bez schopnosti rozpadnout se na samostatné buňky (G. Y. C. Cheung et al. 2014, Otto 2015) a k přechodu do perzistence ve stacionární fázi (Xu et al. 2017). Během infekce jejich produkce tvoří až 60 % z celkové produkce proteinů (G. Y. C. Cheung et al. 2014).

Zároveň jejich aktivitou dochází k přechodu perzistentních buněk do aktivní formy. PSM molekuly se mohou vyskytovat samostatně ve volném stavu, nebo se seskupovat a tvořit vláknité struktury – fibrily. Fibrily na velikost perzistentní populace již vliv nemají, jelikož ztrácejí schopnost cytotoxické aktivity, naopak stabilizují biofilm (Baldry et al. 2020). Jejich transkripce může být spuštěna i produkcí (p)ppGpp během stringentní odpovědi, což se při infekci v lidském těle často děje po fagocytóze, kde je jejich hlavním účinkem únik z fagozomu destrukcí fagocytujících buněk. Kromě toho jsou zodpovědné za šíření buněk po epitelu při kolonizaci (Otto 2015).

Existují 3 hlavní typy PSM molekul – PSM α , PSM β a PSM γ (Pokorny et al. 2002). U kmenů rezistentních k meticilinu je možné nalézt také PSM-mec, kódovaný na mobilním genetickém elementu, chromozomální kazetě SCC*mec*. Expres PSM-mec je rovněž regulována pomocí AgrA (Qin et al. 2016). Silně cytolytické PSM α jsou dlouhé 20-25 aminokyselin, většinou s pozitivním nebo neutrálním nábojem. PSM β jsou složeny z 43-45 aminokyselin a jsou záporně nabitě. U *S. aureus* jsou lokusem *psm α* kódovány čtyři PSM α peptidy a lokusem *psm β* dva PSM β peptidy. Uspořádání jednotlivých *psm* genů je schématicky zobrazeno na obrázku 1 spolu s Agr systémem, kde je znázorněna transkripce peptidů PSM α 1-4 a PSM β 1-2 z po navázání regulátoru odpovědi AgrA~P do jejich promotorů (Pokorny et al. 2002).

PSM γ je dnes znám jako hemolyzin delta, neboli δ -toxin. Je součástí transkripční jednotky RNAIII, s níž se společně transkribuje. Způsobuje degranulaci mastocytů a mechanismem jeho účinku je tvorba pórů v membráně. Delta hemolyzin je peptid tvořený α helixem složeným z 26 aminokyselin s celkovým neutrálním nábojem. Působí selektivně na eukaryotické buňky. Po vmezeření do membrány se translokují do vnitřní vrstvy a způsobuje vyhlazení buněčného obsahu (Pokorny et al. 2002).

Podobným způsobem zřejmě působí i ostatní PSM peptidy. Jejich cytotoxicita je závislá na typu PSM molekuly, přičemž PSM α je z daných typů nejtoxičtější a souvisí se závažností akutního onemocnění. Působí zejména na eukaryotické buňky, ačkoliv mají i antimikrobiální aktivitu pro kompetici s jinými bakteriálními druhy. Samotné stafylokokové buňky jsou však proti působení PSM peptidů chráněny exportním systémem Pmt (G. Y. C. Cheung et al. 2014, Bojer et al. 2018). Pmt ABC transportér, kódovaný geny *PmtA,B,C,D*, slouží pro export všech typů PSM peptidů. Absence Pmt transportéru je pro buňky letální, z důvodu akumulace vlastních PSM molekul uvnitř buňky. (Chatterjee et al. 2013). Peptidy PSM α 1,2 a 4 pozitivně regulují expresi *pmt* genu vyvázáním jeho represoru PmtR z promotoru. Jsou tak regulátory svého vlastního exportu (Joo et al. 2016).

Uvnitř hostitelských endoteliálních buněk jsou bakterie internalizovány do váčků časných a pozdních endozomů a čelí nebezpečí autofágie. Únik z váčků do cytoplazmy zprostředkovaný PSM peptidy je strategií bakterií pro získání živin a ochranu před imunitními mechanismy hostitele. Po přechodu do cytoplazmy po čase dochází k usmrcení hostitelské buňky a bakterie jsou rozšířeny dále. Odlišný průběh nastává u bakterií SCV fenotypu, které po úniku z autofagozomu přežívají v cytoplazmě aniž by vyvolávaly hostitelské reakce. Kmeny *S. aureus* s mutacemi v genech Agr systému nebo *psma β* pravděpodobně lépe intracelulárně přežívají, a to přímo uvnitř váčků vznikajících z fagozomů a autofagozomů. (Siegmund et al. 2021). PSM moduliny současně působí jako surfaktin a přispívají k tzv. šíření kolonií (colony spreading) po TSA médiu. V takovém případě buňky *S. aureus* extrahují z média vodu, po které se na povrchu pohybují klouzavým pohybem. PSM toxiny rozrušují povrchové napětí vody a usnadňují pohyb po agaru (Lin et al. 2016).

Odlišnosti v poměrech hladin těchto tří typů PSM peptidů se vyskytují nejen mezi různými kmeny, ale rovněž mezi buňkami v akutním a chronickém stádiu infekce. Rozdíl pravděpodobně není způsobený odlišnou mírou transkripce, nýbrž následnou degradací proteázou aureolysinem, která je regulována globálními regulátory SarA a SaeRS (Zielinska et al. 2011).

6 Perzistence

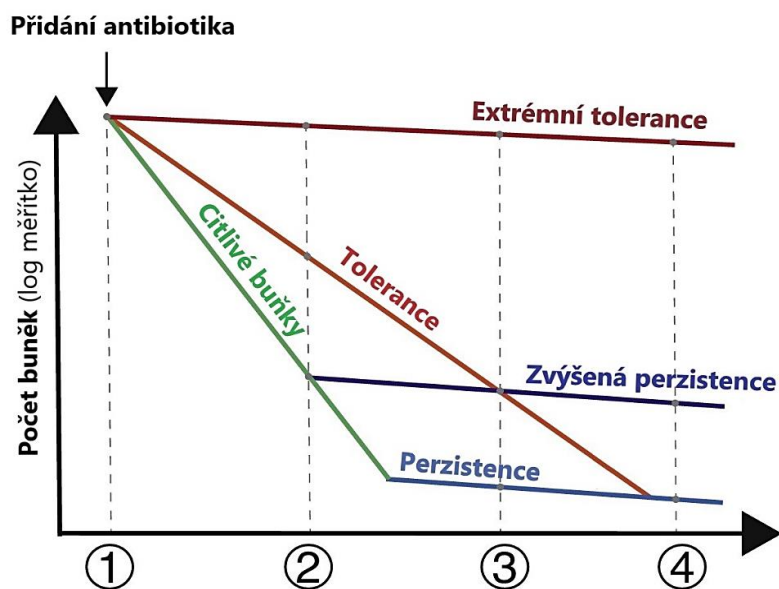
Perzistence byla poprvé popsána v roce 1944, kdy Joseph Bigger léčil stafylokokové infekce penicilinem a pozoroval malou subpopulaci přeživších bakterií. Tyto buňky popsal jako perzistentní (Bigger 1944). Subpopulace perzistentních buněk je charakterizována pomalým růstem a schopností přežít antimikrobiální léčbu. Perzistentní stav bývá spojen s dormancí, kdy je buňka metabolicky neaktivní, což je hlavní příčinou její schopnosti přežít účinky antibiotik působících na aktivní buněčné procesy. Perzistence nastává pouze u malé, heterogenní části populace a buňky přecházejí do stavu perzistence náhodně. Perzistentní buňky mají vždy stejnou genetickou výbavu jako původní populace. To se projevuje stejnou velikostí přeživší subpopulace po opakovaném vystavení populace vzniklé z perzistentních buněk antibiotiku (Balaban et al. 2004, Tuchscherer et al. 2020). Při indukované perzistenci je subpopulace buněk uvedena do dormantního stavu v reakci na stresový signál. K přechodu do perzistence dochází častěji u buněk ve stacionární fázi, avšak nepatrná část populace buněk může do tohoto stavu přejít nejen během odpovědi na stres, ale i spontánně, kdy je přechod do perzistence stochastickým dějem (Lechner et al. 2012, Brauner et al. 2016).

Perzisteři často vznikají přizpůsobením se intracelulárnímu prostředí hostitelských buněk. Tak se může dít během chronické infekce, kdy buňky uvedené do perzistentního stavu působí jako rezervoár infekce. Perzistentní buňky v těle hostitele mohou přežít několik let a kdykoliv mohou přejít do původního WT fenotypu způsobujícího akutní infekci. Na rozdíl od krátkodobé perzistence, u níž perzisteři při vhodných podmínkách snadno revertují do vegetativního stavu, dlouhotrvající perzistence u chronických infekcí bývá spojena s mutacemi v genomu (Eisenreich et al. 2021).

V literatuře bývá často perzistence zaměňována za toleranci, která se rovněž projevuje schopností bakteriálních buněk přežít antibiotickou léčbu. Zcela jiným mechanismem je potom rezistence, která umožňuje přežít přítomnost antibiotik a jiných baktericidních látek celé populaci bakterií. Rezistence je dána genotypem, jedná se o dědičný znak umožňující bakteriím překonat antibiotickou léčbu pomocí mnoha různých mechanismů odrážejících se na typu působení antibiotik. Citlivost k antibiotikům je charakterizována minimální inhibiční koncentrací antibiotika (MIC), která je u rezistentních bakterií vyšší, a je charakterizována tzv. breakpointem. V případě tolerance a perzistence nedochází u izolátů ke změně MIC a jsou obtížněji detekovatelné. V těchto případech buňky nemají specifické mechanismy pro ochranu před účinkem antibiotik, svým dormantním stavem jsou nezávisle na koncentraci antibiotik

hůře zasažitelné pro antibiotika cílící na aktivní procesy buněk (Brauner et al. 2016, Matsuo et al. 2019).

Perzistence se projevuje tzv. bifázickou křivkou hynutí, která odráží odlišnou míru hynutí u perzistentní a ne-perzistentní části populace. Oproti tomu, tolerance vede k selhání antibiotické léčby na celou populaci. Tento stav je pouze přechodný a po odeznění antibiotik se buňky vrací do svého aktivního stavu, ve kterém jsou k antibiotikům opět citlivé (Gefen et al. 2017). Průběh křivek hynutí u populací buněk jsou zobrazeny na obrázku 5, kde je znázorněn rozdíl průběhu hynutí mezi citlivými, tolerantními a perzistentními buňkami. Citlivé buňky po přidání antibiotika prudce hynou. Velikost populace obsahující buňky v perzistentním stavu zpočátku klesá se stejným průběhem jako u citlivých buněk, avšak po určité době z populace citlivé buňky vyhynou a populace zůstává tvořena pouze perzistery. Velikost této populace se v čase po dobu působení antibiotika již příliš nemění. U populací s vyšším množstvím buněk přecházejících do perzistentního stavu má hynutí stejný průběh, ovšem v populaci přežívá více perzisterů. Oproti tomu tolerantní buňky vykazují pomalejší průběh hynutí již od samotného přidání antibiotika, protože se tolerance týká celé populace. Tolerance může a nemusí být dána geneticky. U extrémně tolerantních buněk je průběh hynutí populace velmi pomalý a přežívá velké množství buněk (Shrnuto v Ronneau et al., 2021).



Obrázek 5: Rozdíly v průběhu hynutí u perzistentních, tolerantních a citlivých buněk. Citlivé buňky po přidání antibiotika rychle hynou, zatímco tolerantní populace buněk hyne pozvolněji. Perzistentní buňky jsou charakteristické bifázickou křivkou hynutí, kdy v první fázi většina populace hyne se stejným průběhem jako citlivé buňky a ve druhé fázi se hynutí výrazně zpomalí a počet přeživších buněk se již příliš nemění. Převzato a upraveno od Ronneau et al., 2021.

Přesný mechanismus vstupu do perzistence u *S. aureus* není doposud zcela odhalen. Nepřímé důkazy poukazují na Agr systém jako na hlavní regulátor perzistence (Fowler et al. 2004). Bylo dále zjištěno, že vstup do perzistence je regulován spíše PSM peptidy namísto přímého působení AgrA či RNAlII, jak se dříve myslelo. Psm α 1-4 a psm β 1-2 jsou zřejmě hlavními inhibitory perzistence (Xu et al. 2017).

6.1 Biofilm u *S. aureus*

Chronické infekce, u nichž se předpokládá vysoký výskyt perzisterů, jsou z většiny způsobeny růstem bakterií v biofilmu. Biofilm představuje specifické prostředí, ve kterém se vyskytuje zvýšená koncentrace buněk, jež mají odlišnou fyziologii. Přestože biofilm buňkám poskytuje ochranu před vnějšími vlivy a imunitními mechanizmy, bylo prokázáno, že antibiotika jsou schopna do buněk penetrovat i přes slizovou vrstvu. Buňky tvořící biofilm jsou sice vůči antibiotikům odolnější, avšak důvodem nejspíše není nedostatečný průnik antibiotik, jak se zprvu myslelo (Walters et al. 2003). Velká část buněk v rámci biofilmu se nachází v dormantním, perzistentním, stavu. Častější tvorba perzisterů by mohla být vyvolána sníženým množstvím živin a nedostatkem kyslíku. Po rozptýlení biofilmu se metabolismus buněk opět aktivuje a navrácí se senzitivita k antibiotikům (Waters et al. 2016).

Biofilm u *S. aureus* může vznikat závisle na *ica* genech kódujících N-acetylglukosamin (Cramton et al. 1999), nebo přes regulaci globálními regulátory AgrA a SarA, ale také pomocí sigma faktoru B (Lauderdale et al. 2009). *In vitro* byl pro tvorbu biofilmu prokázán také vliv molekul PSM, které polymerují a tvoří fibrilární struktury. V monomerním stavu naopak biofilm strukturují a vytváří kanálky potřebné pro proudění živin (Schwartz et al. 2012).

Mikrobiální povrchové komponenty rozeznávající adhezivní molekuly matrix (MSCRAMMs) jsou proteiny zakotvené do bakteriální membrány, které slouží k vazbě na fibrinogen a fibronektin a umožňují tvorbu biofilmu. Tyto proteiny jsou negativně regulovány Agr systémem, proto pokud je v buňce aktivován dvoukomponentový systém Agr, nemělo by docházet k tvorbě biofilmu a ke vstupu buněk do biofilmu dochází v době, kdy je Agr systém reprimovaný. K rozvolnění biofilmu dochází při jeho reaktivaci zvýšením molekul AIP v prostředí (Boles & Horswill 2008). Tvorba biofilmu by mohla být závislá i na Agr typu. S. S. Khoramrooz a spol. ve své studii zjistili, že nejlépe tvoří biofilm bakterie Agr typu III (Khoramrooz et al. 2016).

6.2 SCV fenotyp

Perzistentní populace bakterií izolovaných z klinických vzorků chronických infekcí často na agarových plátnách tvoří menší kolonie než běžné buňky. Z tohoto důvodu se fenotyp těchto perzisterů nazývá SCV (small colony variants). Tyto buňky *S. aureus* perzistují především intracelulárně. Dostávají se do hostitelských buněk, kde přežívají obranné imunitní mechanismy hostitele a v reakci na měnící se podmínky snadno revertují zpět do původního fenotypu. Na agarových miskách typicky rostou pomaleji a vzhledem k absenci stafyloxantinu většinou tvoří kolonie bez pigmentu, nebo se sníženým zbarvením. Také jsou charakteristické sníženým membránovým potenciálem (Mates et al. 1982). SCV fenotyp může být způsobený mnoha různými genotypovými znaky, často je nacházen u kmenů se sníženou expresí genů Agr systému, jenž se zdá být hlavním prvkem pro přežití v hostitelských buňkách, a proto tyto bakterie bývají méně virulentní. Naopak mívají vyšší expresi *sigB* a genů pro tvorbu biofilmu (Mitchell et al. 2013). Vysvětlením pro sníženou expresi genů Agr systému může být jeho inaktivace při oxidativním stresu. Jedním z obranných mechanismů fagocytujících buněk imunitního systému je produkce ROS, která má za následek tvorbu disulfidického můstku v molekule AgrA. Ta v oxidovaném stavu není schopna vázat se na promotory P2 a P3 (Sun et al. 2012).

Staphylococcus aureus je kromě aerobní respirace schopen také fermentace a nitrátové respirace, a to za podmínek nedostupného kyslíku a přítomnosti nitrátu. SCV varianty jsou schopny snadno přejít do anaerobního metabolismu a bývá u nich častěji nalezen deficientní dýchací řetězec s mutacemi v genech kódujících enzymy pro biosyntézu menachinonu a hemu (Proctor 2019). Mnohdy bývá nalezena také snížená aktivita akonitázy, která přes defektní Krebsův cyklus způsobuje nižší produkci enzymů elektrontransportního řetězce (Y. Wang et al. 2018). Během anaerobní respirace bývá snížená exprese *rnaIII*. Takové bakterie nejsou schopny hemolýzy z důvodu snížené produkce α -hemolyzinu, jenž je přes RNAIII pozitivně regulovaný (Coleman 1985, Yarwood et al. 2001).

7 Membránový a redoxní potenciál

Membránový potenciál buňky je dán rozdílem elektrického potenciálu mezi vnitřní a vnější stranou membrány. Funguje jako hnací síla pro pohyb iontů přes membránu a je pro buňku zdrojem volné energie. Na membráně se vytváří protonmotivní síla pohánějící syntézu ATP. Mimo to má membránový potenciál mnoho důležitých funkcí, mezi něž patří také transport, udržování homeostázy pH, interakce mezi buňkami či vnímání okolního prostředí (Benarroch & Asally 2020). Při tvorbě pórů v membráně dochází k úniku ATP z buňky a membránový potenciál je narušený. Vzniklý membránový potenciál také pohání vstup aminoglykosidových antibiotik do buněk a bakteriální buňky s depolarizovanou membránou ztrácejí k antibiotikům citlivost (Bryan & Kwan 1983). Membránový potenciál je dynamický a jeho změnami v reakci na molekulární a elektrochemické signály buňka reguluje fyziologické procesy. Depolarizace membrány vede, zřejmě z důvodu ztráty protonmotivní síly (Boulet et al. 2018), ke vstupu buněk do perzistentního stavu, kdy současně dochází ke snížení biosyntetických procesů (Benarroch & Asally 2020). Snížený membránový potenciál má přímý vliv na syntézu ATP.

NAD^+ je přenašeč elektronů oxidačně-redukčních reakcí. Po přijetí hydridového aniontu z metabolických drah je redukován na NADH, který plní funkci donoru elektronu a podílí se na tvorbě ATP při oxidativní fosforylaci. Převod redukováného NADH zpět na jeho oxidovanou formu NAD^+ je prováděn NADH dehydrogenázami, které udržují rovnováhu v poměru $\text{NADH}:\text{NAD}^+$. Tento poměr je možné využít jako indikátor aktivního buněčného metabolismu a viability buněk (Xie et al. 2020). Bakterie běžně obsahují 2 typy NADH dehydrogenáz. *Staphylococcus aureus* vlastní pouze druhý typ, u kterého nedochází k translokaci protonů přes membránu a vzniku protonmotivní síly se účastní jen nepřímo skrze menachinon. Tyto dehydrogenázy jsou složeny pouze z jedné podjednotky kódované geny *ndh*. (Schurig-Briccio et al. 2020) Uvnitř buněk hostitele se nachází aerobní prostředí s nízkým redoxním potenciálem. V těchto podmínkách dochází ke zvýšení poměru $\text{NADH}:\text{NAD}^+$ a přechodu k fermentativnímu metabolismu (Benarroch & Asally 2020).

8 Materiál

8.1 Bakteriální kmeny

Pro vypracování této diplomové práce byly využity klinické izoláty *Staphylococcus aureus* poskytnuté FN Motol izolované od dvou pacientek s cystickou fibrózou. K dispozici bylo celkem 9 chronologických izolátů, jejichž příbuznost byla zjištěna MLST genotypizací. První izolát byl odebrán po stanovení diagnózy do šesti týdnů po narození, ostatní byly odebírány při pravidelných kontrolách v přibližně půlročních až ročních intervalech (viz tabulka 1). Dále byly využity tři izoláty od jiných pacientek, se kterými pracovaly předchozí studentky, z důvodu jejich mutací a Agr typů. Všechny tyto izoláty byly typu Agr I kromě jednoho, který byl typu Agr II.

Pacientka 1 byla narozena v lednu 2019, izoláty byly izolovány čtyřikrát, z nichž před první a třetí izolací proběhla antibiotická léčba ko-amoxicilinem. Primoizolátem byl izolát 68VI. Pacientka 2 byla narozena v únoru 2017 a byly odebrány izoláty ve třech datech. Tato pacientka nebyla před odběry léčena antibiotiky. Primoizolátem byl izolát 29A. V tabulce 1 jsou vypsány použité izoláty a jejich data izolací, hvězdičkou jsou označeny primoizoláty. Dále jsou zde uvedeny mutace izolátů, které by potenciálně mohly souviset s perzistencí.

Detailněji jsou zjištěné mutace uvedeny na obrázcích 6 a 7. Všechny izoláty od první pacientky obsahovaly substituční mutaci v *rsbU*, izoláty 86A a 86B nesly navíc posunovou mutaci v *agrA* a 86B ještě posunovou mutaci v *rsbU*. U druhé pacientky nesl izolát 77A truncační mutaci v GTP pyrofosfatáze, jež se podílí na vzniku stringentní odpovědi. Izolát 38A měl deletovanou oblast mezi geny *agrD* a *hld*, a tedy plně nefunkční Agr systém. Izolát 39A s jiným typem Agr byl bez mutací.

Tabulka 1: Výčet klinických izolátů poskytnutých FN Motol včetně dat jejich izolace a mutace potencionálně související s perzistencí. Izoláty označené hvězdičkou (29A, 68VI a 39A) jsou primoizoláty.

Označení izolátu	Datum odběru	Mutace	
PACIENTKA 1			
68VI*	26.3.2019	Substituce 77 F→Y v <i>rsbU</i>	
69A	20.8.2019		
70A	26.11.2019		
86A	7.9.2020		Frameshift u 170 bp v <i>agrA</i>
86B			Frameshift u 170 bp v <i>agrA</i> Frameshift u 25 bp v <i>rsbU</i>
PACIENTKA 2			
29A*	15.1.2018		
57A	23.8.2019		
77A	25.2.2020	Trunkační mutace v GTP pyrofosfokináze	
77C			
Další izoláty			
39A*	8.3.2017		
38A	17.12.2018	Delece oblasti mezi geny <i>AgrD</i> a <i>hld</i>	

Pozice	Změna nukleotidů	Vliv na protein	Pořadí aminokyseliny	Záměna aminokyseliny	Identifikační číslo proteinu	Produkt	68VI	69A	70A	86A	86B
2190666	(T)7→(T)8				intergenové	Upstream od WP_000825817.1 (membránové zakotvený protein AmaP alkalické šokové odpovědi)		x			
2253252	(A)6→(A)7				intergenové	Upstream od WP_000991496.1 (EiIC podjednotka PTS transportéru) a WP_000477987.1 (rodina MurR/RpIR)		x			
159927	C→T	Substituce	1680	S→L	WP_001656945.1	Neribozomální peptidová syntetáza			x		
1270594	T→A	Substituce	162	I→K	WP_000414197.1	Hypotetický protein					
1561930	C→T				intergenové	Upstream od WP_000048060.1 (30S ribosomální protein S21)			x		
985716	T→C	Substituce	69	D→G	WP_001791353.1	Hypotetický protein			x		
681824	C→T				intergenové	Upstream od WP_000687415.1 (rodina transkripčního regulátoru LysR)			x		
1515392	G→T				intergenové	Upstream od WP_001124985.1 (transkripční regulátor ArgR)					
1965816	-A	Posunová	170		WP_000688492.1	Regulátor odpovědi transkripční faktor AgrA				x	x
2004514	(T)8→(T)7	Posunová	25		WP_042744356.1	Protein z rodiny PP2C - serin/threoninová fosfatáza RsbU					x
2199326	G→T	Substituce	3	R→I	WP_031785427.1	Hypotetický protein				x	
2004357	A→T	Substituce	77	F→Y	WP_042744356.1	Protein z rodiny PP2C - serin/threoninová fosfatáza RsbU	x	x	x	x	x

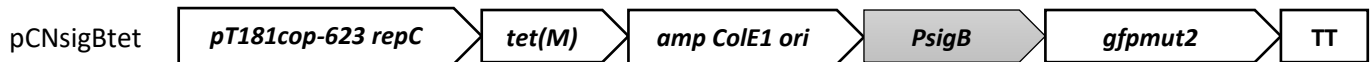
Obrázek 6: Mutace nalezené u zvolených izolátů pacientky 1. U zeleně označených genů byl prokázán vliv na perzistenci.

Pozice	Změna nukleotidů	Vliv na protein	Pořadí aminokyseliny	Záměna aminokyseliny	Identifikační číslo proteinu	Produkt	29A	57A	77A	77C
870173	C→T				intergenová	Upstream od WP_000145163.1 (hypotetický protein)		x		
1767477	T→A	Žádná	6		WP_001788970.1	Hypotetický protein		x	x	x
234861	T→C				intergenová	Pouze downstream			x	x
2871717	G→A	Substituce	40	H→Y	WP_000362503.1	tRNA uridin-5-karboxymethylaminometyl(34) GTPáza MmmE			x	x
2641675	A→T	Trunkační	35		WP_000289136.1	Protein z rodiny GTP pyrofosfokinázy			x	x

Obrázek 7: Mutace nalezené u zvolených izolátů pacientky 2.

8.2 Plazmidy

Plazmid pCNsigBtet byl metodami genového inženýrství připraven z vysokokopiového plazmidu pCN56 dřívější studentkou Hanou Kotkovou. Tento plazmid má vloženou promotorovou sekvenci *sigB* a původní kazeta s erytromycinovou rezistencí v plazmidu pCN56 byla nahrazena kazetou s tetracyklinovou rezistencí. Plazmid má velikost 6772 bp (Kotková 2019). Mapa plazmidu zobrazující pořadí genů je na obrázku 8.



Obrázek 8: Mapa plazmidu pCNsigBtet

pT181cop-623repC je replikační počátek *S. aureus*, *tet(M)* je kazeta pro tetracyklinovou rezistenci, *ampColE1ori* je replikační počátek *Escherichia coli* s kazetou ampicilinové rezistence, *PsigB* je vložený inzert promotorové sekvence *sigB*, *gfpmut2* je gen kódující GFP, *TT* je transkripční terminátor

8.3 Bakteriofágy

Pro nespecifickou transdukcí byl využit stafylokokový bakteriofág $\Phi 11$. Tento lysogenní fág séroskupiny B s lineární dsDNA obsahuje přibližně 45 kb. (Lee & Iandolo 1988) Skládá se z polyhedrální hlavy a z kontraktálního bičíku se zakončením komplexní bazální ploténkou (Kretschmer & Egan 1975).

8.4 Antibiotika

8.4.1 Antibiotika přidávaná k rostoucí kultuře

Pro navození hynutí byla použita troje antibiotika: ciprofloxacin, oxacilin a vankomycin. Přidávána byla vždy ve stonásobku hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) daného izolátu. Tato antibiotika jsou v praxi využívána při léčbě pacientů s cystickou fibrózou. Byla vybrána pro své odlišné mechanismy působení.

Ciprofloxacin je širokospektré fluorochinolonové antibiotikum. Cílí na topoizomerázu IV a DNA-gyrázu, kterým sféricky brání ve vazbě na DNA šroubovici, čímž inhibuje replikaci DNA. Působí baktericidně. Obvykle je používán spíše pro léčbu gramnegativních bakterií. Při léčbě stafylokokových infekcí je volen především tehdy, je-li původcem kmen MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Beneš 2018).

Oxacilin je v současné době (k roku 2022) v ČR jediným registrovaným protistafylokokovým penicilinem. Jeho mechanismus účinku, podobně jako u dalších β -laktamových antibiotik, závisí na β -laktamovém kruhu napodobujícím poslední dvě aminokyseliny D-Ala-D-Ala v peptidovém řetězci peptidoglykanu. Funguje jako falešný substrát pro transpeptidázy PBP (Penicillin binding proteins), to je příčinou jejich schopnosti inhibovat syntézu buněčné stěny. Na bakterie působí baktericidně. Na rozdíl od běžných penicilinů je oxacilin a jeho analogické přípravky (meticilin, kloxacilin, flukloxacilin) odolný vůči penicilinázám, avšak nelze ho použít na rezistentní kmeny MRSA (Beneš 2018).

Glykopeptidové antibiotikum vankomycin rovněž inhibuje syntézu peptidoglykanu, avšak jeho působení je založeno na jiném mechanismu. Vazbou na koncovou část pentapeptidu (D-Ala-D-Ala) zamezuje vzniku příčných propojení v buněčné stěně. Jedná se o úzkospektré antibiotikum účinkující svým působením pouze na grampozitivní bakterie, protože přes poriny vnější membrány gramnegativních bakterií neprochází. Jeho účinek na Stafylokoky je baktericidní. Často se využívá se k léčbě infekcí způsobených kmeny MRSA. Dnes je však využíván pouze jako záložní antibiotikum, jelikož se objevují i kmeny *S. aureus* k vankomycinu rezistentní, tzv. VRSA kmeny (Beneš 2018).

Zásobní roztoky antibiotik byly v následujících koncentracích:

Název antibiotika	Koncentrace zásobního roztoku	Výrobce
Ciprofloxacin	25 mg/ml	Fluka
Oxacilin	50 mg/ml	Bristol – Myers Squibb
Vankomycin	50 mg/ml	MP Biomedicals

Ciprofloxacin byl připraven rozpuštěním v 0,1M HCl, oxacilin i vankomycin byly rozpuštěny ve vodě. Zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

8.4.2 Antibiotika pro selekci na pevných médiích

Pro selekci buněk s plazmidem po transdukci bylo použito pevné TSB médium s tetracyklinem ve finální koncentraci 5 µg/ml. Zásobní roztok antibiotika byl uchováván v -20 °C.

Název antibiotika	Koncentrace zásobního roztoku	Výrobce
Tetracyklin	10 mg/ml	Fluka

8.4.3 Antibiotické disky

Pro TD testy byly využity antibiotické disky o následujících koncentracích. Ciprofloxacin byl použit ve dvou koncentracích.

Disky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

Název antibiotika	Název disku	Množství antibiotika v disku	Výrobce
Ciprofloxacin	CIP 1	1 µg	Oxoid
Ciprofloxacin	CIP 10	10 µg	
Oxacilin	OXA	1 µg	
Vankomycin	VAN	5 µg	

8.4.4 Stanovení MIC

Souprava ke stanovení MIC jednotlivých izolátů pro ciprofloxacin a vankomycin byla dodána výrobcem Microlatest.

8.5 Kultivační média

Všechna připravená média byla sterilizována v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120 °C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa.

8.5.1 BHI médium

BHI médium bylo dodáváno od firmy Oxoid v následujícím složení:

12,5 g mozkový extrakt, 5 g extrakt z hovězího srdce, 10 g pepton,

2 g glukóza, 5 g chlorid sodný, 2,5 g fosforečnan disodný

Dodané dehydratované BHI médium bylo v množství 37 g rozpuštěno v 1 litru destilované vody. V případě pevného BHI média byl ve vodě navíc rozpuštěn agar na konečnou koncentraci 2 % (w/v) a médium bylo přivedeno k varu pro úplné rozpuštění.

8.5.2 Obohacené BHI médium

Při měření OD s přidaným sterilním supernatantem z noční kultury bylo pro vyloučení vlivu sníženého množství živin použito BHI médium obohacené o 10 %. V 1 litru bylo rozpuštěno 40,7 g dehydratovaného BHI média.

8.5.3 TSB médium

TSB médium bylo dodáno firmou Sigma v následujícím složení:

17 g trypton, 3 g sója, 5 g chlorid sodný, 2,5 g fosforečnan didraselný,

2,5 g glukóza

V 1 litru destilované vody bylo rozpuštěno 30 g dehydratovaného TSB média a přivedeno k varu.

8.5.4 Top Agar

K transdukcii plazmidu byl z TSB média připravený TopAgar obohacený citrátem.

K 1 litru TSB média bylo přidáno 30 g citronanu draselného a 7 g agaru.

Citronan draselný

Citronan draselný byl dodán firmou Roth.

Agar

Agar byl dodán firmou Oxoid.

8.5.5 SM médium

Připravené SM médium pro kultivaci buněk ke stanovení MIC již bylo součástí soupravy od výrobce Microlatest

8.6 *Roztoky a chemikálie*

DMSO

DMSO byl dodán firmou Merck.

8.6.1 Konzervace kmenů

Glycerol

Glycerol od výrobce Sigma byl v 40% (v/v) koncentraci. Pro konzervaci kmenů byl ředěn v příslušném médiu na finální koncentraci 15-20 %.

8.6.2 Průtoková cytometrie

PBS (phosphate buffer saline)

Zásobní roztok 10X PBS byl dodán výrobcem ThermoFisher Scientific. Zásobní roztok bylo zředěn destilovanou vodou na výslednou koncentraci 10 % (v/v) a byl přefiltrován přes 0,22 μ m PVDF filtr.

DiOC₂(3)

150 μ M pracovní roztok DiOC₂(3) byl připraven zředěním 10 μ l 3mM zásobního roztoku od firmy ThermoFisher Scientific ve 190 μ l DMSO.

C₁₂-resazurin

Výrobcem ThermoFisher Scientific byl C₁₂-resazurin dodán ve formě lyofilizovaného prášku ve vialce (40 μ g), jejíž obsah byl pro přípravu 1mM zásobního roztoku rozpuštěn ve 100 μ l DMSO. Čerstvý 50 μ M pracovní roztok byl připraven zředěním zásobního roztoku v DMSO v poměru 1:19.

CCCP

CCCP (karbonyl kyanid 3-chlorofenylhydrazon) byl dodán firmou Sigma a byl rozpuštěn v DMSO na koncentraci 500 μ M.

TO-PRO-3

Zásobní roztok o 1mM koncentraci od firmy ThermoFisher Scientific byl zředěn v DMSO v poměru 1:1000. Připravený pracovní roztok byl pro měření na průtokovém cytometru dále v DMSO zředěn 1:9.

8.6.3 TD test a křivky hynutí

2M NaCl

Pro přípravu 2M roztoku bylo 116,88 g NaCl dodaného firmou Roth rozpuštěno v 1 litru destilované vody a roztok byl sterilizován v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120 °C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa.

Glukóza

Glukóza byla v dehydratovaném stavu dodána firmou Merck a byla zředěna na koncentraci 20 % (w/v).

8.6.4 Transdukce

CaCl₂

CaCl₂ byl dodán firmou Sigma a zásobní roztok byl rozpuštěn na 1M koncentraci.

8.6.5 Izolace plazmidu

TSM pufr

TSM pufr byl připraven smícháním 6 g Tris, 500 µl 2M MgSO₄ a 17,1 g sacharózy se 100 ml destilované vody a sterilován filtrací.

Tris byl dodán výrobcem Sigma.

MgSO₄ a sacharóza byly dodány výrobcem Penta.

Lyzační roztok

Lyzační roztok byl připraven vždy čerstvý smícháním 1 ml 1M NaOH a 0,5 ml 10% SDS s 3,5 ml destilované vody.

Neutralizační roztok

Neutralizačním roztokem pro izolaci plazmidu byl 2M octan sodný, jenž byl dodán firmou Lachema.

Izopropanol

Izopropanol byl dodán firmou Lachema.

Ethanol

Ethanol byl dodán firmou Lach Ner a zředěn na 75% roztok.

8.6.6 Horizontální gelová elektroforéza

50X TAE pufr

50x koncentrovaný TAE pufr byl připraven smícháním 36,3 g Tris, 8,57 ml kyseliny octové a 15 ml 0,5M EDTA ve 126 ml destilované vody.

Kyselina octová a EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) byla dodána výrobcem Lachema.

1X TAE pufr

1x koncentrovaný TAE pufr byl připraven naředěním 50X TAE v destilované vodě v poměru 1:49.

Agaróza

Top Vision Agaróza byla dodána výrobcem ThermoFisher Scientific.

Ethidium bromid

Ethidium bromid byl dodán firmou Sigma ve formě 1% (v/v) roztoku.

GeneRuler, DNA Ladder Mix

GeneRuler, sloužící jako marker, byl dodán firmou Fermentas.

DNA Loading dye

Barvicí roztok 6X TriTrack DNA Loading Dye byl dodán firmou Fermentas.

8.7 *Enzymy*

Lyzostafin

Zásobní roztok lyzostafinu o koncentraci 2 mg/ml byl dodán firmou Sigma.

RNáza A

Zásobní roztok RNázy A o koncentraci 10 mg/ml byl dodán firmou ThermoFisher Scientific.

9 Metody

9.1 Sterilní práce

Staphylococcus aureus je patogenní bakterie, která dle rozdělení biologických agens podle míry rizika pro člověka patří do bezpečnostní třídy 2 a je nutné s ním zacházet obezřetně, pracovat podle zásad sterilní práce a dodržovat hygienická pravidla. Zaočkování na Petriho misku i do tekutého média probíhalo vždy v UV boxu. Všechna použitá media s kulturami byla likvidována podle zásad likvidace GMO.

9.2 Konzervace kmenů

Veškeré kmeny získané od FN Motol byly zakonzervovány přenesením biomasy z pevného média do směsi glycerolu a BHI média o finální koncentraci glycerolu 20 %. Takto zakonzervované kmeny byly dlouhodobě uchovávány hluboce zmrazené při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro krátkodobé uchování byly kmeny naočkovány na Petriho misku s pevným médiem, kultivovány v termostatu a uchovány při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.3 Příprava buněčné kultury

Každý kmen byl nejprve ze zmrazené konzervy naočkován na Petriho misku se zpevněným živným médiem a inkubován přes noc v termostatu. Narostlé kolonie byly přeočkovány do 10 ml příslušného tekutého média a inkubovány do druhého dne na vzdušné třepače při 180 RPM. Takto kultivované buňky jsou dále označovány jako noční kultura. Veškeré kultivace v termostatu i na třepače probíhaly při teplotě $34\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud není specifikováno jinak, byly buňky kultivovány v BHI médiu.

9.3.1 Příprava sterilního supernatantu z noční kultury

Pro přípravu sterilního supernatantu byla noční kultura zcentrifugována při $4600 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Supernatant byl zfiltrován přes $0,22\mu\text{m}$ PVDF filtr a uchováván v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximálně do druhého dne. Během experimentů, u kterých byly supernatanty používány bylo vždy vyseto $200\ \mu\text{l}$ zfiltrovaného supernatantu na Petriho misky s BHI médiem pro kontrolu jejich sterility. Předpokládá se, že tímto způsobem připravený filtrát obsahuje PSM moduliny a AIP molekuly, které by mohly ovlivňovat vyrůstání z perzistence.

9.4 Stanovení MIC

Stanovení MIC pro ciprofloxacín a vankomycin probíhalo za pomoci komerčně dostupných sad Microlatest. Sada zahrnovala 96 jamkové destičky, v nichž každý sloupec obsahoval 8 postupně vzrůstajících koncentrací antibiotika.

Kultivace noční kultury probíhala v SM médiu. Do téhož média byla noční kultura ráno přeočkována v poměru 1:100 a kultivována na třepačce do OD₆₀₀ 0,5. Kultura byla následně v SM médiu 10x zředěna a do každé jamky s různou koncentrací antibiotika bylo napipetováno 100 µl této kultury.

Pro oxacilin nejsou k dispozici komerčně dodávané sady, proto bylo nutné nanést si do destičky vlastní ředící řadu oxacilinu od koncentrace 0,6 µg/ml do 4 µg/ml a ke každé koncentraci bylo opět naneseno 100 µl 10x zředěné kultury.

V obou případech byly vzorky v destičkách kultivované v termostatu po 24 hodin a následně odečten výsledek. Za minimální inhibiční koncentraci se považovala poslední koncentrace antibiotika, v jejíž jamce nebylo zjevné zakalení.

9.5 TD Test

TD Test (Tolerance Disk Test) je pozměněnou obdobou diskové difúzní metody pro testování citlivosti bakteriálních kmenů na antibiotika. Jedná se o metodu, jež popsal v roce 2017 Orit Gefen skupiny N. Balaban (Gefen et al. 2017). Na rozdíl od difúzní metody umožňuje TD test detekovat tolerantní a perzistentní buňky uprostřed inhibiční zóny. Kromě detekce perzisterů bylo možné současně stanovit, zda izoláty k antibiotikům nejsou rezistentní a určit velikost inhibiční zóny.

Noční kultura byla v poměru 1:100 přeočkována do tekutého BHI média a nechala se narůst do OD₆₀₀ 0,5. Odebraný vzorek se zředil v 2M NaCl a dekadickou řadou byly vytvořeny ředění až do 10⁻⁴. Konečné ředění 10⁻⁴ bylo vyseto na Petriho misky se zpevněným BHI médiem. Doprostřed misky byl vložen disk s antibiotikem a misky se nechaly kultivovat 24 hodin v termostatu. Poté byly antibiotické disky opatrně vyjmuty a na jejich místo byly vloženy prázdné disky, na které se nakapalo 20 µl 40% glukózy. Misky byly opět 24-48 hodin kultivovány v termostatu a následně byl odečten výsledek rozdělením počtu narostlých kolonií v inhibiční zóně do kategorií podle množství, případně spočítáním jejich přesného počtu.

9.6 *Křivky hynutí*

9.6.1 Křivky hynutí získané stanovením CFU

K získání křivek hynutí bylo využito stanovení CFU z kapkového výsevu. Noční kultura byla přeočkována do 4 Erlenmeyerovo baněk s BHI médiem na OD_{600} 0,05 a kultivována na třepačce do OD_{600} 0,5. Tento bod byl považován za čas t_0 a po odběru vzorků byla ke kulturám přidána jednotlivá antibiotika. Jedna kultura byla ponechána jako kontrolní bez přidaných antibiotik. Z každé kultury bylo odebráno 100 μ l a 10x zředěno v 2M NaCl. Vzorky byly zcentrifugovány při 8000 x g po dobu 5 minut. Po centrifugaci bylo 900 μ l supernatantu nahrazeno stejným objemem 2M NaCl. Dekadickou řadou byly vzorky dále zředěny až na ředění 10^{-4} . Jednotlivá ředění byla pomocí kapkového výsevu nanášena v množství 10 μ l na Petriho misky s BHI podle matrice, kdy na jednu Petriho misku bylo nanášeno 20 vzorků. Současně byla jednotlivá ředění nanášena na Petriho misky s BHI, na které bylo předem rozetřeno 200 μ l sterilního supernatantu, ojedinele i na Petriho misky, na které bylo rozetřeno 200 μ l tekutého BHI média. Pro kontrolu vyrůstání bylo paralelně vyseto 100 μ l z předem vybraných ředění na celou misku. Tímto způsobem byly vzorky s antibiotiky zpracovávány každou hodinu v časech t_0 až t_4 , ojedinele až do času t_6 . Všechny Petriho misky byly kultivovány v termostatu do druhého, případně třetího dne, kdy byly vyhodnoceny.

Během stanovení CFU byly současně každou hodinu odebírány vzorky, u nichž byla měřena optická denzita o vlnové délce 600 nm (OD_{600}) na spektrofotometru Helios γ . OD_{600} bylo měřeno u všech vzorků včetně kontroly bez antibiotik.

9.7 Transdukce plazmidu *pCNsigBtet*

Aby bylo možné detekovat na průtokovém cytometru expresi genu *sigB*, byl do buněk několika izolátů pomocí transdukce vložen plazmid *pCNsigBtet*, jenž má promotor genu *sigB* fúzovaný se zeleným fluorescenčním proteinem GFP.

9.7.1 Příprava fágového lyzátu

Noční kultura kultivovaná v TSB médiu s přidavkem CaCl_2 ve finální koncentraci 5mM byla zředěna v poměru 1:100 a kultivována na třepačce do OD_{600} 0,4. Kultura byla smíchána se zásobním fágovým lyzátem v poměru 1:2, tj. 0,5 ml kultury bylo přidáno k 1 ml fágového lyzátu. Směs buněk s lyzátem se nechala 30 minut stát v termostatu při 34 °C. Poté byla přenesena do 10 ml TSB média s CaCl_2 a nechala se 2 hodiny inkubovat při 34 °C a třepání 180 RPM. Pro úplnou lyzi buněk se směs přes noc nechala stát při laboratorní teplotě. Druhý den ráno byl lyzát zcentrifugován při 3000 x g, 10 minut a supernatant byl zfiltrován přes 0,45 μm PVDF filtr. Zfiltrovaný lyzát byl uchováván při 4°C.

9.7.2 Transdukce plazmidu

Noční kultura donorového kmene kultivovaná v TSB médiu s přidavkem 5mM CaCl_2 byla zředěna v poměru 1:100 a kultivována na třepačce do OD_{600} 0,4. Kultura byla smíchána s fágovým lyzátem v poměru 1:1 a 1:10 a inkubována v termostatu po 30 minut. Následně byl k lyzovaným buňkám přidán rozpuštěný TSB Top Agar obohacený citrátem, vytemperovaný na 45 °C. Takto byly infikované buňky vysety na TSB Petriho misku s přidáním tetracyklinem a kultivovány 24 hodin v termostatu. Narostlé kolonie byly přeneseny na TSB Petriho misky s tetracyklinem a po 24hodinové kultivaci v termostatu z nich byly náhodně vybrány 4 kolonie, které byly následně otestovány na přítomnost plazmidu.

9.7.3 Izolace plazmidu ze *Staphylococcus aureus*

Pro izolaci plazmidu byly vybrané kolonie přeneseny na TSB Petriho misky s tetracyklinem a kultivovány minimálně 24 hodin v termostatu. Z Petriho misek bylo odebráno 40 mg narostlé biomasy, která byla resuspendována ve 300 μl TSM pufru s přidáním pracovním roztokem lyzostafinu do výsledné koncentrace 2,5 % (v/v). Suspenze buněk se nechala inkubovat 15 minut při 37 °C. Poté byly přidány 3 μl RNázy A a 600 μl lyzačního roztoku. Po 5 minutách v ledu bylo přidáno 450 μl neutralizačního roztoku. Po dalších

5 minutách v ledu byl vzorek zcentrifugován při 80 000 x g, 10 minut. 1100 µl supernatantu bylo přeneseno do nové 2ml mikrozkušky a byl k němu přidán 0,7násobek izopropanolu. Mikrozkuška byla na 30 minut uložena do -20 °C. Vzorek byl zcentrifugován při 13000 x g, 10 min. K peletu bylo přidáno 300 µl 75% ethanolu a byl zcentrifugován při 13000 x g po dobu 5 min. Byl odebrán supernatant a zbylý ethanol se nechal vyschnout. Po vyschnutí byl pelet rozpuštěn ve 20 µl destilované deionizované vody. Přítomnost plazmidu ve vzorku byla stanovena horizontální agarózovou elektroforézou.

9.7.4 Analýza DNA pomocí horizontální gelové elektroforézy

K přípravě 1% gelu pro gelovou elektroforézu bylo 0,5 g agaru rozpuštěno v 50 ml 1x TAE pufru a přivedeno k varu pro úplné rozpuštění. K rozpuštěnému agaru bylo přidáno 2,5 µl zásobního roztoku ethidium bromidu. Připravený gel se po nalití do formy na gel nechal ztuhnout s vloženým hřebínkem. Ztuhlý gel byl přenesen do vaničky s nalitým 1x TAE pufrem. Do jamek v gelu bylo napipetováno po 5 µl vzorku smíchaného se 3 µl barviva DNA loading dye. Současně bylo do jedné jamky napipetováno 2 µl markeru smíchaného se 3 µl barviva DNA loading dye. Bylo použito jednosměrné napětí o velikosti 4 V/cm².

9.8 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie se obvykle využívá pro měření chemických a fyzikálních vlastností eukaryotických buněk, lze ji však využít i v mikrobiologii, kde za pomoci fluorescenčního značení umožňuje rozlišit subpopulace buněk, například podle hladiny membránového potenciálu. Vzorek je analyzován na úrovni jednotlivých buněk, jež ze suspenze postupně procházejí celým systémem a jsou osvětleny laserovým paprskem. Membránový potenciál mezi 100-200 mV značí živé buňky s nepoškozenou cytoplazmatickou membránou. U mrtvých buněk je membránový potenciál nulový a přes porušenou membránu se dostávají ven z buňky anorganické ionty. Do buňky tak mohou vstupovat některá barviva nukleových kyselin. Do intaktní cytoplazmatické membrány se nedostanou, proto je s jejich pomocí možné detekovat porušení permeability membrány (Novo et al. 2000, Shapiro 2001).

Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BC CytoFLEX nacházejícím se v laboratoři cytometrie na PřF UK. Cytometr byl vybavený 4 lasery s 13 fluorescenčními detektory a dvěma druhy rozptylu světla (FSC a SSC).

9.8.1 Měření membránového potenciálu

Odběr vzorků na měření

Kultivace a odběr vzorků pro měření membránového potenciálu probíhal paralelně s odběry pro zjištění průběhu křivek hynutí stanovením CFU. Noční kultura byla do tekutého BHI média přeočkována do 4 Erlenmeyerovo baněk na OD_{600} 0,05 a kultivována na třepače do OD_{600} 0,5. Tento bod byl považován za čas t_0 a po odběru vzorků byla ke kulturám přidána jednotlivá antibiotika (ciprofloxacin, oxacilin, vankomycin).

Z každé kultury bylo odebráno 200 μ l, které se zcentrifugovaly při 8000 x g po dobu 5 minut. Po odebrání supernatantu byl pelet resuspendován ve 200 μ l PBS a byly přidány 4 μ l pracovního roztoku DiOC₂(3). Obarvené buňky byly na 15 minut vloženy do termostatu, aby mohlo barvivo do buněk difundovat. Vzorky byly tímto způsobem odebírány každou hodinu až do času t_4 a do doby měření byly uchovávány v ledu. Před samotným měřením byly vzorky přeneseny do plastové zkumavky a k nim byly přidány 2 μ l pracovního roztoku TO-PRO-3. Následně mohly být vzorky změřeny na průtokovém cytometru s vhodně nastavenými lasery.

Současně byly v čase t_0 odebrány kontrolní vzorky pro identifikaci jednotlivých subpopulací. Vzorek sloužící jako kontrola bakteriálních buněk byl po resuspendaci v PBS

ihned dán do ledu bez barvení. Druhý vzorek byl pro získání mrtvých buněk zahříván na 90 °C po dobu 10 minut a následně k němu byly přidány 4 µl DiOC₂(3). K třetímu vzorku byly přidány 2 µl zásobního roztoku CCCP pro zkratování membránového potenciálu a 4 µl DiOC₂(3) pro obarvení. Po obarvení byly vždy buňky ponechány po dobu 15 minut v termostatu. Takto odebrané vzorky byly následně analyzovány.

Měření

DiOC₂(3) bylo analyzováno za použití modrého laseru s excitační vlnovou délkou 488 nm. TO-PRO-3 bylo analyzováno červeným laserem s excitační vlnovou délkou 638 nm. Zelená fluorescence DiOC₂(3) (Dioc-green) byla detekována pomocí bandpass filtru 525/40 nm (APD gain 500), červená fluorescence DiOC₂(3) (Dioc-red) pomocí bandpass filtru 660/20 nm (APD gain 500) a červená fluorescence TO-PRO-3 pomocí bandpass filtru 660/20 nm (APD gain 376). Rychlost průtoku vzorků byla 11 µl za minutu. Ve vzorcích bylo zaznamenáno 10 000 událostí. Bakteriální buňky byly detekovány excitací modrého laseru s excitační vlnovou délkou 488 nm a detekovány pomocí bandpass filtru pro SSC 488/10 nm (APD gain 150). Pro kompenzaci měření bylo z kanálu Dioc-red odečteno 8 % intenzity Dioc-green a z Dioc-green 5 % intenzity Dioc-red.

9.8.2 Měření metabolické aktivity pomocí průtokové cytometrie

Odběr vzorků na měření

Příprava vzorků pro měření metabolické aktivity byla stejná jako u měření membránového potenciálu buněk s jediným rozdílem, kdy namísto DiOC₂(3) byl pro obarvení buněk používán C₁₂-resazurin v množství 2 µl pracovního roztoku.

Analýza C₁₂-resazurinu proběhla za použití excitace při 561 nm a bandpass filtru 585/42 (ADP gain 2265). U vzorků kultur s vloženým genem pro produkci zeleného fluorescenčního proteinu bylo GFP analyzováno modrým laserem s excitací při 488 nm a použitým bandpass filtrem 525/40 nm (APD gain 721). Pro kompenzaci měření bylo z červeného kanálu odečteno 6,3 % intenzity zeleného kanálu a ze zeleného odečteno 5 % intenzity červeného kanálu. Červená fluorescence TO-PRO-3 byla analyzována červeným laserem s excitační vlnovou délkou 638 nm pomocí bandpass filtru 660/20 nm (APD gain 2880).

9.9 *Kontinuální měření optické denzity*

K následujícím experimentům byl využit Microplate reader 800TS od firmy BioTek nacházející se v laboratoři buněčné signalizace v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, na němž byla kontinuálně měřena optická denzita po dobu 12 hodin při 34 °C a 200 RPM s intervalem měření 10 minut. Měření probíhalo v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Ke vzorkům byly přidávány jednotlivé sterilní supernatanty z nočních kultur předem stanovených izolátů, a to v poměru 1:9. Sterilní supernatanty byly připraveny vždy čerstvé ze stejné noční kultury, z jaké byly odebírány vzorky pro měření. Pro vyloučení vlivu nižšího množství živin v supernatantu byly vzorky měřeny v obohaceném BHI médiu. Všechna měření byla provedena v duplikátu až triplikátu, pokud není stanoveno jinak.

9.9.1 Měření růstové křivky

Noční kultura byla přeočkována na OD₆₀₀ 0,05 a kultivována na třepačce do OD₆₀₀ 0,5. Z kultury byly odebrány alikvoty (dále jako vzorky), které byly v obohaceném BHI médiu zředěny 1:10 a 1:100 a k nimž byly přidány jednotlivé sterilní supernatanty. Všechny vzorky byly v duplikátu po 200 µl nanесeny do 96 jamkové mikrotitrační destičky a měřeny ve spektrofotometru.

9.9.2 Měření vyrůstání z perzistence

Noční kultura byla přeočkována na OD₆₀₀ 0,05 a kultivována na třepačce do OD₆₀₀ 0,5. Ke kultuře byla přidána antibiotika ciprofloxacin nebo oxacilin a nechala se kultivovat přes noc. Druhý den byly odebrány vzorky o objemu 1 ml, z kterých byla následujícím způsobem odstraněna antibiotika. Odběry byly zcentrifugovány při 8000 x g po dobu 10 minut, odstranil se supernatant a pelet byl resuspendovaný ve stejném objemu BHI média. resuspendované vzorky byly zcentrifugovány při 8000 x g po dobu 5 minut, supernatant byl odejmut a pelet byl resuspendován ve 200 µl BHI média. Vzorky byly znovu zcentrifugovány při 8000 x g po dobu 5 minut a supernatant odstraněn. Pelet byl vždy resuspendován v obohaceném BHI médiu s přidáním příslušným sterilním supernatantem tak, aby celkový objem vzorku byl 1 ml. Ze vzorků bylo vytvořeno ředění 1:3, případně 1:1 a každé ředění bylo v duplikátu nebo triplikátu nanесeno po 200 µl do 96 jamkové mikrotitrační destičky a měřeno na spektrofotometru.

9.9.3 Měření hynutí během působení oxacilinu

Noční kultura byla přeočkována na OD₆₀₀ 0,05 a kultivována na třepačce do OD₆₀₀ 0,5. Z kultury byly odebrány vzorky o objemu 1 ml, které byly zcentrifugovány při 8000 x g po dobu 10 minut a pelety byly resuspendované v obohaceném BHI médiu s přidanými příslušnými sterilními supernatanty na finální objem 1 ml. Ke každému vzorku byl přidán oxacilin ve finální koncentraci 30 mg/l. Vzorky byly ve stejných médiích s oxacilinem zředěny v poměru 1:1 a 1:3. Všechny vzorky byly v triplicátu po 200 µl naneseny do 96 jamkové mikrotitrační destičky a měřeny ve spektrofotometru.

VÝSLEDKY

10.1 Stanovení MIC

Pro většinu použitých metod bylo při studiu vlivu antibiotik na bakteriální kulturu potřeba znát MIC izolátů, jenž byl ke kultivující se kultuře buněk přidáván ve stonásobku jeho hodnoty. MIC antibiotik musela být nejprve u všech využívaných izolátů stanovena. Pro kmeny 38A a 39A nebylo nutné MIC znát, protože tyto kmeny byly využívány pouze pro získání sterilního supernatantu a nebyla k nim při kultivaci přidávána antibiotika. Hodnoty MIC ostatních izolátů byly stanoveny metodou 9.4 a jsou vypsány v tabulce 2.

Tabulka 2: Hodnoty MIC použitých izolátů a množství přidávaných antibiotik na 10 ml BHI média.

	Ciprofloxacin (mg/l)	Přidané množství CIP (μl)	Oxacilin (mg/l)	Přidané množství OXA (μl)	Vankomycin (mg/l)	Přidané množství VAN (μl)
Pacientka 1						
68VI	0,25	10	0,125	2,5	4	80
69A	0,25	10	0,125	2,5	8	160
70A	0,25	10	0,125	2,5	4	80
86A	0,5	20	0,125	2,5	4	80
86B	0,5	20	0,125	2,5	4	80
Pacientka 2						
29A	0,5	20	0,3	6	2	40
57A	0,5	20	0,3	6	2	40
77A	0,5	20	0,3	6	2	40
77C	0,5	20	0,3	6	2	40

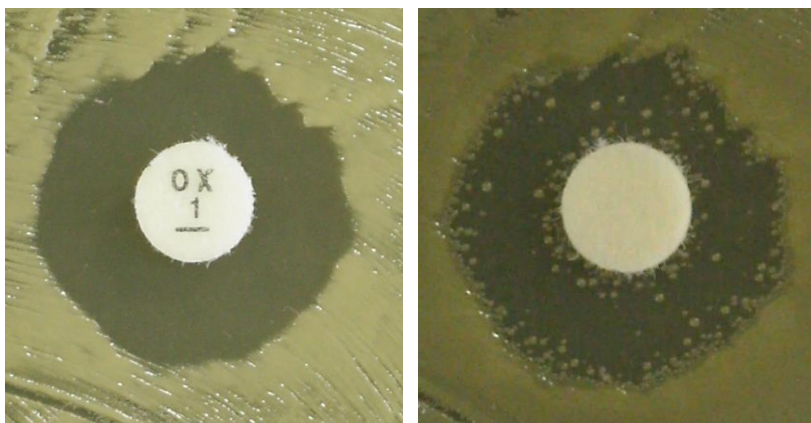
V závislosti na těchto hodnotách byla ke kultivujícím se kulturám přidána antibiotika v množství 100x MIC. Zásobní roztoky ciprofloxacinu o koncentraci 25 mg/ml, oxacilinu o koncentraci 50 mg/ml a vankomycinu o koncentraci 50 mg/ml byly přidávány do 10 ml BHI média v množství, které je rovněž uvedeno v tabulce 2.

10.2 TD test

Cíl: Pomocí TD testu porovnat schopnost izolátů přecházet do perzistentní formy

Princip TD testu spočívá ve výměně antibiotického disku na Petriho misce při diskové difúzní metodě za disk s glukózou (Gefen et al. 2017). Výměna disků probíhá po 24hodinové kultivaci s antibiotikem, kdy se kolem disku vytvoří inhibiční zóna, ve které buňky nejsou schopny růstu. Pokud v inhibiční zóně i přesto nějaké kolonie narostou, jedná se nejspíše o rezistentní buňky. Následná záměna za disk s glukózou umožní růst buňkám vyskytujícím se v oblasti inhibiční zóny, které účinky antibiotika přežily. Tyto buňky se zřejmě v přítomnosti antibiotika nacházely ve stavu s utlumeným metabolismem. Po snížení koncentrace antibiotika v zóně difuzí do agarů a po obnovení živin přidáním glukózy se opět dostaly do metabolicky aktivního stavu. Kolonie narostlé v inhibiční zóně jsou proto považovány za perzistery. TD testy byly provedeny podle postupu uvedeného v kapitole 9.5 a využity byly antibiotické disky s oxacilinem (1 µg), vankomycinem (5 µg) a ciprofloxacinem ve dvou koncentracích (1 a 10 µg).

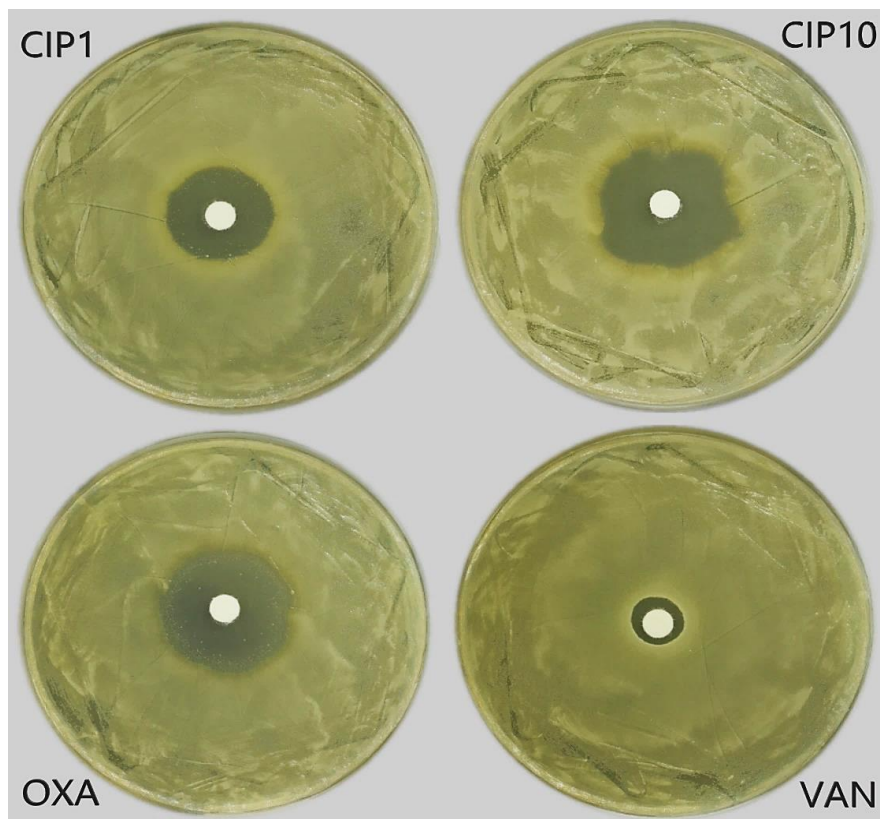
Na obrázku 9 je příklad TD testu u izolátu 29A, kde je vidět inhibiční zóna po 24hodinové kultivaci s oxacilinovým diskem (vlevo) a narostlé perzistentní buňky po výměně disku za disk bez antibiotika s přidanou glukózou po kultivaci dalších 24 hodin (vpravo).



Obrázek 9: Inhibiční zóna u TD testu izolátu 29A. Vlevo inhibiční zóna po použití disku s oxacilinem a vpravo nárůst kolonií po nahrazení antibiotického disku diskem s glukózou.

Pro využití TD testů ke srovnání izolátů bylo potřeba zvolit disky s takovou koncentrací antibiotik, která po nahrazení diskem s glukózou a po difundování do celého objemu agarů poklesne pod hladinu MIC. Na testovaných izolátech byly použity čtyři zmíněné typy antibiotických disků a výsledky sloužily pro posouzení vhodnosti metody pro jednotlivá

antibiotika. Obrázek 10 zobrazuje příklad TD testů izolátu 69A, na kterých je vidět rozdíl ve velikosti inhibičních zón mezi použitými disky s antibiotiky. Vankomycin je komplexní molekula hůře difundující médiem, z toho důvodu vankomycinové disky vedly u všech izolátů k nejmenší inhibiční zóně, a to i přes vysokou koncentraci antibiotika. Kolonií perzistentních buněk v zóně narostlo jen velmi málo, příčinou bylo pravděpodobně nedostatečné snížení koncentrace antibiotika po nahrazení glukózovým diskem. Vankomycin se z těchto důvodů nejvíce hodí k určení schopnosti izolátů perzistovat. U disku s vyšším množstvím ciprofloxacinu (10 μg) byla inhibiční zóna největší, avšak kvůli příliš vysoké koncentraci antibiotikum přetrvávalo v zóně i po nahrazení disku glukózou a nenarostly zde žádné nebo téměř žádné kolonie. Nižší koncentrace ciprofloxacinu (1 μg) a oxacilin vedly k vytvoření dostatečně velké inhibiční zóny, kde narostlo více kolonií perzistentních buněk, jejichž množství lze mezi izoláty srovnávat. Po použití antibiotického disku s ciprofloxacinem (1 μg) rostla většina kolonií na okraji inhibiční zóny. Tyto kolonie by mohly představovat spíše tolerantní buňky nežli perzistery (Kotková et al. 2019), proto byl k porovnání izolátů zvolen antibiotický disk s oxacilinem.



Obrázek 10: Petriho misky s TD testy u izolátu 69A po nahrazení antibiotických disků novými disky s glukózou a kultivaci 24 hodin. Nahore jsou vidět inhibiční zóny po použití disků s ciprofloxacinem - vlevo v množství 1 μg (CIP1), vpravo 10 μg (CIP10). Na misce vlevo dole byl použit disk s oxacilinem (OXA) a vpravo dole s vankomycinem (VAN).

Gefen a spol., autoři původní publikace, kteří přišli s principem TD testu, navrhli způsob jeho vyhodnocení rozdělením do 4 skupin (0-3) podle množství narostlých kolonií v inhibiční zóně (Gefen et al. 2017). Hranice skupin byly následující:

0 = bez perzisterů

1 = 1-10 perzisterů

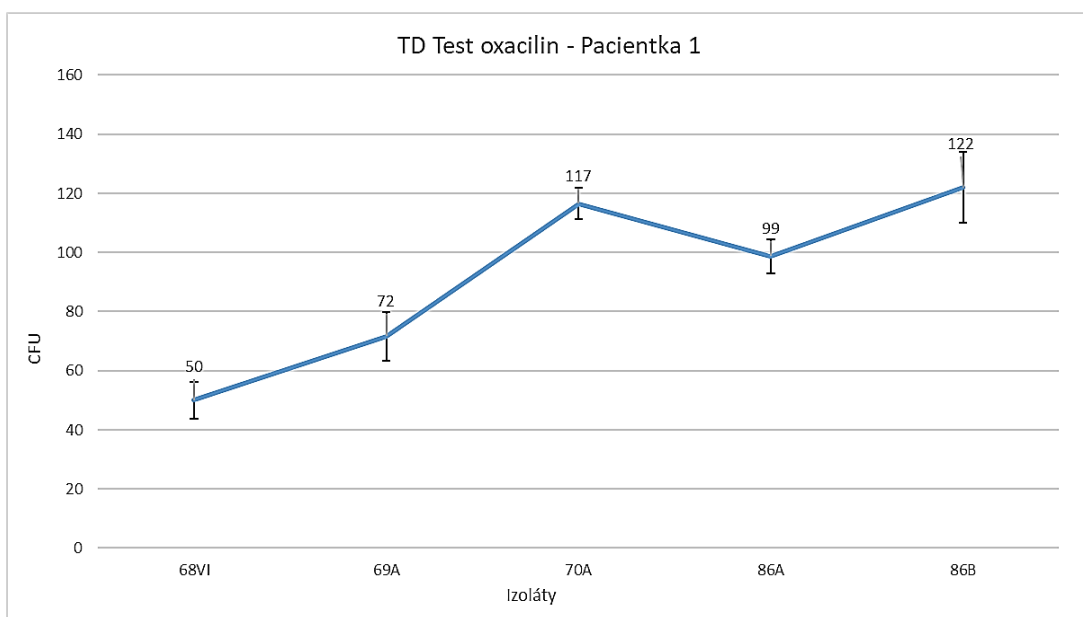
2 = 11-100 perzisterů

3 = více než 100 perzisterů

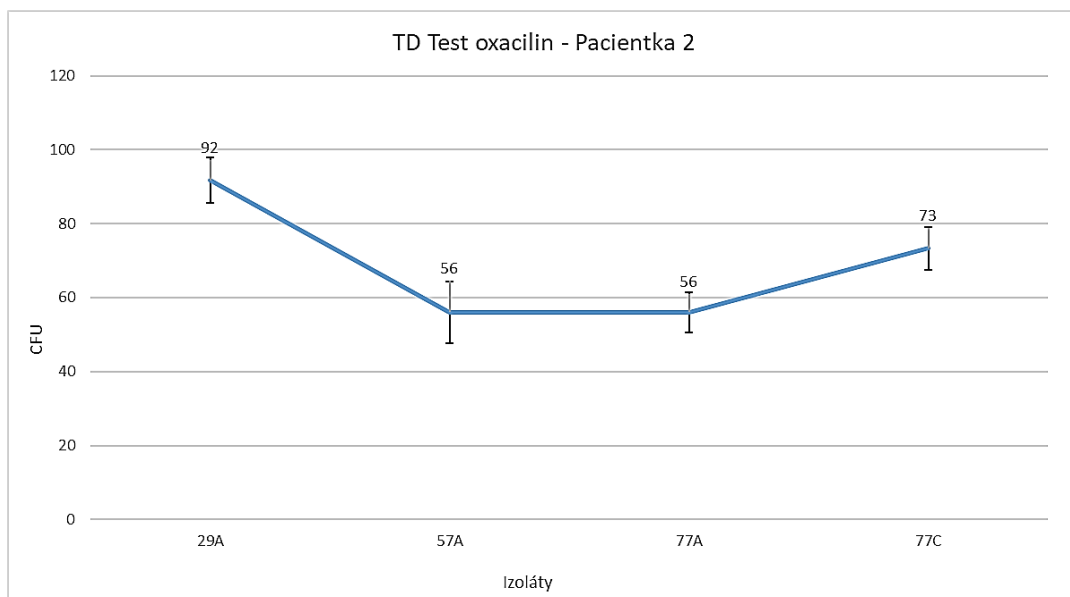
Toto rozdělení však nebylo vypovídající pro srovnání množství perzisterů u jednotlivých izolátů. Ačkoliv se lišilo rozdělení do skupin mezi použitými antibiotiky, v rámci jednotlivých izolátů byly výsledky vyhodnocené tímto schématem téměř vždy totožné. U 10 μ g ciprofloxacinu a u vankomycinu byl velmi nízký nárůst řadící se do skupin 0 a 1, zatímco oxacilin a 1 μ g ciprofloxacin vedly k vysokému nárůstu kolonií a řadily se do skupiny 2 a 3. U ciprofloxacinu (1 μ g) a oxacilinu byl znatelný rozdíl především u první pacientky mezi izoláty 68VI, 69A s nižším počtem a 70A, 86A, 86B s vyšším počtem narostlých kolonií perzisterů, přestože MIC izolátů bylo stejné. U izolátů druhé pacientky nebyl v počtech kolonií výrazný rozdíl.

Experiment byl opakován s oxacilinovými disky a byl proveden u všech testovaných izolátů v technickém triplikátu. Pro umožnění komparace se přistoupilo ke kvantitativnímu zpracování výsledků stanovením počtu narostlých kolonií v inhibiční zóně a rozdíly v množství kolonií byly srovnávány mezi izoláty. Průměry spočítaných narostlých kolonií (perzisterů) izolátů první a druhé pacientky po použití oxacilinového disku jsou znázorněny v grafech 1 a 2.

TD test v tomto případě potvrdil stejný trend, kdy množství perzisterů po použití oxacilinového disku u izolátů první pacientky chronologicky stoupalo. Nejvíce perzisterů se objevovalo u izolátů 70A, 86A a 86B. U druhé pacientky nejvíce kolonií narostlo u primoizolátu 29A, avšak společně s výsledky prvního TD testu počty perzistentních buněk ukazují na nezměněnou schopnost populace buněk perzistovat v průběhu chronické infekce.



Graf 1: Počty kolonií izolátů od pacientky 1 narostlých v inhibiční zóně po nahrazení antibiotického disku s oxacilinem diskem s glukózou po 24hodinové kultivaci. Hodnoty jsou průměrem ze tří technických replikátů a chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky.



Graf 2: Počty kolonií izolátů od pacientky 2 narostlých v inhibiční zóně po nahrazení antibiotického disku s oxacilinem diskem s glukózou po 24hodinové kultivaci. Hodnoty jsou průměrem ze tří technických replikátů a chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky.

10.3 Křivky hynutí

Cíl: Monitorováním průběhu křivek hynutí po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu metodou stanovení CFU určit míru perzistence jednotlivých izolátů

Perzistentní populace buněk je charakteristická svou bifázickou křivkou hynutí, kdy v první fázi velikost populace prudce klesá a ve druhé fázi se počet přeživších buněk ustálí a jejich počet se výrazně nemění. Díky typickému průběhu je možné porovnat schopnost izolátů přecházet do perzistentního stavu.

Průběh křivek hynutí stanovením CFU byl zjišťován u všech izolátů pacientek 1 a 2 s výjimkou izolátu 77C, a to po použití antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu. Izolát 77C nebyl pro stanovení průběhu křivek hynutí využit, jelikož neměl výrazně změněný genotyp oproti izolátu 77A. Antibiotika byla přidána k buňkám v exponenciální fázi růstu. V čase t_0 byly vzorky odebrané těsně před přidáním antibiotik a následně byly odebírány v hodinovém intervalu po dobu čtyř, případně šesti hodin. Z každého odběru byla centrifugací antibiotika odstraněna a byly vytvořeny ředící řady o čtyřech ředěních (10^{-1} - 10^{-4}). Vzorky byly odebrány a zpracovány podle metody 9.6.1. Jednotlivá ředění byla podle předem vytvořené předlohy postupně vyseta pomocí kapkového výsevu na Petriho misky s BHI médiem. Současné výsevy probíhaly na Petriho misky s BHI médiem s přidanými 200 μ l sterilního supernatantu z noční kultury, jelikož na těchto miskách buňky vyrůstaly rychleji a mikrokolonie se tvořily ve větším počtu spotů, jak bylo pozorováno již dříve u předchozích izolátů (Balgová 2021). Na obrázku 11 je příklad takto vysetých kolonií od izolátu 29A, včetně legendy (vpravo) vysvětlující polohu vysetých vzorků. Pro lepší přehlednost je zobrazena pouze první miska značená jako „Spoty I“, ačkoliv celkem byly vzorky ze všech časů a ředění nanесeny na 3 Petriho misky. Vlevo je fotografie Petriho misky s BHI médiem s přidanými 200 μ l sterilního supernatantu z vlastní noční kultury. Uprostřed je ukázané snížené vyrůstání buněk na Petriho miskách s BHI médiem bez přidaného supernatantu. Narostlé mikrokolonie jsou považovány za kolonie vzniklé z buněk přecházejících z perzistence do svého metabolicky aktivního stavu.



Obrázek 11: Petriho misky s narostlými mikrokoloniemi izolátu 29A. Agarová miska na levé straně obsahuje navíc 200 μ l sterilního supernatantu z noční kultury 29A. Petriho miska uprostřed nemá přidáný supernatant a lze vidět snížený nárůst kolonií. Petriho miska na pravé straně slouží pro orientaci mezi vzorky kapkového výsevu. Misky byly vyfoceny dnem vzhůru.

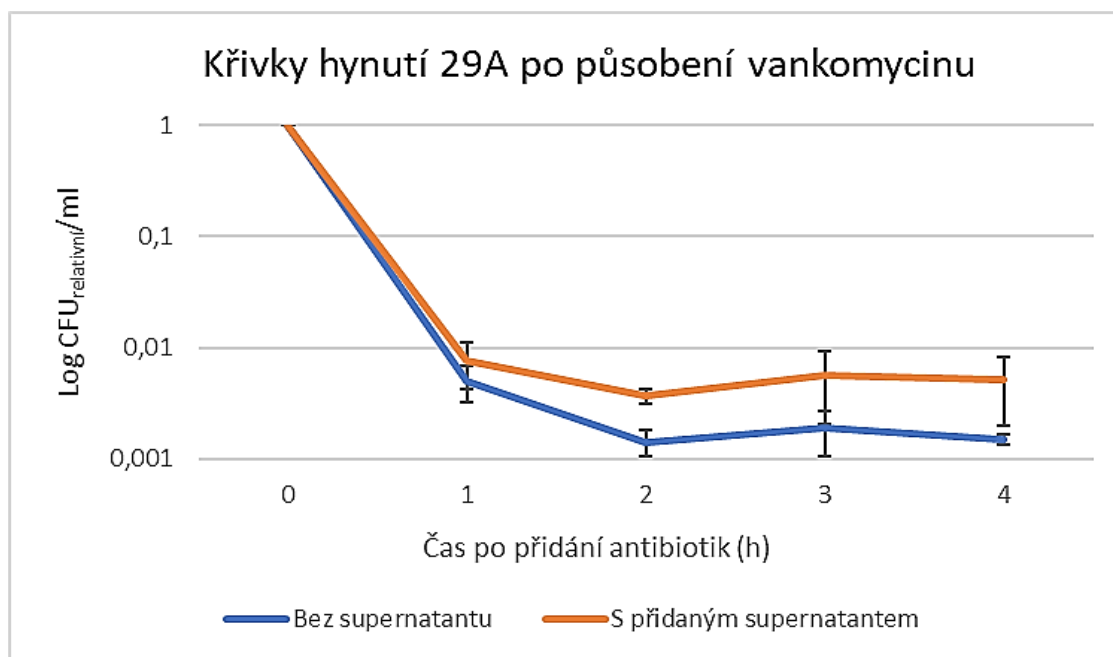
Po 24hodinové kultivaci v termostatu byl téměř u všech izolátů patrný rozdíl v počtu narostlých kolonií na Petriho miskách s přidáním sterilním supernatantem z noční kultury a bez něho. U většiny izolátů na miskách bez přidání supernatantu vyrůstaly kolonie pouze z méně ředěných vzorků (10^{-1}), a proto byly tyto misky ponechány v termostatu po 48 hodin. Po této době většinou narostly viditelné kolonie i z více zředěné kultury a kultivace delší než 48 hodin již nepřispívala k vyššímu nárůstu. U izolátů 70A, 86A a 86B ani po prodloužené kultivaci na těchto miskách nerostly žádné kolonie z vyšších ředění (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), zatímco na miskách se supernatantem se objevoval vyšší počet kolonií již po 24 hodinách kultivace.

Ačkoliv byly vzorky zředěné dekadickou řadou, ne vždy tomu počet narostlých kolonií mezi jednotlivými postupně ředěnými výsevy odpovídal. Docházelo k falešně negativním výsledkům pravděpodobně z důvodu mechanismu Quorum sensing, kdy v nižší hustotě buněk ve spotu nedojde k tvorbě dostatečně silného signálu pro přechod do aktivního stavu. Spolu s kapkovými výsevy byly pro eliminaci vlivu Quorum sensing současně kultury z vybraných ředění vysety na celou misku.

Z výsledného počtu kolonií (CFU/ml) vybraných ředění bylo stanoveno relativní CFU vztahem počtu kolonií z každého času (t_n) k počtu kolonií v čase t_0 podle vzorce:

$$CFU_{relativní} = \frac{CFU_{t_n}}{CFU_{t_0}}$$

Z takto vypočítaných relativních CFU/ml byl v semilogaritickém vynesení stanoven průběh křivek hynutí. Na grafu 3 jsou ukázány příklady křivek hynutí izolátu 29A po působení vankomycinu.



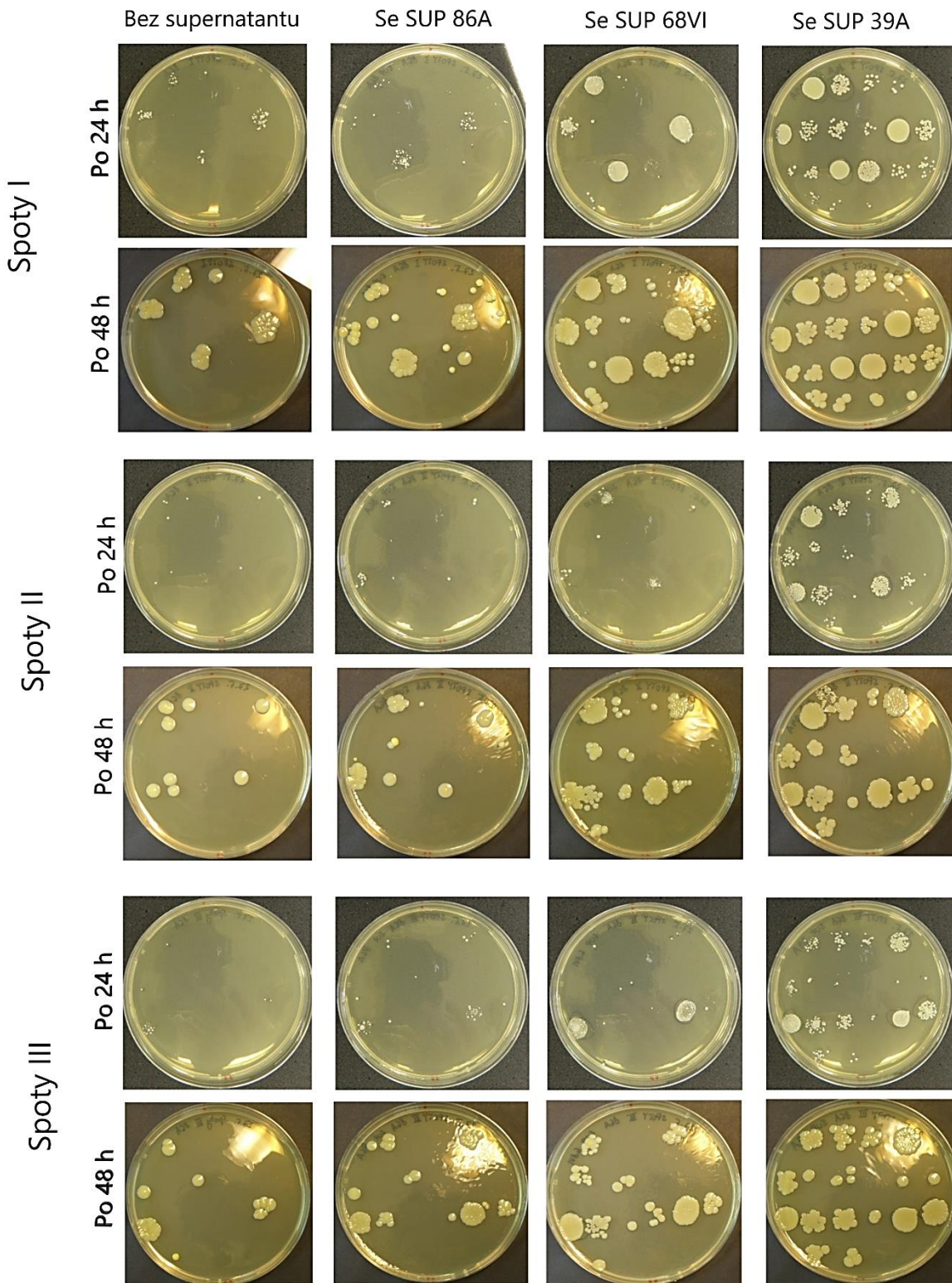
Graf 3: Křivka hynutí u izolátu 29A po kultivaci s vankomycinem. V grafu jsou srovnány křivky hynutí u výsevu na Petriho misky s přidanými 200 μ l sterilního supernatantu z noční kultury 29A a bez přidaného supernatantu. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky dvou biologických replikátů.

Nezávisle na délce kultivace se v některých případech množství narostlých kolonií lišilo o 1-2 řády oproti nárůstu na miskách s přidaným sterilním supernatantem. Největší rozdíly se projevovaly u izolátů 70A, 86A a 86B. Pro vyloučení vlivu stáří nalitého BHI média v Petriho miskách, jenž by mohlo svou nedostatečnou vlhkostí působit nepříznivě na růst buněk, byly u izolátu 70A použity Petriho misky s BHI médiem starším než dva týdny a současně byly vysety spoty i na misky s tímž médiem s rozetřenými 200 μ l tekutého BHI média a na misky s přidanými 200 μ l vlastního sterilního supernatantu. Na vyschlém BHI médiu bez úprav nevyrostly kolonie z žádného ředění v žádném čase výsevu. Na miskách po přidání tekutého BHI média před samotným výsevem již několik jednotek kolonií narostlo, ovšem z tohoto množství nebylo možné sestavit průběh křivek hynutí. Po přidání vlastního supernatantu byl vyšší nárůst kolonií téměř ve všech spotech, dostatečný ke stanovení průběhu křivek hynutí. Z těchto výsledků lze usuzovat, že vlhkost média v Petriho misce sice ovlivňuje vyrůstání z perzistence, nicméně nízká vlhkost není hlavní příčinou zhoršeného vyrůstání. Supernatant u některých izolátů viditelně zvyšoval schopnost vyrůstat z perzistence, důvod tohoto efektu však není objasněn. Bylo předpokládáno, že by vliv mohly mít molekuly AIP obsažené v supernatantu, které by mechanismem Quorum sensing stimulovaly přechod buněk do aktivního stavu. Pokud se výsledný nárůst kolonií na miskách lišil, byly pro sestavení průběhu křivek hynutí použity výsledky s přidaným supernatantem, kdy počty narostlých kolonií v jednotlivých spotech odpovídaly postupnému zředění kultury.

U izolátů 77A a 86A byly otestovány variace různých sterilních supernatantů včetně supernatantu z noční kultury 38A s nefunkčním Agr systémem, případně supernatantu 39A s odlišným Agr typem. Studované izoláty byly všechny Agr typu I, zatímco izolát 39A byl typu II a měl by Agr systém inhibovat. Všechny přidané supernatanty měly na vyrůstání pozitivní vliv bez větších rozdílů, což by mohlo značit, že důvodem lepšího vyrůstání po přidání supernatantu pravděpodobně nejsou molekuly AIP, jak se původně předpokládalo.

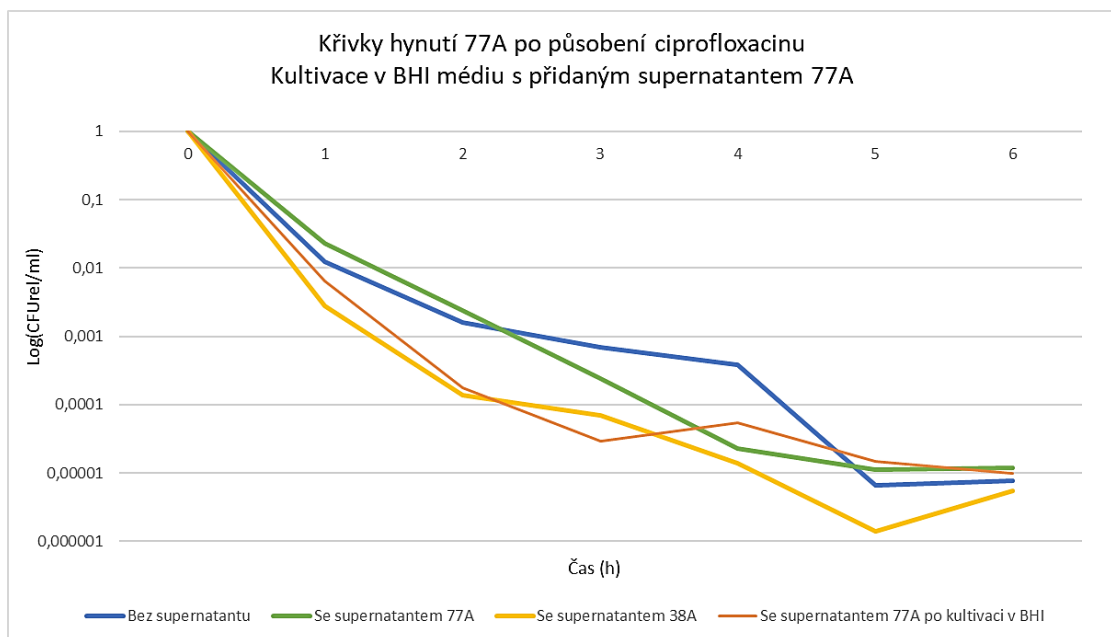
V případě izolátu 86A vlastní supernatant téměř neovlivňoval růst buněk, avšak supernatant z izolátu 39A a mírně také 68VI způsobovaly vyšší vyrůstání. Výsledný nárůst na všech miskách po 24 a po 48 hodinách je vidět na obrázku 12. Supernatant 39A nejvíce usnadnil buňkám přejít z perzistence do aktivního stavu. Supernatant 68VI měl na vyrůstání rovněž pozitivní vliv, ačkoliv ve vyšších ředěních docházelo k viditelnému nárůstu až po 48 hodinách kultivace v termostatu. Na Petriho miskách s vlastním supernatantem nebyl znatelný rozdíl oproti miskám s pouhým BHI médiem.

IZOLÁT 86A



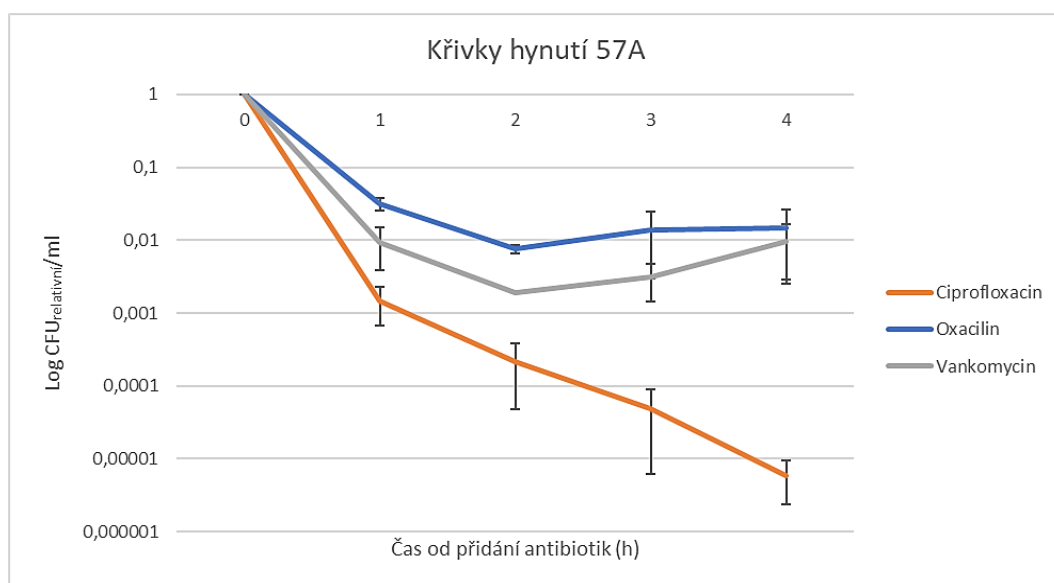
Obrázek 12: Rozdíl v nárůstu kolonií mezi Petriho miskami s přidávanými supernatanty z různých izolátů. První sloupec zobrazuje Petriho misky s BHI médiem bez supernatantu. Na misky ve druhém sloupci byl před kapkovým výsevem rozetřen vlastní supernatant, ve třetím sloupci supernatant izolátu 68VI a v posledním sloupci izolátu 39A. Vzorky byly vysety vždy na tři misky, označené jako Spoty I, II a III. Spoty I zahrnují 4 ředění kontroly, dále po 4 ředěních z kultur po působení ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu. Na dalších miskách jsou výsevy kultur po působení antibiotik ve stejném pořadí vždy po 3 ředěních, již bez kontroly. Poslední 2 řádky na spotech 3 jsou opět výsevy kultur po působení antibiotik ve 4 ředěních. Horní fotografie vždy zobrazuje nárůst po 24hodinové kultivaci v termostatu při 34°C, dolní fotografie po celkem 48hodinové kultivaci.

U izolátu 77A byl dále proveden pokus s přidáním sterilního supernatantu do BHI média již při samotné kultivaci. Přidán byl vlastní supernatant 77A. Následný výsev proběhl na Petriho misky s nanesenými supernatantem z vlastní noční kultury, supernatantem 38A a na misky bez supernatantu. Kultivace se supernatantem na schopnost vyrůstat z perzistence neprokázala výrazný vliv. Graf 4 zobrazuje průběh křivek hynutí izolátu 77A po působení ciprofloxacinu s přidáním vlastním supernatantem během kultivace, a to po výsevu na Petriho misky s BHI médiem a na misky s tímtož médiem s přidáním supernatantem 77A nebo 38A. Pro možnost srovnání je zde uveden také průběh křivky hynutí 77A z předchozího experimentu, během kterého byly buňky kultivovány běžným způsobem bez přidání supernatantu do BHI média. Mezi výsevy na jednotlivé typy misek byly slabé rozdíly, které však v posledních dvou hodinách vymizely. Srovnání s předchozím experimentem značí, že mírné rozdíly ve vyrůstání neprokazují vliv supernatantu přidaného k buňkám již do kultivačního BHI média.

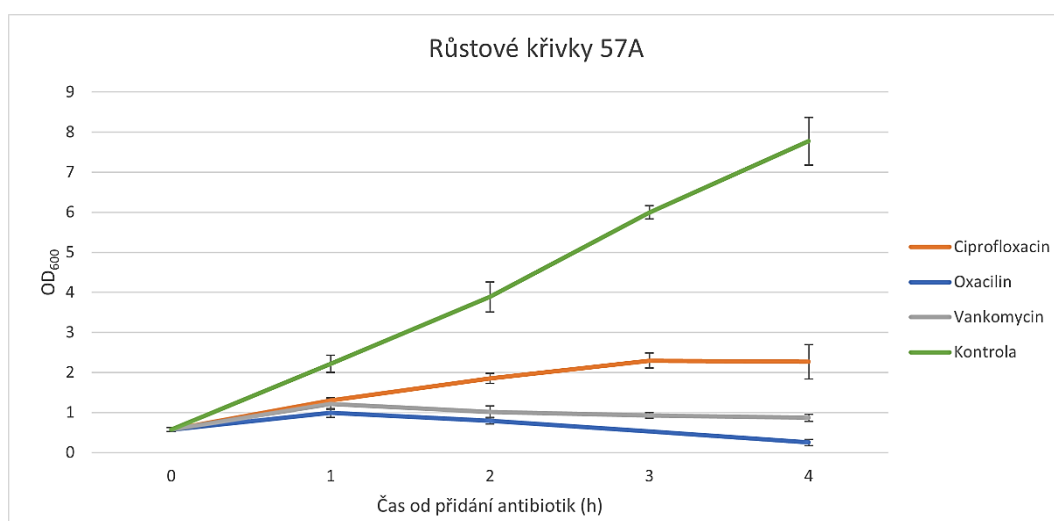


Graf 4: Křivky hynutí izolátu 77A při kultivaci s ciprofloxacinem, kdy do média během kultivace byl současně přidán sterilní supernatant připravený z vlastní noční kultury. Vzorky byly odebírané v hodinovém intervalu a vyšetřeny na pevné BHI médium s přidáním supernatantem 77A, 38A a na misky bez supernatantu. Pro srovnání je zobrazena také křivka hynutí 77A z předchozího měření (značeno oranžově), kde byla kultura kultivována v BHI bez přidaného supernatantu a posléze vyšetřena na Petriho misku se supernatantem z vlastní noční kultury.

At' byl supernatant na Petriho misky přidán či nikoliv, vždy narostlo nejméně kolonií ze vzorků bakteriální kultury, ke které byl přidán ciprofloxacín. Srovnání průběhu křivek hynutí po přidání antibiotik ciprofloxacínu, oxacilinu a vankomycinu je na příkladu izolátu 57A vyobrazeno na grafu 5. Současné měření optické denzity v čase odebrání vzorků ukázalo, že po působení ciprofloxacínu zůstává v kultuře ze všech použitých antibiotik nejvíce živých buněk, což neodpovídá výsledkům průběhu křivek hynutí stanovením CFU. Naměřená optická denzita byla u všech izolátů obdobná. Rozdíly v naměřené optické denzitě u izolátu 57A po působení antibiotik ciprofloxacínu, oxacilinu a vankomycinu a bez použití antibiotik lze vidět na grafu 6.



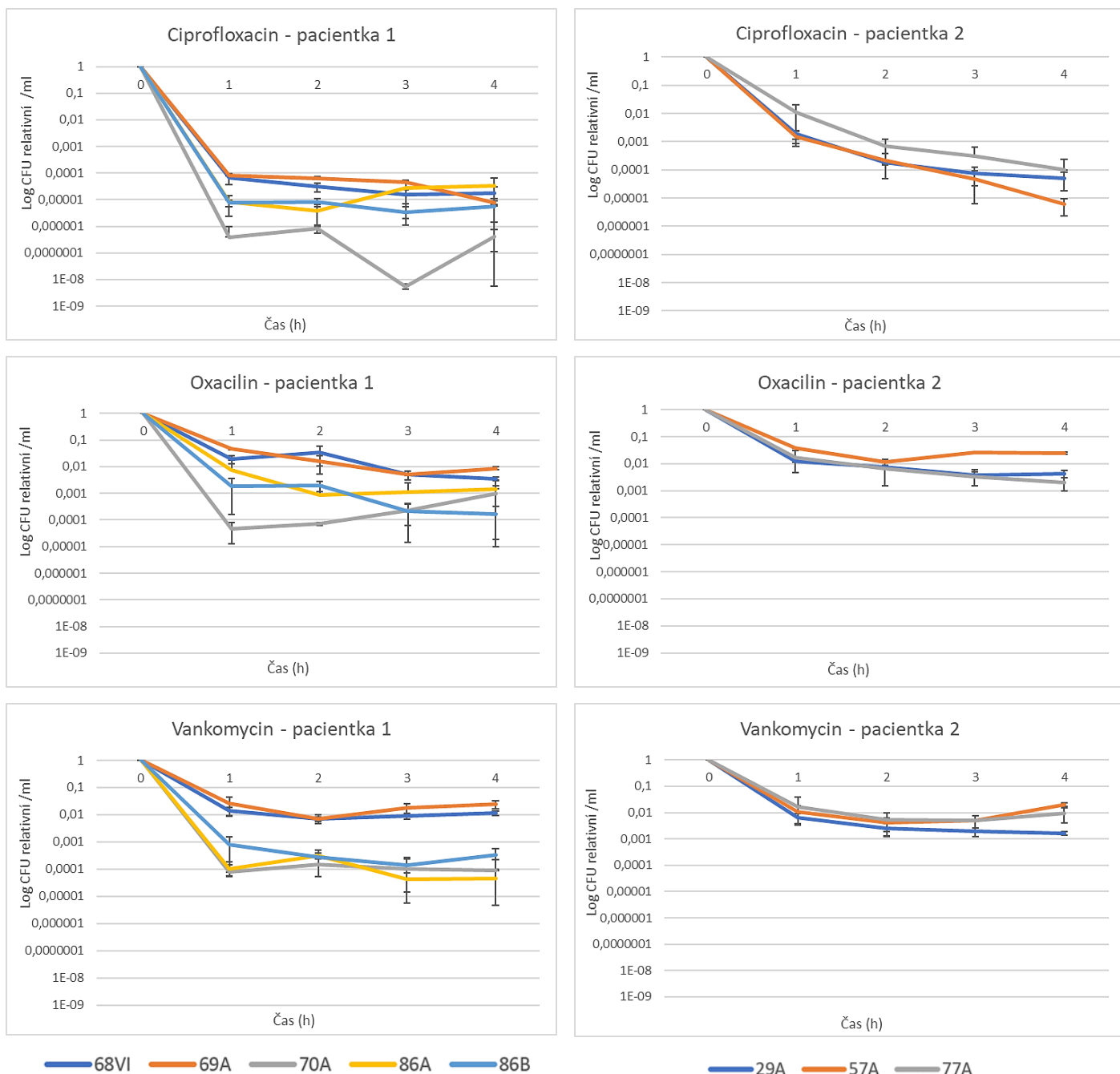
Graf 5: Křivky hynutí izolátu 57A po působení ciprofloxacínu, oxacilinu a vankomycinu. Chybové úsečky jsou směrodatnými odchylkami ze dvou biologických replikátů.



Graf 6: Růstové křivky izolátu 57A dané naměřenou optickou denzitou v celkem 5 hodinových intervalech. Zeleně je značena křivka kontrolního vzorku bez přidání antibiotika. K ostatním vzorkům byly přidány antibiotika ciprofloxacín, oxacilin a vankomycin. Chybové úsečky jsou směrodatnými odchylkami ze dvou biologických replikátů.

Na obrázku 13 jsou grafy s křivkami hynutí izolátů od obou pacientek a pro všechny tři typy antibiotik. U pacientky 1 je po použití ciprofloxacinu a oxacilinu pozorovatelný nižší nárůst u izolátu 70A a v menší míře také 86A a 86B. Po přidání vankomycinu je snižena schopnost vyrůstat z perzistence u všech tří izolátů. Izoláty od pacientky 2 mezi sebou ve schopnosti vyrůstat nejeví rozdíly.

Křivky hynutí

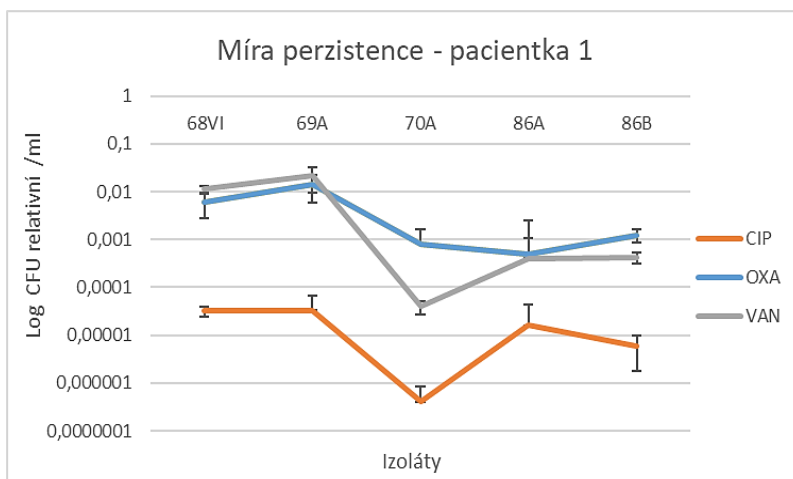


Obrázek 13: Křivky hynutí od izolátů obou pacientek po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu. Legenda izolátů je uvedena pod každým sloupcem zvlášť. Pokud byl zaznamenán vliv působení supernatantu, byly zvoleny hodnoty se supernatantem z vlastní noční kultury. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky z průměrných hodnot provedených měření.

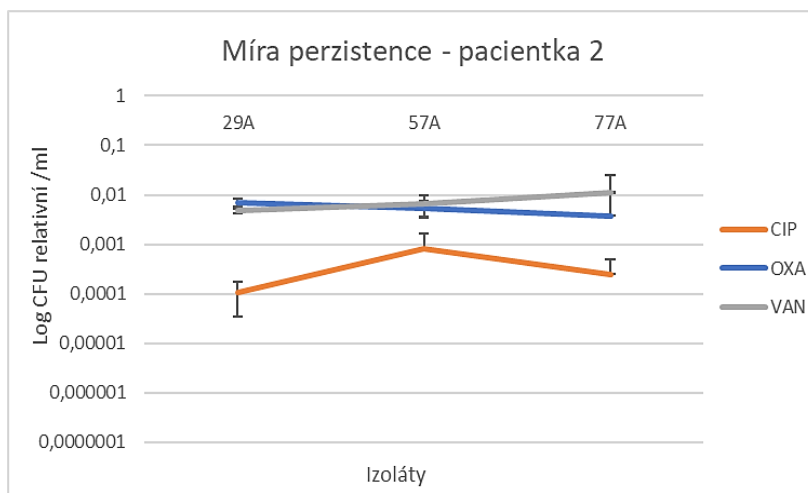
10.3.1 Míra perzistence

Od druhé hodiny byla většina citlivých buněk usmrcena a počet přeživších buněk se již příliš neměnil. Z průměru hodnot relativních CFU z posledních tří hodin odběru bylo možné stanovit míru perzistence a porovnat, jak se schopnost perzistovat u kmenů *S. aureus* mění mezi postupně odebíranými klinickými izoláty.

Míra perzistence testovaných izolátů obou pacientek je znázorněna na grafech 7 a 8, kde je rovněž možné pozorovat výrazně nižší schopnost vyrůstat z perzistence po použití ciprofloxacinu. U první pacientky byla míra perzistence snížena pro všechna antibiotika u izolátů 70A, 86A a 86B. Větší rozdíl mezi těmito izoláty nastal u izolátu 70A po použití ciprofloxacinu a vankomycinu. U oxacilinu byly rozdíly mezi izoláty 70A, 86A a 86B nevýznamné. Izoláty druhé pacientky mají pro všechna antibiotika míru perzistence beze změn.



Graf 7: Srovnání míry perzistence po působení ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu u izolátů 68VI, 69A, 70A, 86A a 86B pacientky 1. Míra perzistence je stanovena průměrem ze tří posledních hodin stanovených křivek hynutí. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky průměru hodnot provedených měření.



Graf 8: Srovnání míry perzistence po působení ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu u izolátů pacientky 2. Míra perzistence je stanovena průměrem ze tří posledních hodin stanovených křivek hynutí. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky průměru hodnot provedených měření.

10.4 Průtoková cytometrie

Odebírání vzorků pro měření metabolických aktivit na průtokovém cytometru probíhalo současně s experimentem pro stanovení CFU v průběhu křivek hynutí. Pro správné odlišení subpopulací buněk bylo nutné vytvořit kontrolní vzorky, tj. změřit buňky bez obarvení pro stanovení populace všech buněk, změřit vzorek po usmrcení buněk vysokou teplotou a po přidání CCCP pro stanovení buněk se sníženým membránovým potenciálem. CCCP zkratuje membránový potenciál, ale zachová intaktní membránu. Pro rozlišení subpopulace obsahující GFP byl změřen neobarvený vzorek buněk bez vloženého plazmidu. Výsledky měření na průtokovém cytometru BC Cytoflex byly zpracovány v programech Cytexpert a FlowJo. Naměřené vzorky byly v programu Cytexpert vyneseny v FSC/SSC. Subpopulace buněk byly následně podle kontrolních vzorků barevně rozlišeny pro snadnější zpracování a z výsledných dat byly v obou programech vyloučeny změřené nebuněčné zbytky, části membrán a proteinů. Program FlowJo umožnil vynesení subpopulací v procentuálním zastoupení.

10.4.1 Detekce buněk se sníženým membránovým potenciálem

Cíl: Porovnat u izolátů podíl buněk se sníženým membránovým potenciálem po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu

Pro sledování změny membránového potenciálu po působení antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu byly k obarvení buněk použity cyaninové fluorescenční barvy TO-PRO-3 a DiOC₂(3).

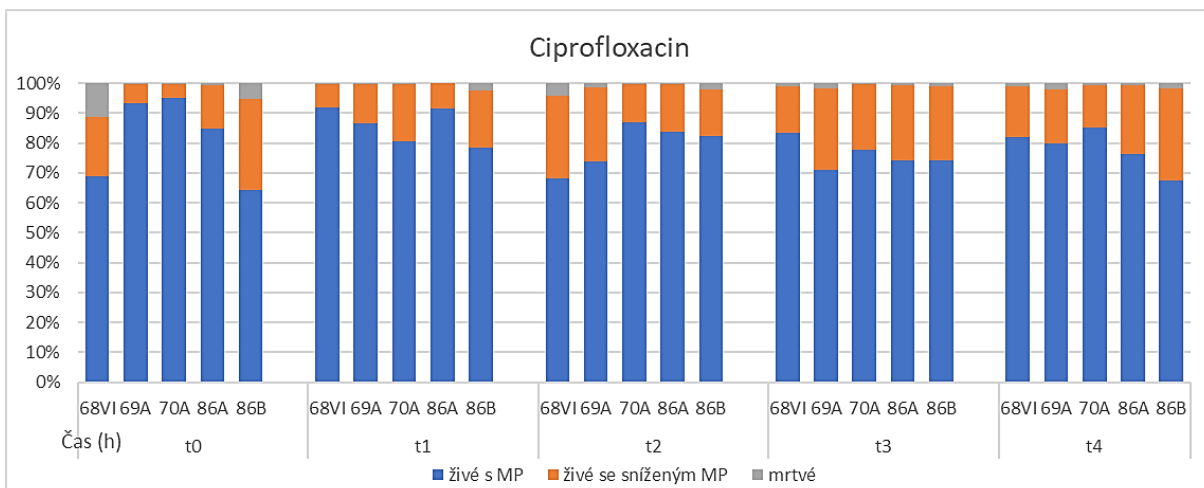
TO-PRO-3 je cyaninové barvivo schopné vstupovat pouze do buněk s porušenou membránou, kde se váže na DNA. Jeho detekcí je možné určit podíl mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou. DiOC₂(3) je zelené fluorescenční barvivo, které se shlukuje na hyperpolarizovaných membránách, dochází k posunu spektra a u buněk s vyšším membránovým potenciálem vyzařuje červenou fluorescenci. Pro analýzu jednotlivých subpopulací byl vynesěn poměr zelené a červené fluorescence DiOC₂(3) na ose x a TO-PRO-3 na ose y. Po zpracování výsledků bylo možné porovnat velikost tří subpopulací, a to živé buňky s intaktní membránou a se zachovaným membránovým potenciálem, živé buňky s intaktní membránou se sníženým membránovým potenciálem a mrtvé buňky s porušenou membránou, které zcela ztratily polarizaci membrány. Měření membránového potenciálu a integrity buněčné membrány byly provedeny v jednom technickém provedení na všech izolátech obou pacientek mimo izolát 77C. Výsledky jsou zobrazené na grafech 9 až 14. Všechna měření byla provedena

v jednom biologickém provedení. Velikosti subpopulací buněk byly závislé spíše na účinku jednotlivých typů antibiotik. Vzhledem k velmi podobným výsledkům po působení antibiotik na jednotlivé izoláty nebylo nezbytné experimenty opakovat.

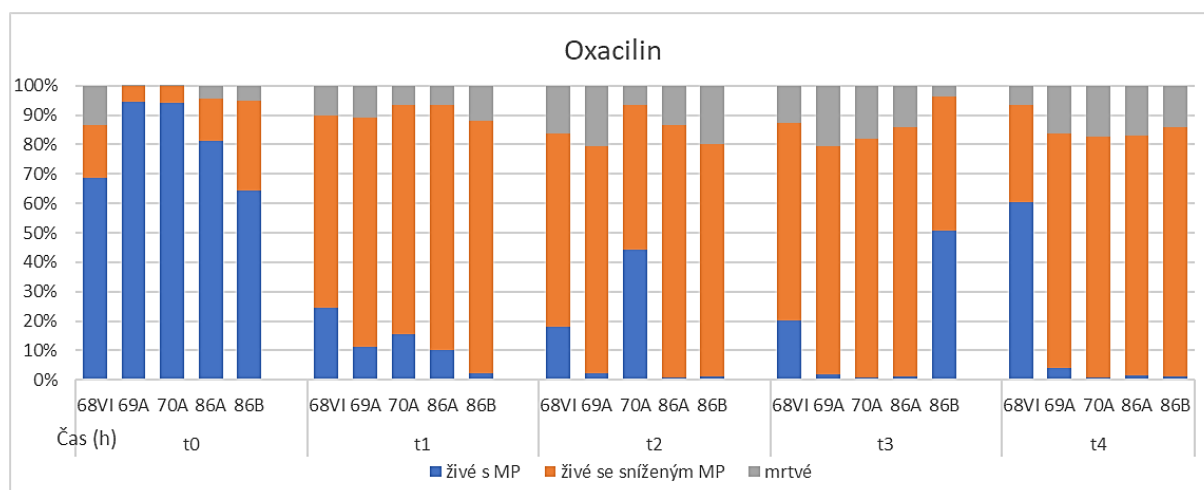
Po použití ciprofloxacinu přetrvával vysoký poměr živých buněk se zachovalým membránovým potenciálem po celé 4 hodiny působení antibiotika. U žádného izolátu pacientky 1 nedocházelo k viditelné změně v populaci v průběhu působení antibiotika, zatímco u pacientky 2 ciprofloxacin vedl u všech izolátů ke stejnému výsledku, a to k postupnému snižování membránového potenciálu v čase.

U oxacilinu i vankomycinu došlo hned v první hodině po přidání antibiotika ke snížení membránového potenciálu u většiny buněk a velikost této subpopulace přetrvávala po celé 4 hodiny. Po přidání oxacilinu byl u některých izolátů naměřen vyšší membránový potenciál i od druhé hodiny dál, avšak u žádného z izolátů nenastala změna u dvou po sobě jdoucích časech, proto se pravděpodobně jednalo spíše o chybu ve zpracování vzorku. Po oxacilinu byly naměřeny nejvyšší subpopulace se sníženým potenciálem u izolátů 70A, 86A a 86B. U většiny přeživších buněk byl detekován snížený membránový potenciál, tudíž by se mohlo jednat o perzistery.

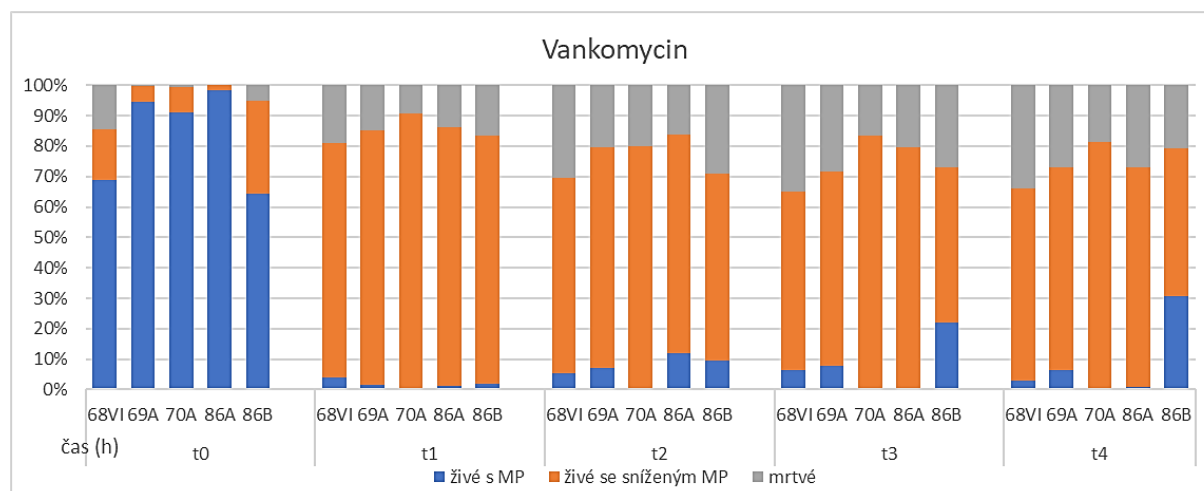
Ihned po přidání vankomycinu rovněž klesl membránový potenciál u většiny buněk a během dalších hodin se velikost subpopulace se sníženým potenciálem již příliš neměnila. U izolátu 70A zůstalo buněk se zachovaným membránovým potenciálem nejméně. Naproti tomu u izolátu 86B, kdy došlo u celé populace ke ztrátě membránového potenciálu v první hodině působení vankomycinu, se v průběhu času velikost subpopulace s membránovým potenciálem opět mírně zvyšovala.



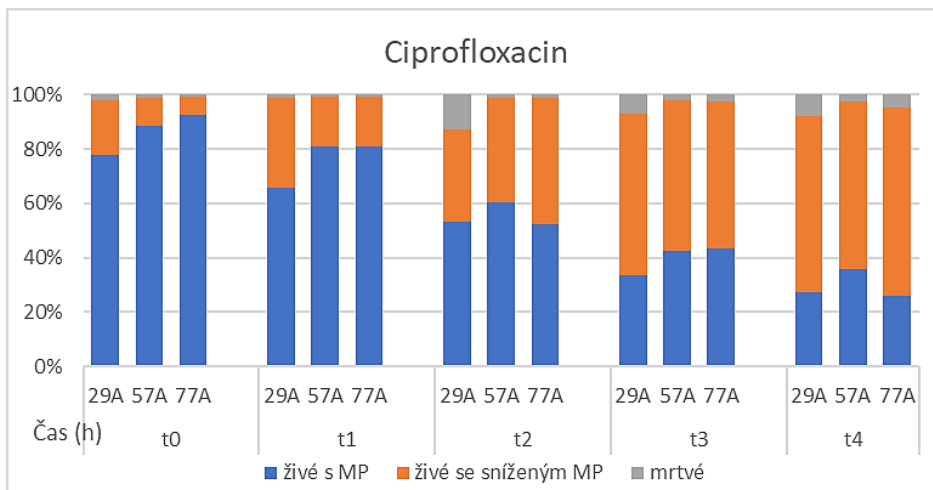
Graf 10: Rozlišené subpopulace živých buněk, živých buněk se sníženým membránovým potenciálem a mrtvých buněk u izolátů 68VI, 69A, 70A, 86A a 86B po působení 100x MIC ciprofloxacínu. Na ose y je vyneseno procentuální zastoupení subpopulací.



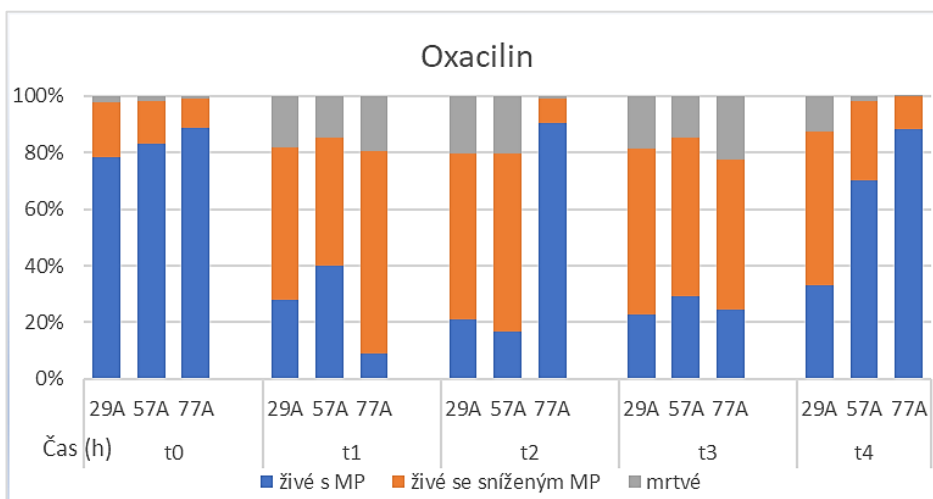
Graf 9: Rozlišené subpopulace živých buněk, živých buněk se sníženým membránovým potenciálem a mrtvých buněk u izolátů 68VI, 69A, 70A, 86A a 86B po působení 100x MIC oxacilínu. Na ose y je vyneseno procentuální zastoupení subpopulací.



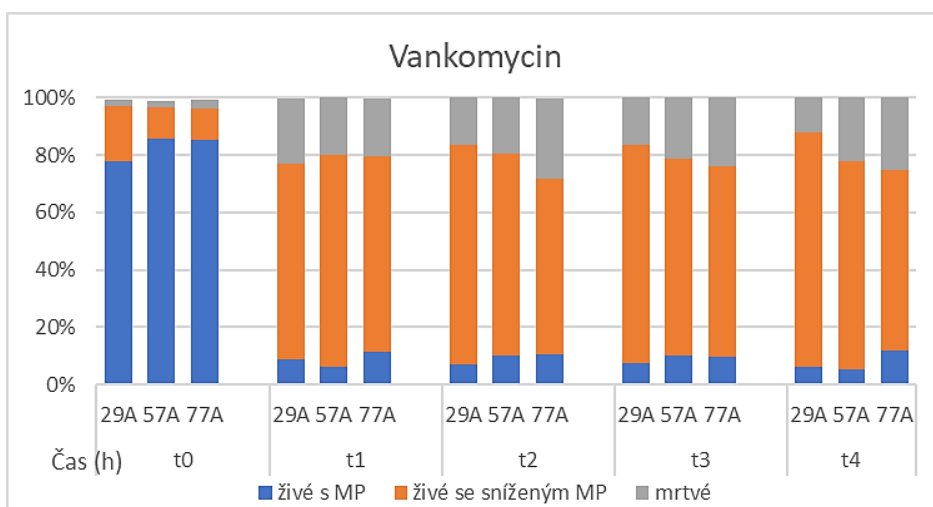
Graf 11: Rozlišené subpopulace živých buněk, živých buněk se sníženým membránovým potenciálem a mrtvých buněk u izolátů 68VI, 69A, 70A, 86A a 86B po působení 100x MIC vankomycinu. Na ose y je vyneseno procentuální zastoupení subpopulací.



Graf 12: Subpopulace živých buněk, živých buněk se sníženým membránovým potenciálem a mrtvých buněk u izolátů 29A, 57A a 77A po působení 100x MIC ciprofloxacinu. Na ose y je vyneseno procentuální zastoupení subpopulací.



Graf 13: Subpopulace živých buněk, živých buněk se sníženým membránovým potenciálem a mrtvých buněk u izolátů 29A, 57A a 77A po působení 100x MIC oxacilinu. Na ose y je vyneseno procentuální zastoupení subpopulací.



Graf 14: Subpopulace živých buněk, živých buněk se sníženým membránovým potenciálem a mrtvých buněk u izolátů 29A, 57A a 77A po působení 100x MIC vankomycinu. Na ose y je vyneseno procentuální zastoupení subpopulací.

10.4.2 Stanovení exprese *sigB* a měření metabolické aktivity

Cíl: U buněk exprimujících gen sigB srovnat metabolickou aktivitu po působení antibiotik mezi izoláty

Gen *sigB* kóduje alternativní sigma faktor obecné stresové odpovědi a bylo prokázáno, že ovlivňuje velikost populace tvořící biofilm (Rachid et al. 2000). K detekci míry jeho exprese během působení antibiotik byl využit plazmid pCNsigB s promotorem *sigB* sfúzovaným s GFP připravený předchozí studentkou (Kotková 2019). Poměr buněk produkujících GFP byl vyhodnocen měřením na průtokovém cytometru a současně byla měřena metabolická aktivita po obarvení buněk C₁₂-resazurinem a mrtvé buňky byly detekovány TO-PRO-3 jako v předchozím experimentu.

Plazmid byl do jednotlivých izolátů vložen transdukci z kmene *S. aureus* RN4220, který je defektní v restriktivně modifikačním systému. Pro transdukci plazmidu pCNsigB do izolátů obou pacientek byla použita virulentní varianta lyzogenního bakteriofága $\phi 11$. Podařilo se získat izoláty s transdukovaným plazmidem od všech izolátů druhé pacientky (29A, 57A, 77A, 77C). U izolátů od první pacientky (68VI, 69A, 70A, 86A, 86B) se transdukce opakovaně nedařila. Přistoupilo se proto k analýze sekvence genomů, která ukázala, že tyto izoláty jsou lyzogeny bakteriofágů $\phi 80$ a $\phi 11$, což může vysvětlovat, proč se nepodařilo k provedení transdukce do těchto izolátů využít ani jeden ze zmíněných bakteriofágů. Analýza byla provedena RNDr. Jaroslavem Nunvářem, Ph.D. ve výzkumné instituci BIOCEV. Jedna z výsledných analýz je zobrazena na obrázku 14, kde je vidět část sekvence DNA izolátu 86A obsahující geny bakteriofágů $\phi 80$ a $\phi 11$.

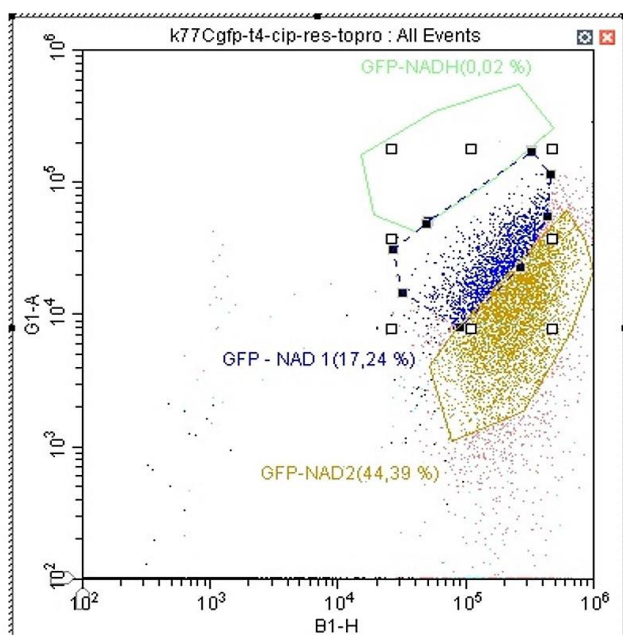


Obrázek 14: Analýza sekvence genů izolátu 86A. Lze vidět, že se jedná o lyzogen bakteriofágů $\phi 80$ a $\phi 11$

Buňky potencionálně nesoucí plazmid byly kultivovány s antibiotiky ciprofloxacinem, oxacilinem nebo vankomycinem a každou hodinu byly odebírány vzorky. Vzorky byly ihned po odběru obarveny C₁₂-resazurinem a těsně před měřením také barvivem TO-PRO-3. Na průtokovém cytometru byl změřen redoxní potenciál a míra exprese *sigB* v jednotlivých subpopulacích.

TO-PRO-3 slouží pro měření viability buněk v závislosti na integritě membrány. Resazurin je modré barvivo pronikající do buněk, které se obecně používá k měření metabolické aktivity. C₁₂-resazurin je jeho derivát, který je možno využít pro účely průtokové cytometrie, vzhledem k jeho schopnosti zakotvení do membrány po vstupu do buňky. Při aktivních metabolických drahách v buňce dochází k tvorbě NADH, jenž redukuje C₁₂-resazurin na C₁₂-resorufin a tím se reoxiduje na NAD⁺. Proto je C₁₂-resazurin možno využít k měření hladiny NADH, a tedy detekci metabolicky aktivních buněk pomocí průtokové cytometrie. Srovnána byla metabolická aktivita pouze u izolátů s vloženým plazmidem pro stanovení exprese *sigB* pomocí reportéru GFP. Měřením intenzity TO-PRO-3 a C₁₂-resorufinu bylo možné rozlišit 3 subpopulace – mrtvé buňky, živé respirující buňky s GFP metabolicky aktivní a živé buňky s GFP metabolicky neaktivní. Expresse genu *sigB* byla detekována u téměř celé populace buněk a živé buňky bez GFP se v populaci nacházely ve velmi nízkém počtu, proto nebyly uvedeny v grafech. Výsledky jsou znázorněny v podobě sloupcových grafů rozdělených podle časů t₀ až t₄ zobrazených v grafech 15 až 17. Metabolicky aktivní buňky jsou v grafech značeny jako NADH. Buňky se sníženým metabolizmem byly dále rozděleny do dvou kategorií v závislosti na míře poklesu signálu C₁₂-resorufinu. Po použití ciprofloxacinu byly detekovány dvě subpopulace neredukovaného C₁₂-resazurinu. Rozdělené subpopulace jsou označeny jako NAD1 u mírného snížení a NAD2 u velmi sníženého metabolizmu na úrovni ztráty redoxního potenciálu po působení CCCP. Všechny izoláty, u kterých se transdukce podařila (29A, 57A, 77A, 77C) byly měřeny v jednom technickém provedení.

V působení antibiotik byly značné rozdíly. Ciprofloxacín svým účinkem nevedl k hynutí buněk, nýbrž navozoval snížení metabolizmu a projevoval se výrazným snížením hladiny NADH v obdobné míře jako po působení CCCP. Takto nízký obsah NADH se po použití ostatních antibiotik neobjevoval. Od druhé hodiny po přidání ciprofloxacinu už se v přeživší populaci metabolicky aktivní buňky nevyskytovaly.

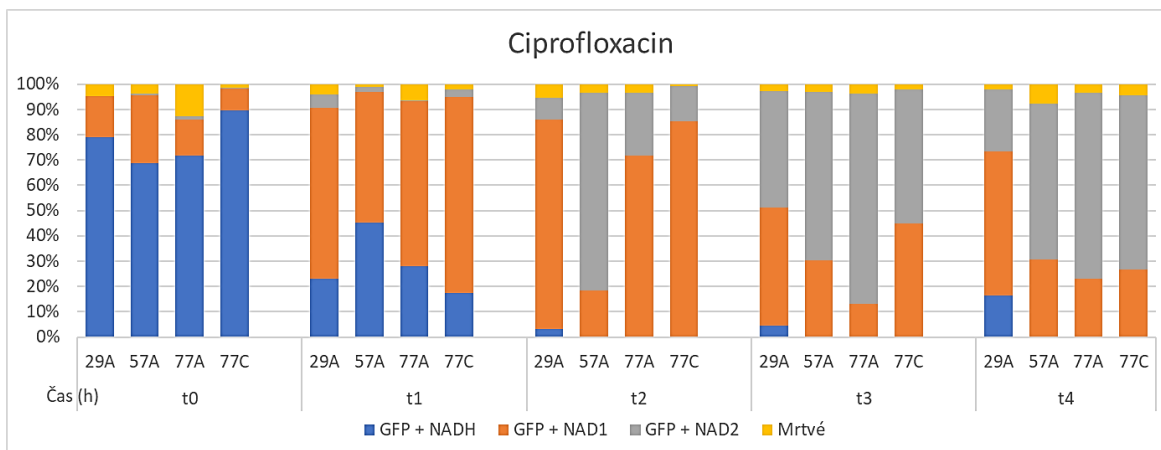


Obrázek 15: Ukázka z programu CytExpert s naměřeným vzorkem 77C po působení ciprofloxacinu v čase t_4 vneseném jako GFP na ose x (B1-H) vůči C_{12} -resorufinu na ose y (G1-A). GFP-NADH značí metabolicky aktivní buňky s exprimovaným SigB, GFP-NAD1 buňky s mírně sníženým metabolizmem a GFP-NAD2 buňky s velmi sníženým metabolizmem.

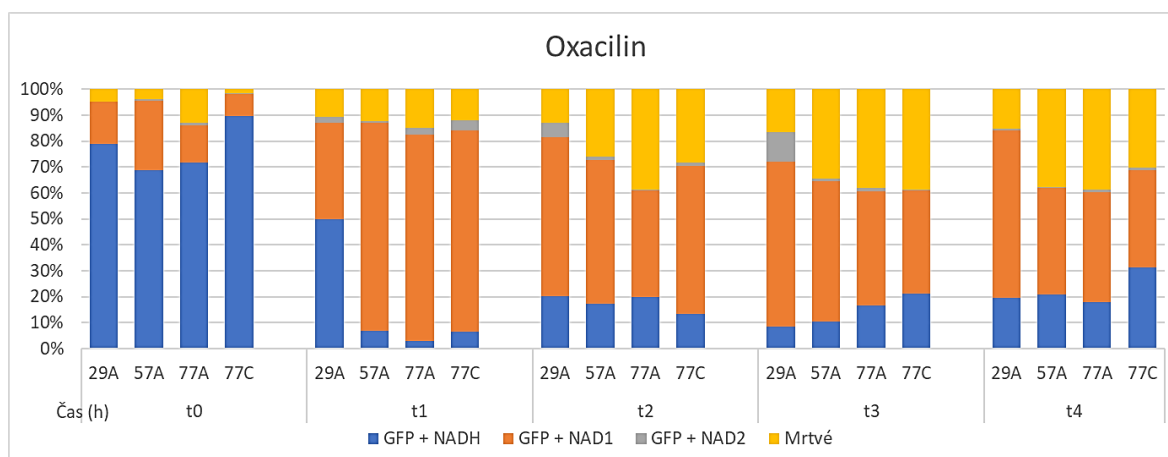
Naměřená subpopulace se sníženou hladinou NADH po působení ciprofloxacinu je vidět na obrázku 15. Tento obrázek zobrazuje polohu jednotlivých subpopulací ve vnesení zeleného detektoru (B1-H) vůči červenému (G1-A) v programu Cytexpert po změření vzorku 77C v čase t_4 . Zelená oblast GFP-NADH označuje metabolicky aktivní buňky. Oblast GFP-NAD1 s modře zabarvenými událostmi označuje subpopulaci buněk se sníženou metabolickou aktivitou. Do žluté oblasti GFP-NAD2 spadala část buněk s extrémně sníženým metabolizmem, která se vyskytovala pouze u populace po použití ciprofloxacinu a odpovídá buňkám po působení CCCP.

Oxacilin i vankomycin způsobovaly mírný pokles v metabolizmu u většiny populace, a to již během první hodiny. Rozdíl mezi těmito antibiotiky nastal až od druhé hodiny. Po vankomycinu přetrvávala většina buněčné populace v neaktivním metabolickém stavu, zatímco po oxacilinu se v přeživší populaci mírně zvyšovala velikost metabolicky aktivní subpopulace buněk a rovněž zde bylo detekováno více hynoucích buněk.

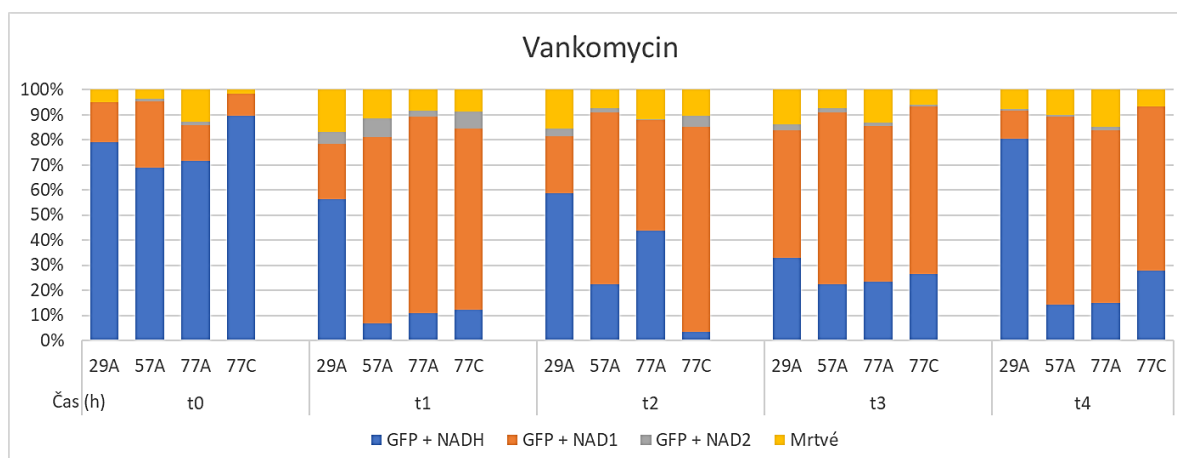
Účinky antibiotik na jednotlivé izoláty byly velice podobné s výjimkou izolátu 29A, u kterého byla po přidání vankomycinu naměřena nejvyšší subpopulace živých metabolicky aktivních buněk, jejichž podíl se ve čtvrté hodině zvýšil na úroveň času před přidáním antibiotika.



Graf 15: Procentuální zastoupení buněk s exprimovaným GFP po působení 100x MIC ciprofloxacinu. Subpopulace buněk izolátů 29A, 57A, 77A a 77C jsou rozlišeny na metabolicky aktivní (NADH), se sníženou aktivitou (NAD1) a se silně sníženou aktivitou na úrovni působení CCCP (NAD2).



Graf 16: Procentuální zastoupení buněk s exprimovaným GFP po působení 100x MIC oxacilinu. Subpopulace buněk izolátů 29A, 57A, 77A a 77C jsou rozlišeny na metabolicky aktivní (NADH), se sníženou aktivitou (NAD1) a se silně sníženou aktivitou na úrovni působení CCCP (NAD2).



Graf 17: Procentuální zastoupení buněk s exprimovaným GFP po působení 100x MIC vankomycinu. Subpopulace buněk izolátů 29A, 57A, 77A a 77C jsou rozlišeny na metabolicky aktivní (NADH), se sníženou aktivitou (NAD1) a se silně sníženou aktivitou na úrovni působení CCCP (NAD2).

10.5 Kontinuální měření OD_{600}

Cíl: Provéřit vliv sterilních supernatantů na růstové parametry studovaných izolátů

Experimenty popsané v následujících podkapitolách byly provedeny v Mikrobiologickém Ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze 4 Krč, kde byl k měření OD_{600} vzorků využit přístroj Microplate reader 800TS od firmy BioTek. Před samotným měřením byly ke vzorkům přidávány sterilní supernatanty z nočních kultur vybraných izolátů v poměru 1:9. Supernatanty pocházejí z noční kultury ve stacionární fázi, kde jsou vyčerpané živiny, proto bylo pro vyrovnání ztráty živin namísto běžného BHI média použito BHI médium obohacené o 10 %. Bylo otestováno, že samotné obohacené BHI médium neovlivňuje růst ani hynutí populace buněk, proto bylo takto obohacené BHI médium využíváno i pro kontrolní vzorky bez přidaného supernatantu (data neuvedena). Supernatanty byly připraveny vždy čerstvé. Vzorky se všemi vybranými supernatanty byly měřeny současně v jedné mikrotitrační destičce po dobu 12 hodin s intervalem měření 10 minut.

Metodu kontinuálního měření optické denzity bylo nejprve potřeba optimalizovat, především z hlediska doby působení antibiotik a různé doby kultivace nočních kultur, ze kterých se filtroval supernatant. Z důvodu rozdílné doby přechodu izolátů do stacionární fáze byla dále noční kultura kultivována po 24 hodin, aby bylo zaručené, že se všechny kultury nacházejí ve stacionární fázi, kdy se v populaci molekuly ovlivňující vyrůstání exprimují v maximálním množství. Rovněž bylo pro měření míry vyrůstání z perzistence nutné vyladit podmínky odmývání antibiotik od vzorků. Tyto experimenty byly zpočátku měřeny po dobu 6 hodin, což se později ukázalo být nedostatečné, neboť v této době populace teprve začínala vyrůstat. Později se přistoupilo k 12hodinovému měření, které již bylo pro porovnání účinku supernatantů na vyrůstání dostačující. Výstupem měření byla tabulka s hodnotami OD_{600} všech jamek v mikrodestičce z celkem 73 měřených časů. Tyto hodnoty byly zpracovány do podoby grafů s rostoucím OD_{600} v čase. Zkušebně bylo provedeno několik měření izolátů od pacientky 1, pravděpodobně z důvodu jejich mutací v *rsbU* však měření vedly k nesourodým výsledkům, které by mohly komplikovat interpretaci výsledků, proto byly měřeny pouze izoláty od druhé pacientky. Všechny izoláty byly měřené s přidáním sterilních supernatantů z nočních kultur od izolátů stejné pacientky (29A, 57A, 77A, 77C), izolátu 86B od první pacientky, jenž má pravděpodobně nefunkční Agr systém a od izolátu 39A s interferujícím Agr typem II.

10.5.1 Růstové křivky

Cíl: Porovnat účinky působení sterilních supernatantů od vybraných izolátů na růstovou křivku

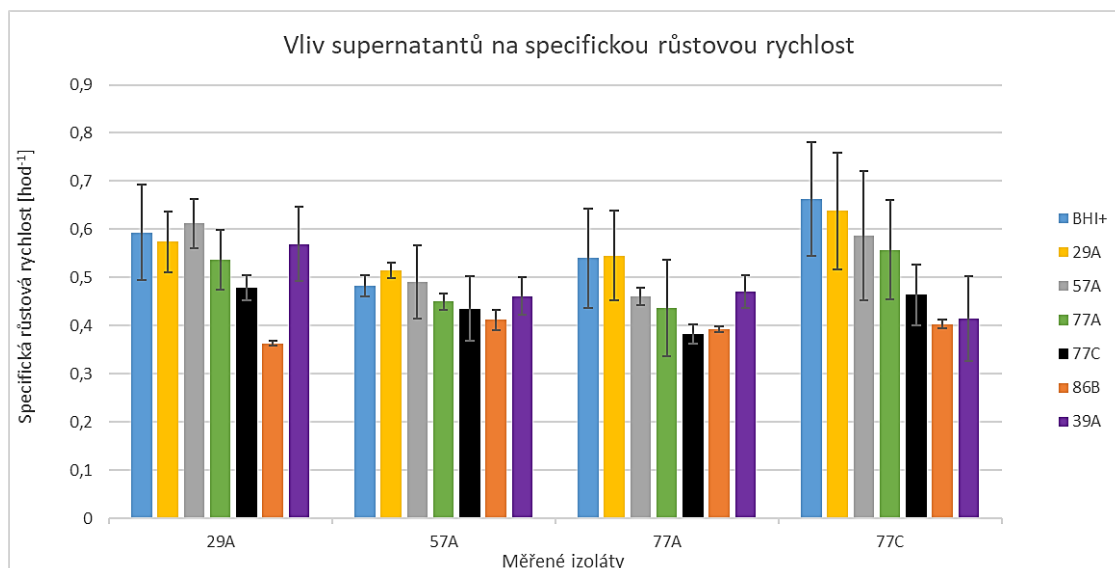
Pro stanovení růstových křivek byla kultura z exponenciální fáze přeočkována ve dvou koncentracích do čerstvého BHI média s přidanými sterilními supernatanty na výsledné OD₆₀₀ 0,05 a 0,005. Po dobu 12 hodin bylo v 10minutovém intervalu měřeno zvyšující se OD₆₀₀ rostoucí populace. Ve výsledných grafech růstových křivek byl vliv supernatantů lépe rozlišitelný při nižší počáteční optické denzitě, proto byly k porovnání dále využity pouze tyto výsledky. Izoláty 29A a 77C byly změřeny ve dvou biologických replikátech vždy po dvou technických duplikátech a izoláty 57A a 77A byly změřeny v jednom biologickém provedení ve dvou technických duplikátech.

Ke srovnání vlivu supernatantů na růstovou rychlost byla z průměrů obou biologických replikátů a všech technických duplikátů vypočítána specifická rychlost růstu podle vzorce:

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$$

μ	specifická růstová rychlost [h ⁻¹]
x_0	OD ₆₀₀ začátku exponenciální fáze
x	OD ₆₀₀ konce exponenciální fáze
t_0	čas začátku exponenciální fáze [h]
t	čas konce exponenciální fáze [h]

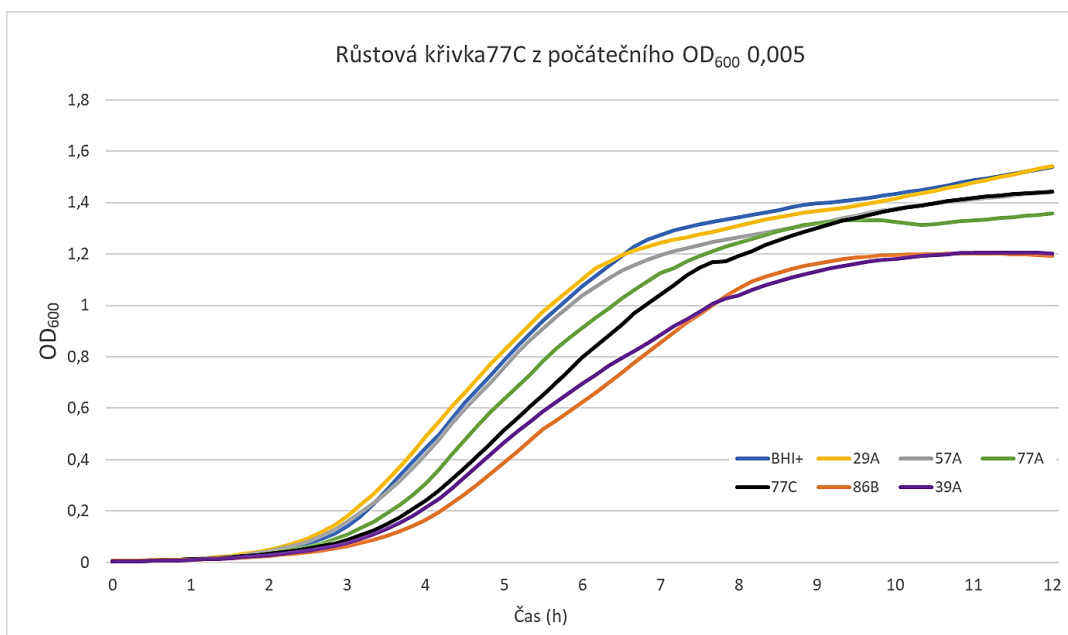
Výsledky jsou znázorněny v grafu 18 ukazujícím průměrnou specifickou rychlost růstu izolátů 29A, 57A, 77A a 77C kultivovaných s přidanými sterilními supernatanty z nočních kultur vybraných izolátů. Je možné pozorovat, že všechny přidané supernatanty s výjimkou supernatantu z izolátu 29A snižují rychlost růstu. Jednotlivé supernatanty mají podobný vliv na všechny izoláty.



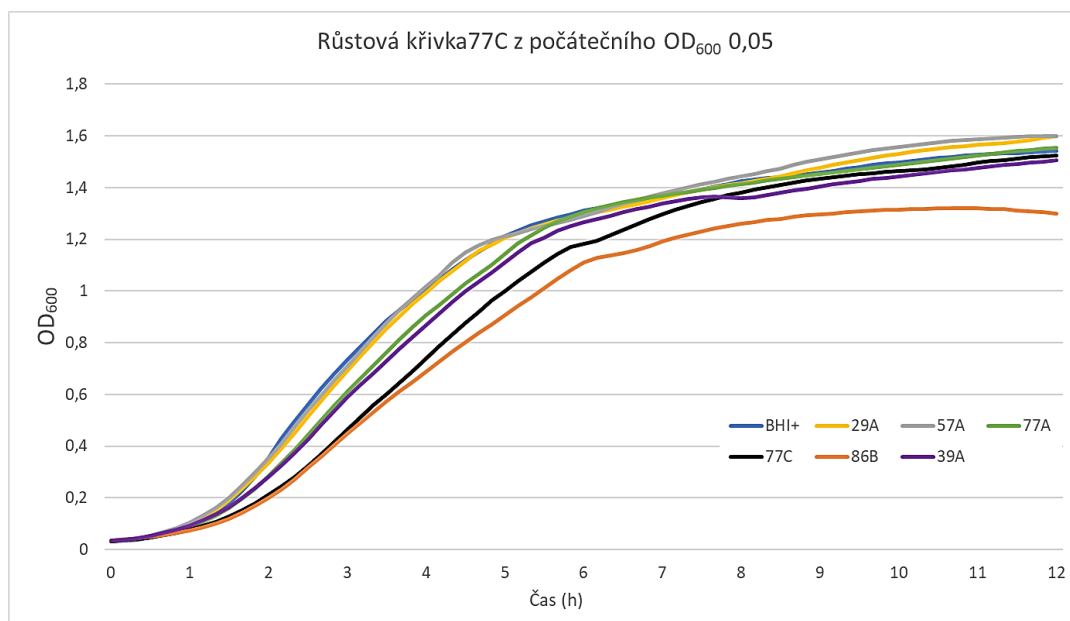
Graf 18: Specifická růstová rychlost chronologických izolátů *S. aureus* 29A, 57A, 77A a 77C pacientky 2 po přidání sterilních supernatantů z nočních kultur 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). Vzorky v obohaceném médiu bez přidání supernatantu jsou označeny BHI+. Výsledné hodnoty jsou průměrem všech biologických a technických replikátů. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky. Izoláty 57A a 77A byly měřeny v technickém duplikátu a izoláty 29A a 77C v biologickém duplikátu a technických duplikátech.

S přidáním supernatantem od izolátu 29A (značeno žlutě) byla rychlost růstu velmi podobná růstu v obohaceném BHI médiu bez přidání jakéhokoliv supernatantu (značeno modře). Ostatní supernatanty navozovaly spíše pomalejší růst. Rozdíl se supernatantem 57A nezpůsobil natolik zřetelnou změnu v rychlosti růstu jako supernatanty 77A a 39A, avšak nejnižší specifická růstová rychlost nastala u všech izolátů po přidání supernatantů 86B a v menší míře také 77C.

U izolátu 77C byl pozorován snížený růst rovněž se supernatantem 39A s Agr typem II, což se projevovalo ve všech měřených replikátech s počáteční hodnotou OD_{600} 0,005, ačkoliv u vyšší počáteční hustoty tento jev nenastával. Růstové křivky izolátu 77C s počátečními hodnotami OD_{600} 0,005 a 0,05 jsou ukázány na grafech 19 a 20. Z důvodu nižší přehlednosti nejsou uvedeny průměry se směrodatnými odchylkami, ale pouze vybrané reprezentativní měření.

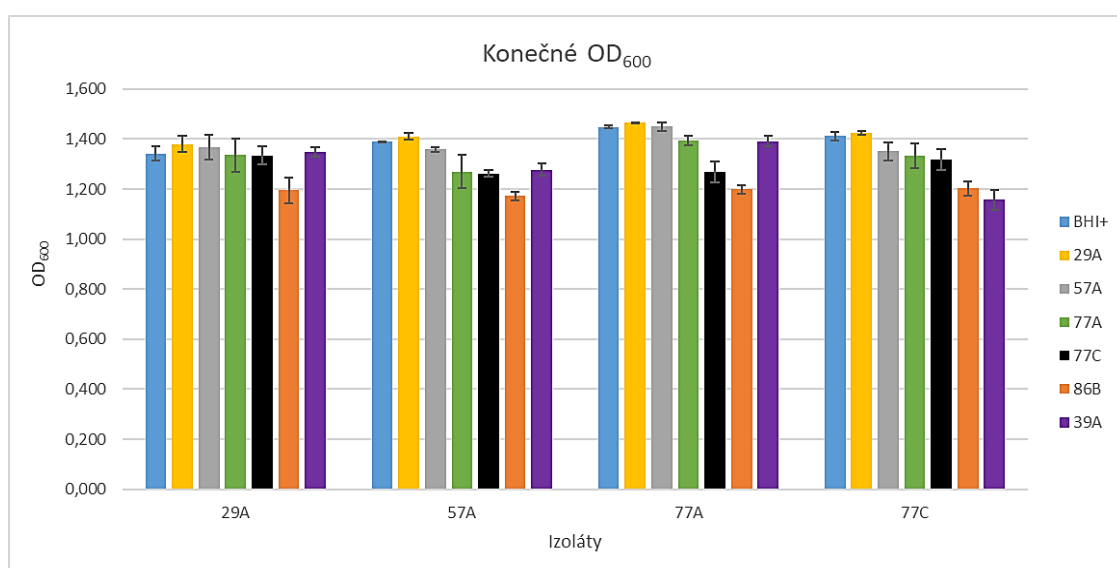


Graf 19: Příklad růstové křivky izolátu 77C z počátečního OD_{600} 0,005 po přidání sterilních supernatantů z nočních kultur 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda), kde supernatant izolátu 39A snižoval rychlost růstu. Vzorky měřené v obohaceném BHI médiu bez přidání supernatantu jsou označeny BHI+.



Graf 20: Příklad růstové křivky izolátu 77C z počátečního OD_{600} 0,05 po přidání sterilních supernatantů z nočních kultur 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). Vzorky měřené v obohaceném BHI médiu bez přidání supernatantu jsou označeny BHI+.

Kromě rozdílné rychlosti růstu populace, kterou v grafu udává sklon křivky v exponenciální fázi, byly po přidání jednotlivých sterilních supernatantů pozorovatelné rovněž odlišné hodnoty dosažené optické denzity ve stacionární fázi. Po vynesení průměru hodnot OD_{600} naměřených v 10. hodině, kdy už se populace buněk vždy nacházela ve stacionární fázi, je možné na grafu 21 pozorovat velmi podobné působení supernatantů na výslednou dosaženou optickou denzitu jako na růstovou rychlost. Pomalejší růst buněčné kultury vedl k dřívějšímu přechodu populace do stacionární fáze. Nejdříve izoláty dosahovali stacionární fáze po přidání supernatantu 86B.



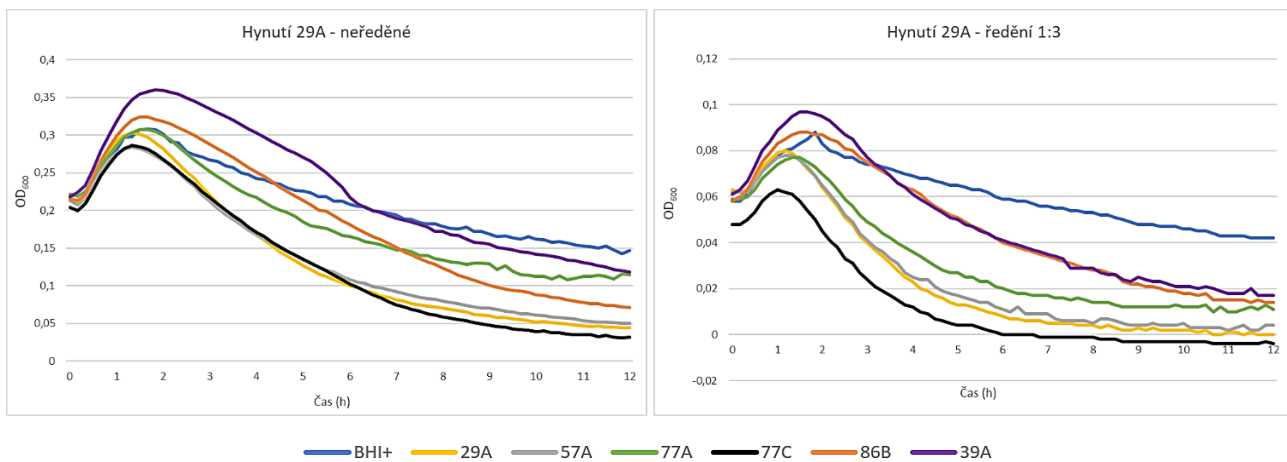
Graf 21: Optická denzita naměřená v 10. hodině u izolátů 29, 57A, 77A a 77C pacientky 2 po přidání sterilních supernatantů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). Vzorky měřené v obohaceném BHI médiu bez přidání supernatantu jsou označeny BHI+. Výsledné hodnoty jsou průměrem všech biologických a technických replikátů. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky. Izoláty 57A a 77A byly měřeny v technickém duplikátu a izoláty 29A a 77C v biologickém duplikátu a technických duplikátech.

10.5.2 Rychlost hynutí

Cíl: Porovnat účinky působení sterilních supernatantů od vybraných izolátů na rychlost hynutí po působení oxacilinu

Ke kultuře chronologických izolátů pacientky 2 v exponenciální fázi, tj. při dosažení OD_{600} 0,5, byl přidán oxacilin v množství stonásobku MIC. Před samotným přidáním antibiotika byly odebrané vzorky zcentrifugovány, aby pelety mohly být resuspendovány v obohaceném BHI médiu s příslušnými supernatanty. Použity byly opět sterilní supernatanty z nočních kultur izolátů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A. Během 12hodinového měření buňky s oxacilem hynuly a bylo možné detekovat snižující se optickou densitu.

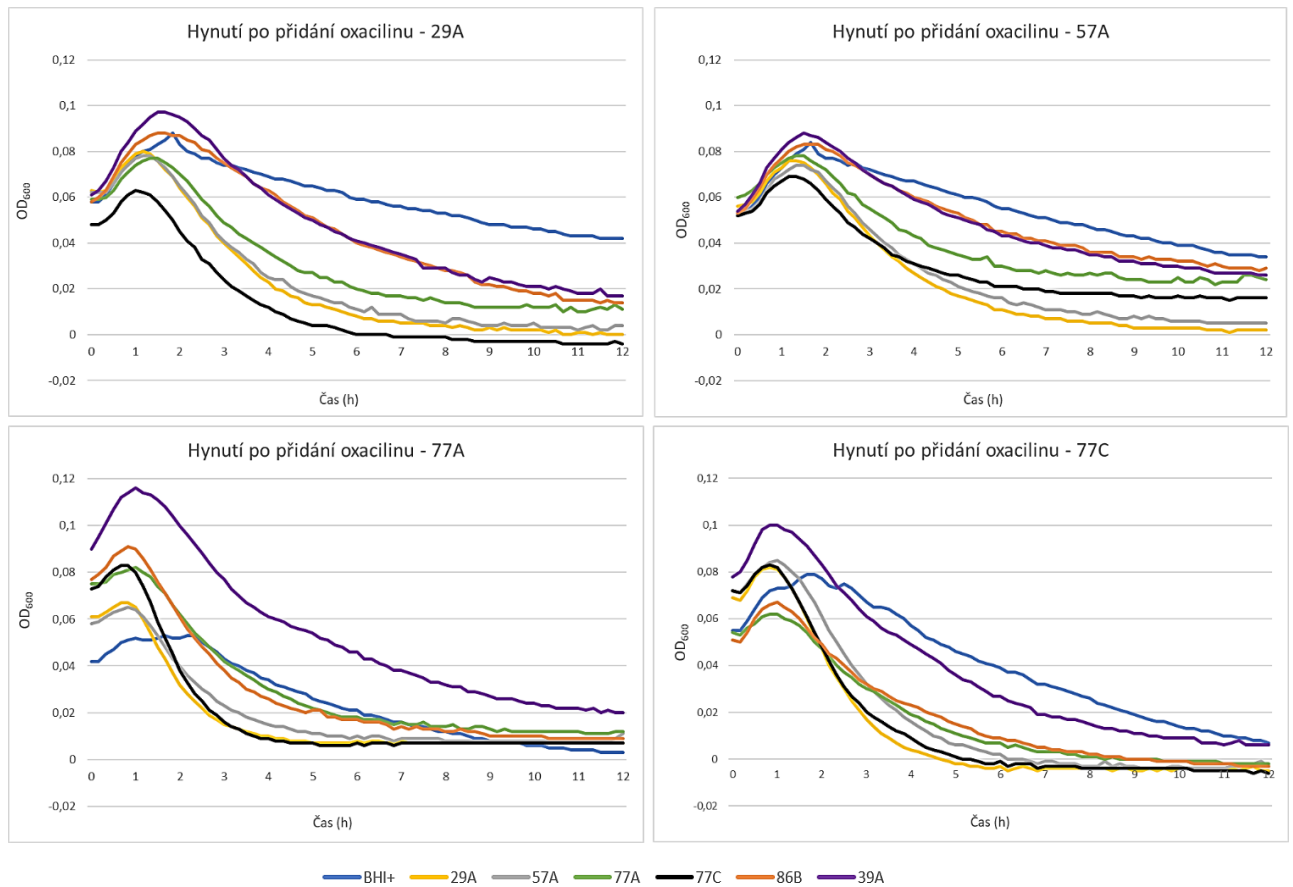
Vzorky byly měřeny neředěné a v ředění 1:3. Mezi těmito dvěma hustotami vzorků byl ve výsledku pravděpodobně z důvodu mezibuněčné komunikace Quorum sensing patrný rozdíl, jak je vidět na grafech měření izolátu 29A na obrázku 16. Při zředění bylo hynutí buněk v jednotlivých kultivacích od sebe lépe odlišitelné, proto byly ke stanovení vlivu supernatantů využity právě vzorky ředěné 1:3.



Obrázek 16: Rozdíly ve 12hodinovém hynutí izolátu 29A s přidáními supernatanty 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda) u neředěných vzorků a vzorků, jejichž pelety byly resuspendovány do původního objemu a před měřením byly dále zředěny ve stejném médiu v poměru 1:3. Vzorky měřené v obohaceném BHI médiu bez přidání supernatantu jsou označeny BHI+.

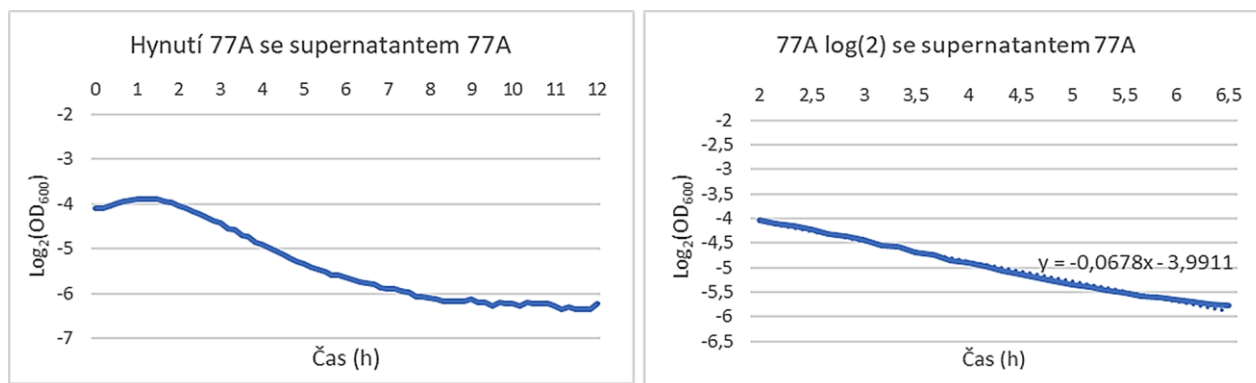
Na obrázku 17 jsou vyobrazeny reprezentativní grafy naměřených hodnot každého z izolátů. Přestože byly vzorky odebírány najednou ze stejné kultury, počáteční OD_{600} se v rámci jednoho měření mezi vzorky lišily, pravděpodobně z důvodu nechtěného odebrání části peletu během výměny BHI média za obohacené BHI médium se supernatanty. Důvodem rozdílu by mohl být rovněž vyšší nárůst optické denzity některých vzorků během doby jejich ředění a přepipetování do mikrotitrační destičky před samotným měřením. Počátečním OD_{600} byla ovlivněna hodnota konečného OD_{600} po 12 hodinách měření, proto není možné srovnávat

vliv supernatantů na hynutí na základě samotných hodnot OD_{600} ve 12. hodině a ke srovnání rychlosti hynutí byly využity směrnice přímk.



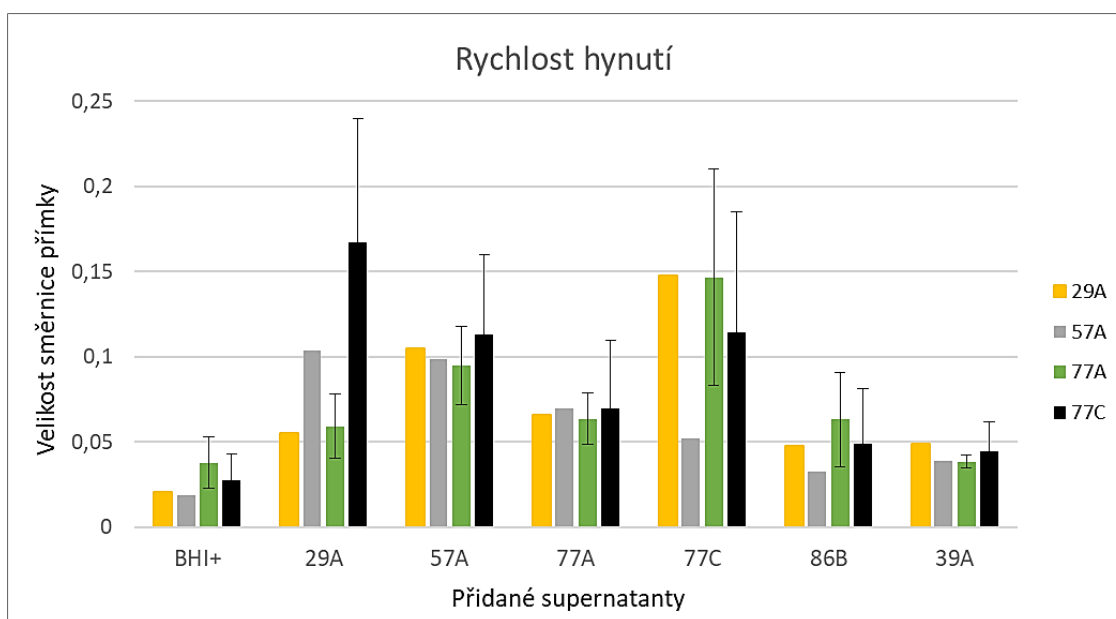
Obrázek 17: Grafy křivek hynutí po působení oxacilinu u izolátů 29A, 57A, 77A a 77C pacientky 2. Hynutí bylo měřeno s přidáním supernatantů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B, 39A (viz legenda) a současně bez přidaného supernatantu v obohaceném BHI médiu, zde značené jako BHI+. Vzorky byly před měřením zředěny v poměru 1:3.

Rovnice přímk byla vždy stanovena z časového úseku, ve kterém populace při vynesení hodnot v logaritmu o základu 2 klesala lineárně, viz grafy na obrázku 18. Z rovnic přímk ve tvaru $y=-kx+q$ byla směrnice přímk k využita pro srovnání vlivu supernatantů. Vyšší hodnota směrnice přímk k vyznačuje rychlejší klesání OD_{600} a tedy rychlejší hynutí buněčné populace ve vzorku.



Obrázek 18: Příklad vynesení hodnot OD_{600} z 12hodinového měření v logaritmu o základu 2. V čase 2-6,5 hodiny klesá populace lineárně a z těchto hodnot je vynesena graf vpravo. Výstupem je přímka s rovnicí $y = -0,0678x - 3,9911$. Směrnice přímky je 0,0678.

Výsledné velikosti rychlosti hynutí dané směrnici přímek jsou zobrazené ve sloupcovém grafu 22. Přidané sterilní supernatanty rychlost hynutí populace viditelně ovlivňovaly. Porovnáním směrnic přímek se ukázalo, že supernatanty od izolátů 39A, 86B a v menší míře také 77A působily podobně jako samotné obohacené BHI médium bez přidaného supernatantu a hynutí mělo pomalejší průběh. Naopak supernatanty izolátů 29A, 57A a 77C způsobovaly rychlejší spád v hynutí populace.



Graf 22: Rychlost hynutí dána směrnici přímek stanovených z časových úseků křivek hynutí, které měly v logaritmickém měřítku lineární průběh. Měření bylo provedeno u izolátů 29A, 57A, 77A a 77C pacientky 2 (viz legenda) po přidání sterilních supernatantů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A. Vzorky měřené bez přidaného supernatantu v obohaceném BHI médiu jsou označeny jako BHI+. Chybovými úsečkami u 77A a 77C jsou směrodatné odchylky ze 3 biologických replikátů, izoláty 29A a 57A byly měřeny v jednom provedení. Vyšší hodnota směrnice přímky značí rychlejší hynutí populace buněk.

10.5.3 Vyrůstání z perzistence

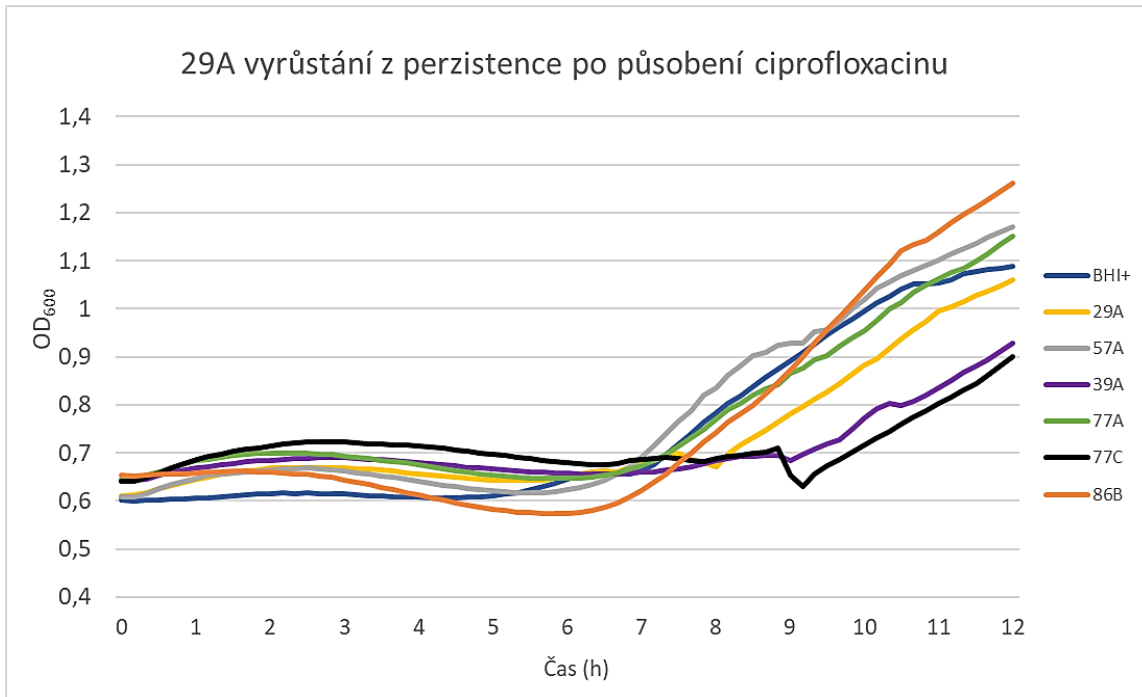
Cíl: Porovnat účinky působení sterilních supernatantů od vybraných izolátů na schopnost vyrůstání z perzistence po působení ciprofloxacinu a oxacilinu

Během působení antibiotik se buňky náhodně uvádějí do perzistentního stavu, který jim umožňuje antibiotické působení přežít. Po odstranění antibiotik perzistentní buňky postupně přecházejí zpět do vegetativního stavu, ve kterém se rozmnožují a rostou, což je možné detekovat zvyšující se optickou denzitou. Křivka charakterizující vyrůstání z perzistence je obdobou růstové křivky s delší klidovou fází (Lag fáze), během které se buňky vracejí do metabolicky aktivního stavu. Délka Lag fáze a dosažená optická denzita byly ovlivněny přidáním sterilních supernatantů od vybraných izolátů.

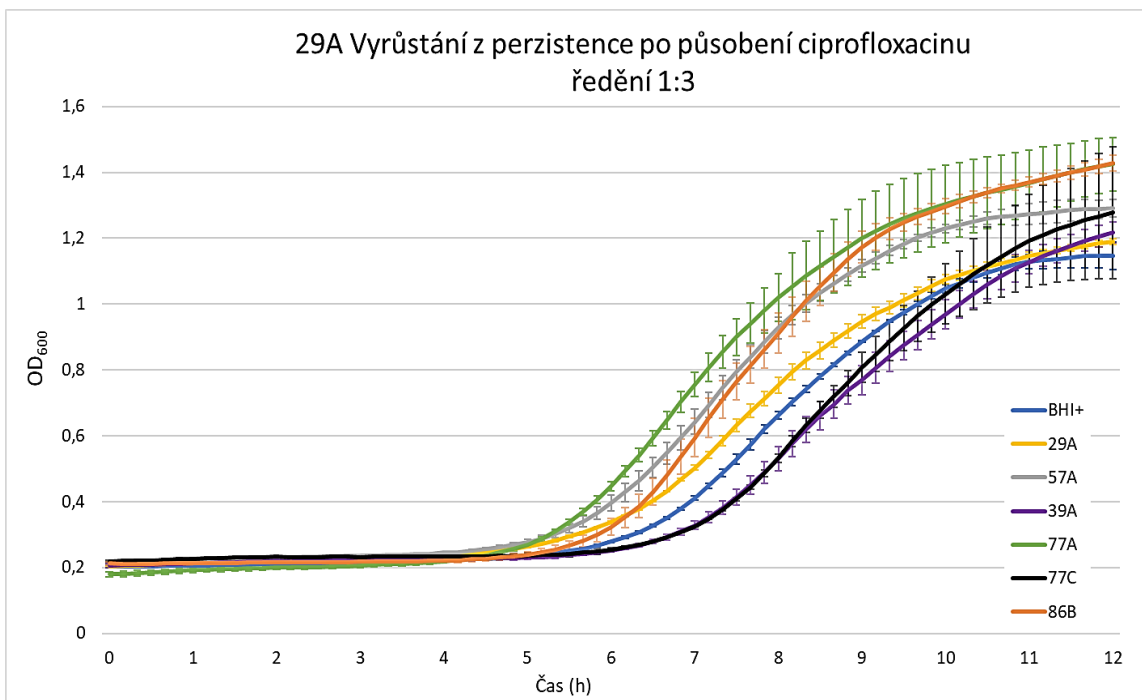
Antibiotika ke kultivujícím buňkám byla přidána ve stonásobné koncentraci MIC, nechala se působit přes noc (cca 18 hodin) a po této době byla odstraněna opakovanou centrifugací a resuspendováním peletu v BHI médiu s příslušným supernatantem. Pro porovnání rozdílnosti působení a s ohledem na výsledky stanovení průběhu křivek hynutí, kde byly pozorovány největší rozdíly vlivu supernatantů po působení ciprofloxacinu, byla zvolena antibiotika ciprofloxacin a oxacilin.

Měřeny byly všechny izoláty pacientky 2 (29A, 57A, 77A a 77C). Měření proběhlo v biologickém triplikátu při použití ciprofloxacinu a v biologickém duplikátu při použití oxacilinu, přičemž všechna měření byla provedena v technických triplikátech. Měřeny byly vzorky v neředěném stavu i zředěné 1:3. Jelikož však v neředěných vzorcích buňky vyrůstaly s kolísavým průběhem, jak lze vidět na grafu 23, postupně se přešlo k měření pouze zředěných kultur. Grafy 24 a 25 zobrazují křivky vyrůstání z perzistence po působení ciprofloxacinu a oxacilinu u izolátu 29A ve zředěném stavu, kde jednotlivé přidané sterilní supernatanty ovlivňovaly míru vyrůstání.

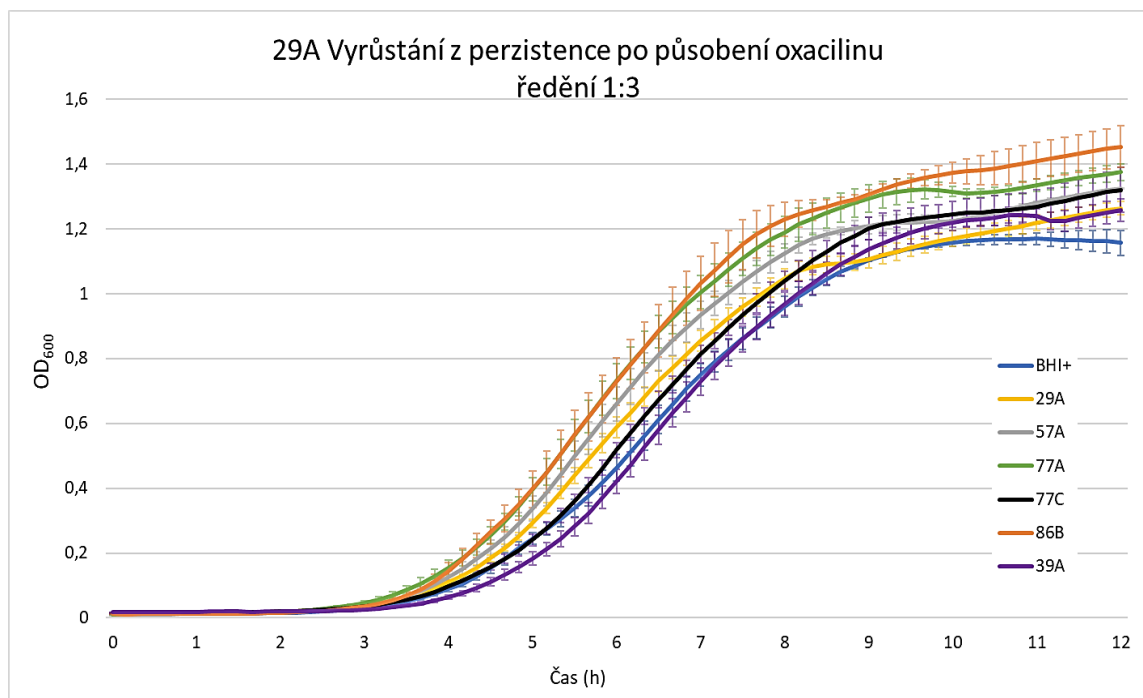
V časech počátku vyrůstání docházelo k mírnému rozdílu mezi použitými supernatanty, nicméně viditelný rozdíl bylo možné pozorovat převážně mezi použitými antibiotiky. Po použití oxacilinu vyrůstaly buňky z perzistentního stavu již před čtvrtou hodinou po odstranění antibiotika, zatímco po působení ciprofloxacinu trvalo buněčným populacím začít vyrůstat mezi pěti až sedmi hodinami.



Graf 23: Vyrůstání buněk z perzistence u izolátu 29A po přidání sterilních supernatantů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). měřené jako OD₆₀₀ z neředěných vzorků. Vzorky měřené bez přidaného supernatantu v obohaceném BHI médiu jsou označeny jako BHI+. Oproti vzorkům zředěným 1:3 je vidět kolísavý průběh.



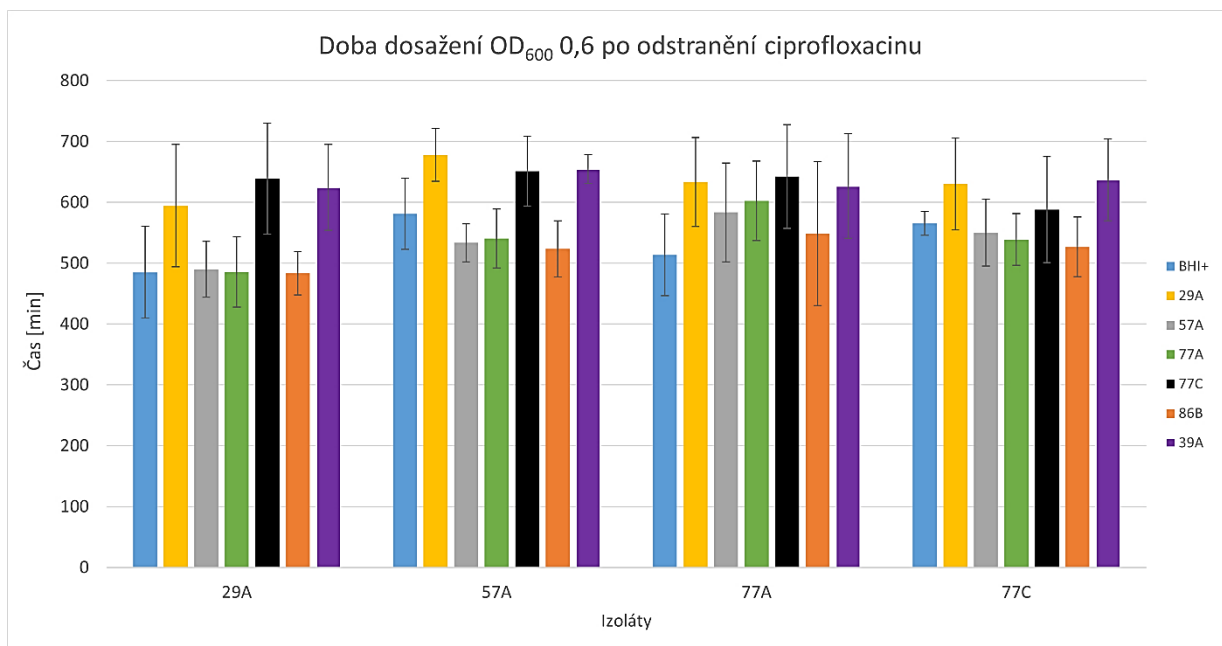
Graf 24: Příklad křivek vyrůstání z perzistence po působení ciprofloxacinu u izolátu 29A po přidání sterilních supernatantů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). Vzorky měřené bez přidaného supernatantu v obohaceném BHI médiu jsou označeny jako BHI+. Chybými úsečkami jsou směřodátne odchylky ze tří technických provedení jednoho měření.



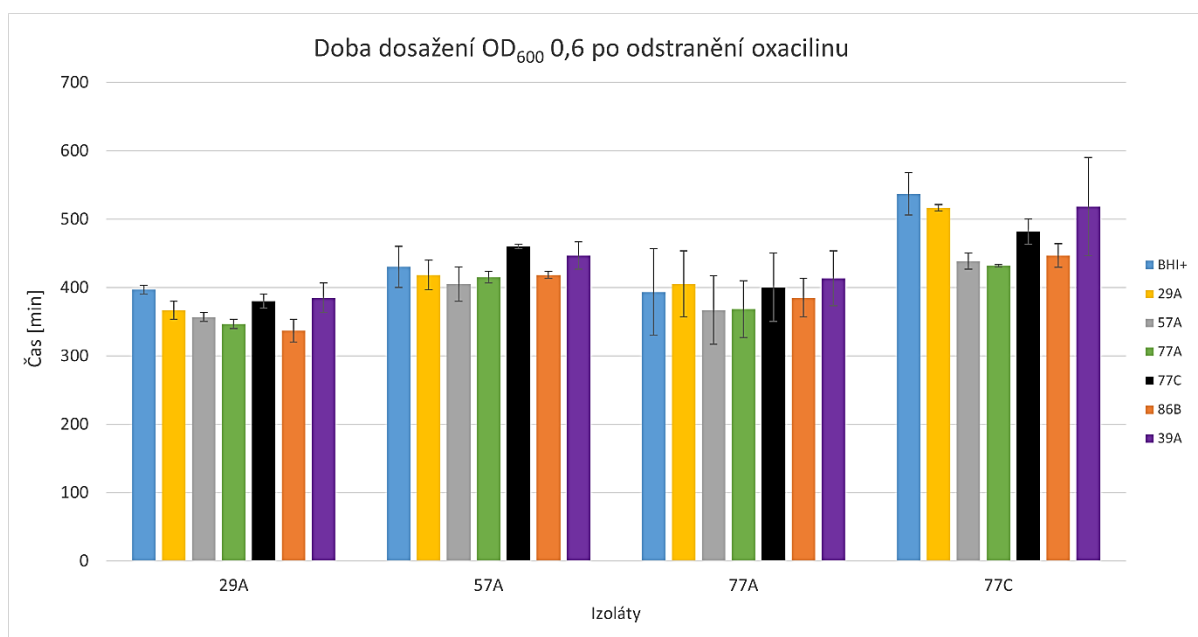
Graf 25: Příklad křivek vyrůstání z perzistence po působení oxacilinu u izolátu 29A po přidání sterilních supernatantů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). Vzorky měřené bez přidaného supernatantu v obohaceném BHI médiu jsou označeny jako BHI+. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky ze tří technických provedení jednoho měření.

Pro srovnání rozdílu vlivu jednotlivých sterilních supernatantů byla stanovena hodnota OD₆₀₀ 0,6, ve které se buněčná kultura nacházela uprostřed exponenciální fáze. Čas, za který měřené izoláty s přidanými sterilními supernatanty dosáhly této hodnoty je graficky znázorněn na grafu 26 po odstranění ciprofloxacinu a na grafu 27 po odstranění oxacilinu. Na základě těchto výsledků byl pozorován vliv supernatantů 29A, 77C a 39A, po jejichž přidání k buněčné kultuře trvalo izolátům dosáhnout hodnoty optické denzity 0,6 nejdéle, zatímco s přidanými supernatanty 57A, 77A a 86B rostly všechny izoláty lépe a této optické denzity dosáhly dříve. Po působení ciprofloxacinu byl tento výsledek zřetelnější než u oxacilinu, kde se vliv supernatantů nejvíce projevil u izolátu 77C a v ostatních izolátech příliš velký rozdíl nenastával.

Vzorky měřené v obohaceném médiu bez přidání sterilního supernatantu vykazovaly po použití ciprofloxacinu rychlejší dosažení OD₆₀₀ 0,6. Po použití oxacilinu byl tento čas bližší spíše vzorkům s přidanými supernatanty 29A, 77C a 39A snižujícími růst.



Graf 26: Čas, kdy optická densita dosáhla po odstranění antibiotika ciprofloxacinu z buněčné kultury hodnoty 0,6. Měřeny byly izoláty 29A, 57A, 77A a 77C pacientky 2 s přidávanými sterilními supernatanty 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). Vzorky měřené bez přidání supernatantu v obohaceném BHI médiu jsou označeny jako BHI+. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky ze dvou biologických replikátů.



Graf 27: Čas, kdy optická densita dosáhla po odstranění antibiotika oxacilinu z buněčné kultury hodnoty 0,6. Měřeny byly izoláty 29A, 57A, 77A a 77C pacientky 2 s přidávanými sterilními supernatanty 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A (viz legenda). Vzorky měřené bez přidání supernatantu v obohaceném BHI médiu jsou označeny jako BHI+. Chybovými úsečkami jsou směrodatné odchylky ze dvou biologických replikátů.

DISKUZE

Staphylococcus aureus je oportunní patogen, který ač často kolonizuje kůži a dýchací trakt bez vyvolání onemocnění, může být původcem mnoha typů závažných infekcí. Bývá velmi častou komplikací u pacientů s cystickou fibrózou, u nichž v průběhu prvních dvou let života dochází ke kolonizaci plic oportunními patogeny, především bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Zvýšená sekrece hlenu v dýchacích cestách při cystické fibróze tvoří výhodné prostředí pro jejich dlouhodobou perzistenci. (Sweeney et al. 2021). Perzistentní formy bývají zodpovědné za vznik chronických infekcí, jelikož je obtížné tyto buňky eradikovat a po antibiotické léčbě může dojít k recidivě onemocnění.

Přechod mezi virulentní formou a perzistencí je v buňce regulován na mnoha úrovních. Centrální regulací je Agr systém závislý na Quorum sensing molekulách AIP. Přestože perzistence není kódována geneticky, míra s jakou buňky *S. aureus* přecházejí do perzistentního stavu může být ovlivněna adaptačními mutacemi v genech tohoto regulačního systému vzniklými v průběhu chronické infekce. V této diplomové práci byl zjišťován vliv přirozeně vzniklých mutací na schopnost perzistence u devíti izolátů odebraných od dvou pacientek s diagnostikovanou cystickou fibrózou. V době diagnózy obou pacientek byl odebrán primoizolát *S. aureus* a v různých časových intervalech byly izolovány další izoláty, u kterých byla za pomoci MLST genotypizace stanovena příbuznost k primoizolátu. Od první pacientky byly získány izoláty 68VI, 69A, 70A, 86A a 86B v odstupe 5 měsíců, 8 měsíců a 18 měsíců od odběru primoizolátu. Izoláty 86A a 86B byly odebrány současně. Od druhé pacientky byly izoláty 29A, 57A, 77A a 77C izolovány po 19 měsících a po 25 měsících od primoizolátu. Izoláty 77A a 77C byly odebrány ve stejném datu.

U všech izolátů první pacientky byla nalezena substituční mutace v genu *rsbU*, která vedla k záměně fenylalaninu za tyrozin na 77. aminokyselinové pozici. Fenylalanin je ve všech známých genomech *S. aureus* invariantní, a proto je tato záměna nejspíše škodlivá. U izolátů 86A a 86B dále došlo k posunovým mutacím v genu kódujícím protein AgrA a u izolátu 86B navíc k posunové mutaci v genu *rsbU*.

Z izolátů druhé pacientky byla u izolátu 77A nalezena trunkační mutace v genu *relP* kódující GTP pyrofosfokinázu, která by mohla by ovlivňovat přechod do perzistence. Hlavním enzymem pro syntézu (p)ppGpp u *S. aureus* je RelA/SpoT homolog, avšak na syntéze se podílejí i dvě malé (p)ppGpp syntetázy RelP a RelQ, u nichž byla prokázána zvýšená aktivita během působení stresu na buněčnou stěnu pomocí nízké koncentrace vankomycinu. Vzniklé

molekuly (p)ppGpp nezávisle na Agr systému indukují tvorbu biofilmu a pravděpodobně přispívají ke vzniku perzisterů (Salzer et al. 2020). V izolátech s trunkační mutací v *relP* by mělo docházet ke vzniku zkráceného a pravděpodobně nefunkčního produktu a tedy ke snížené produkci (p)ppGpp. U ostatních izolátů se nevyskytovaly mutace, u kterých by byla zjištěna souvislost s perzistencí.

Schopnost perzistence byla zjišťována metodou TD testu a stanovením CFU v průběhu křivek hynutí. Následně bylo provedeno srovnání výsledků těchto dvou metod. Současně s odebráním vzorků pro stanovení CFU v průběhu křivek hynutí byl na průtokovém cytometru měřen membránový potenciál a metabolická aktivita. Ve všech metodách byly izoláty srovnávány s primoizoláty, u kterých zatím nemohlo dojít ke vzniku adaptačních mutací. Porovnávány byly izoláty obou pacientek zvlášť. Toto srovnání umožnilo sledovat, jak se schopnost perzistovat měnila v průběhu chronické infekce.

Předpokládá se, že molekuly AIP jsou obsažené v bezbuněčném supernatantu, který by po přidání k buněčné kultuře měl vést k aktivaci Agr systému a tím způsobovat přechod buněk do aktivní formy. Z tohoto důvodu byly u izolátů druhé pacientky dále provedeny pokusy, při kterých byl zjišťován vliv vybraných supernatantů na rychlost růstu, rychlost hynutí po působení antibiotik a na míru vyrůstání z perzistentního stavu.

TD Test

TD test je metoda rozšiřující difúzní test navržená skupinou Gefen a spol., kterou lze využít pro posouzení schopnosti perzistovat u jednotlivých izolátů (Gefen et al. 2017). Využity byly antibiotické disky s ciprofloxacinem (1 a 10 µg), oxacilinem (1 µg) a vankomycinem (5 µg).

Pro orientační stanovení schopnosti perzistovat bylo zapotřebí ke srovnání zvolit vhodné antibiotikum v takové koncentraci, jež nebude příliš vysoká ani nízká pod hodnotou MIC a současně bude dobře difundovat médiem. Vankomycin ani 10µg disk s ciprofloxacinem neumožňovaly nárůst perzisterů dostatečně velký pro porovnání mezi izoláty. Po použití 1µg disku s ciprofloxacinem byl nejvyšší počet kolonií v inhibiční zóně narostlý na jejím okraji. U těchto kolonií se patrně jedná spíše o buňky tolerantní k danému antibiotiku (Kotková et al., 2019), proto se jako nejvhodnější pro srovnání množství perzisterů zdál být oxacilin (1 µg), u kterého byl vysoký nárůst kolonií v inhibiční zóně po nahrazení antibiotického disku diskem s glukózou a současně kolonie rostly spíše uprostřed zóny nebo okolo disku, což je pro perzistery příznačnější.

Výsledky TD testu s oxacilinovým diskem ukázaly, že vyšší množství buněk v perzistentním stavu u izolátů první pacientky se nacházelo u později odebraných izolátů 70A, 86A a 86B. U izolátů druhé pacientky počet buněk v perzistentním stavu chronologicky mírně klesal, avšak bez větších rozdílů.

Tyto výsledky naznačují, že by během chronické infekce mohlo docházet k adaptaci izolátů na hostitelské prostředí a k vyšší schopnosti v těle perzistovat. Tomu odpovídají mutace v genu pro AgrA nalezené v izolátech 86A a 86B první pacientky. AgrA je protein aktivovaný fosforylací při zvýšené koncentraci AIP molekul v okolí, který přímo i nepřímo inhibuje tvorbu biofilmu a přechod do perzistentního stavu. Nefunkční AgrA by mohl mít za následek zvýšenou tvorbu biofilmu a sníženou tvorbu faktorů pro virulenci. U izolátu 70A byla rovněž zaznamenána vyšší schopnost perzistovat vůči primoizolátu, což by se dalo vysvětlit nárůstem záměnových mutací v šesti genech (viz kapitola 8.1). Dva z nich jsou transkripční regulátory, ačkoliv o vlivu těchto mutací se dá pouze spekulovat, protože zatím nebyl prokázán jejich vliv na schopnost perzistovat.

Izoláty pacientky 2 nenesou mutace s prokázanou souvislostí s perzistencí, s výjimkou izolátu 77A s mutací v genu pro GTP pyrofosfokinázu. Izoláty 57A a 77C nesou mutace v hypotetických proteinech (viz kapitola 8.1), z nichž by některé mohly mít na perzistenci vliv. Dle výsledků TD testu, kdy byl počet narostlých kolonií podobný u všech testovaných izolátů, neuděluje tyto mutace buňkám vyšší schopnost perzistovat.

Křivky hynutí a míra perzistence

Metoda pro stanovení CFU v průběhu křivek hynutí je založena na kultivaci buněk s antibiotiky po čtyři, případně šest hodin. Během této doby dochází k hynutí citlivých buněk, avšak část populace přežívá antibiotické působení v dormantním stavu. Po odstranění antibiotik centrifugací se perzisteři vrací do svého metabolicky aktivního stavu, ve kterém jsou schopny růstu. Odebrané vzorky byly po odstranění antibiotik vysety kapkovým výsevem na Petriho misky s BHI médiem, kde po 24hodinové kultivaci narostly kolonie z přeživších buněk. Vzorky byly odebrány a vysety i z času před přidáním antibiotik, aby bylo možné srovnat počet kolonií před a po působení antibiotik. Vzorky byly vysety ve třech až čtyřech ředěních, ze kterých byl pro určení průběhu křivky hynutí vždy zvolen výsev v takovém ředění, ve kterém byly kolonie počítatelné.

Stanovení CFU v průběhu křivek hynutí umožnilo přesněji srovnat schopnost vyrůstání z perzistence mezi izoláty. Perzistentní populace je charakteristická svou bifázickou křivkou

hynutí s prudkým průběhem v první fázi a ustálením počtu přeživších buněk ve fázi druhé. Podobný průběh byl pozorován u křivek hynutí studovaných izolátů, což značí přítomnost perzisterů. Pro snadnější srovnání izolátů byla z křivek hynutí stanovena míra perzistence. Ta byla vyjádřena jako průměr hodnot CFU z odběrů posledních tří hodin, ve kterých byl již počet přeživších buněk více ustálený. Výsledná míra perzistence se neukázala být příliš rozdílná mezi izoláty druhé pacientky, avšak u první pacientky překvapivě izoláty 86A, 86B a především 70A vykazovaly nižší schopnost tvořit perzistery oproti primoizolátu, a to u všech tří použitých antibiotik, s největším rozdílem po použití vankomycinu. V porovnání s primoizolátem poklesla míra perzistence u izolátů 86A a 86B o více než jeden řád po použití všech tří typů antibiotik. U izolátu 70A byl pokles po oxacilinu podobný, zatímco po působení ciprofloxacinu a vankomycinu poklesla míra perzistence až o dva řády. Výsledek TD testu naopak naznačoval nejvyšší obsah perzisterů u těchto tří izolátů.

Nárůst kolonií na miskách byl u některých izolátů významně ovlivněn přidáním supernatantem rozetřeným na BHI médiu před výsevem. Nejvýraznější rozdíly nastaly u izolátů první pacientky 70A, 86A a 86B, kdy bez přidání supernatantu nerostly kolonie na Petriho miskách téměř vůbec. Naopak příliš velký rozdíl v nárůstu bez a s přidáním supernatantem nebyl pozorován u izolátů 68VI a 69A, ani u izolátů druhé pacientky.

Je možné, že izoláty 70A, 86A a 86B tvoří perzistery ve větší míře než primoizolát, avšak obtížněji dochází k jejich přechodu zpět do aktivní formy. Izoláty 86A a 86B obsahují mutaci v *agrA* a izolát 70A mutace v šesti genech (viz kapitola 8.1), z nichž by některé mohly perzistenci a vyrůstání z ní ovlivňovat. Je pravděpodobné, že z důvodu poškozeného Agr systému jsou tyto izoláty uvedeny do hlubšího stavu perzistence a k přechodu do aktivního růstu vyžadují neznámé molekuly obsažené v supernatantech. Takovými molekulami by mohly být kupříkladu peptidy AIP účastníci se mechanismu Quorum sensing, jež jsou podstatné pro mezibuněčnou komunikaci důležitou pro vyrůstání. Toto vysvětlení by odpovídalo i vyššímu nárůstu perzisterů u TD testu, kde se dá předpokládat, že se při vysetí buněk na celou plochu Petriho misky vyskytuje v agaru vyšší koncentrace extracelulárních sloučenin než v naneseném supernatantu u vysetých spotů při stanovení CFU u křivek hynutí.

Od druhé pacientky byly stanoveny křivky hynutí a míra perzistence pro izoláty 29A, 57A a 77A. Izolát 77C v tomto případě testovaný nebyl z důvodu stejného fenotypu jako 77A. Izoláty od pacientky 2 nenesou žádné mutace doposud považované za významné z hlediska perzistence, což potvrzuje i stanovená míra perzistence, kde není znatelný rozdíl mezi jednotlivými izoláty. Zdá se, že mutace u izolátů 57A a 77A v hypotetických proteinech a mutace v GTP pyrofosfokináze nemění u buněk schopnost vyrůstat z perzistentního stavu. U

všech izolátů druhé pacientky byla zjištěna vyšší hodnota MIC ciprofloxacinu a oxacilinu. Vzhledem k mírnějšímu průběhu křivek hynutí stanovených pomocí CFU by zvýšené hodnoty MIC mohly naznačovat, že se jedná z větší části o buňky tolerantní nežli perzistentní.

Mezi všemi testovanými izoláty byl metodou CFU zaznamenán největší pokles přeživších buněk při působení ciprofloxacinu. Po jeho působení kolonie rostly v nižší míře, než tomu bylo po přidání oxacilinu či vankomycinu.

Průtoková cytometrie

V časech odebrání vzorků pro stanovení CFU v průběhu křivek hynutí byly současně pro rozlišení fyziologického stavu buněk po působení antibiotik měřeny membránový potenciál a metabolická aktivita na průtokovém cytometru. Vzorky byly obarveny fluorescenčními barvivy DiOC₂(3) a TO-PRO-3, díky kterým bylo možné odlišit živé a mrtvé buňky se zachovaným a se sníženým membránovým potenciálem. Membránový potenciál byl tímto způsobem měřen u izolátů obou pacientek s výjimkou 77C. Zvláště byla měřena kultura buněk s vloženým plazmidem obsahujícím promotorovou sekvenci sigB sfúzovanou s GFP. Tyto buňky nemohly být obarveny DiOC₂(3), jelikož by se překrývalo emisní spektrum se spektrem GFP, proto byl použit C₁₂-resazurin, který umožnil měření redoxního potenciálu a odlišení buněk na buňky s vysokým poměrem NADH:NAD⁺ (metabolicky aktivní), s vyšším poměrem NAD⁺ (metabolicky neaktivní) a rovněž rozlišit buňky, ve kterých je exprimováno GFP jako reportér genu *sigB*. Metabolická aktivita byla měřena pouze u izolátů 29A, 57A, 77A a 77C, do kterých se podařilo transdukovat plazmid s reportérovým genem pro GFP. Do buněk izolátů pacientky 1 nebylo možné plazmid transdukcí vložit, jelikož se nejspíše jednalo o lyzogeny bakteriofágů Φ11 a Φ80. GFP exprimovaly téměř všechny naměřené buňky, a to i ve vzorcích odebraných těsně před přidáním antibiotik, což značí, že SigB bylo pravděpodobně produkováno i u buněk v exponenciální fázi růstu.

U metabolické aktivity i membránového potenciálu se výsledné naměřené subpopulace odlišovaly po použití antibiotik ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu, avšak mezi jednotlivými chronologickými izoláty v rámci jednoho pacienta se výrazný rozdíl většinou neobjevoval. Z naměřených výsledků byla vidět především výrazná odlišnost v účinku ciprofloxacinu na buňky. Na rozdíl od oxacilinu a vankomycinu způsoboval ciprofloxacin u všech testovaných izolátů rapidní pokles v metabolické aktivitě, zatímco membránový potenciál zůstával u vysokého počtu buněk zachován a lišil se mezi izoláty pacientek 1 a 2. U izolátů první pacientky (68VI, 69A, 70A, 86A, 86B), jež mají záměnovou mutaci v

genu *rsbU*, zůstával vysoký počet buněk se zachovaným membránovým potenciálem po celé 4 hodiny od působení ciprofloxacinu, zatímco u izolátů druhé pacientky (29A, 57A, 77A) s délkou působení antibiotika poměr těchto buněk postupně klesal a od 3. hodiny v populaci již převažovaly buňky se sníženým membránovým potenciálem. Záměna fenylalaninu za tyrozin na 77. aminokyselinové pozici v RsbU pravděpodobně přispívá k udržení membránového potenciálu buněk i po delší době působení antibiotika. Vysvětlením by mohlo být, že součástí SigB dependentního regulonu jsou i Na^+/H^+ antiportéry (Pané-Farré et al. 2006). Míra exprese genu *sigB* u první pacientky s mutacemi v *rsbU* však nemohla být prokázána vzhledem k neúspěšnému vložení jeho reportéru do buněk. Pro potvrzení vlivu mutace genu *rsbU* na udržení membránového potenciálu bude nezbytné změřit míru exprese *sigB* i u izolátů pacientky 1. V porovnání s primoizoláty nedocházelo u jednotlivých izolátů k výrazným změnám. Současně ciprofloxacin navozoval u většiny populace u izolátů pacientky 2 snížení metabolismu, nejen u nejvyššího počtu buněk, ale způsobil přechod do metabolicky neaktivní formy až na úroveň kontrolního vzorku po působení CCCP.

Naměřen byl vždy po působení ciprofloxacinu největší celkový počet živých buněk, čemuž odpovídalo i průběžné měření optické denzity. U křivek hynutí stanovených pomocí CFU však vyrůstalo na Petriho miskách vždy nejméně kolonií po působení ciprofloxacinu, což je v rozporu s naměřeným vysokým počtem buněk ve vzorcích. Zdá se, že ciprofloxacin buňky nejméně zabíjel, avšak způsoboval přechod buněk do hlouběji neaktivního stavu a bránil tak jejich opětovnému přechodu do aktivní formy. Ciprofloxacin je fluorochinolonové antibiotikum inhibující enzymy topoizomerázu IV a gyrázu, čímž zabraňuje buňce v replikaci a transkripci a způsobuje přechod do dormantního stavu. Za předpokladu, že všechny metabolicky neaktivní buňky jsou uvedeny do stavu perzistence lze usuzovat, že ciprofloxacin přispívá ke vzniku perzisterů s největší frekvencí.

Vankomycin i oxacilin způsobily již během první hodiny prudký vzestup subpopulace buněk se sníženým membránovým potenciálem. Především po působení vankomycinu zůstalo živých buněk s membránovým potenciálem v populaci pouze malé množství. Většina buněk přešla do stavu sníženého membránového potenciálu a v populaci byla i ve čtvrté hodině stále detekovatelná malá subpopulace hynoucích buněk. Velikosti rozlišených subpopulací se ustálily již v první hodině po přidání vankomycinu a v průběhu času se poměr buněk již neměnil. Izoláty 70A a 86A se od primoizolátu 68VI mírně lišily větším zastoupením buněk se sníženým potenciálem. U izolátu 86B naopak v populaci od druhé hodiny přibývalo buněk živých se zachovaným membránovým potenciálem. Tento izolát má posunovou mutaci ve fosfatáze RsbU. Pravděpodobně vzniká nefunkční protein, který nemůže defosforylací

aktivovat anti-anti-sigma faktor RsbV, a proto byl měl být alternativní sigma faktor σ^B udržován v neaktivním stavu. Mezi izoláty druhé pacientky nebyly výrazné rozdíly od primoizolátu 29A, a to ani v metabolické aktivitě ani v membránovém potenciálu.

Při srovnání podílu buněk se sníženým membránovým potenciálem po použití oxacilinu stoupalo jejich množství v po sobě jdoucích izolátech, tj. v pořadí 68VI, 69A, 70A, 86A, 86B. Izoláty druhé pacientky přecházely do stavu se sníženým potenciálem po použití oxacilinu v menší míře, nicméně je rovněž možné pozorovat mírné zvyšování mezi izoláty v pořadí 29A, 57A a 77A. U ciprofloxacinu a vankomycinu mezi primoizolátem 29A a dalšími izoláty druhé pacientky nebyl významný rozdíl.

Z daných výsledků vyplývá, že použití ciprofloxacinu vedlo u všech izolátů k největšímu poklesu metabolické aktivity. Naproti tomu oxacilin a vankomycin v populaci indukovaly vznik vyššího poměru buněk se sníženým membránovým potenciálem. Ciprofloxacin svým působením inhibuje gyrázu a topoizomerázu v buňce, způsobuje zlomy DNA a inhibuje replikaci (Tamayo et al. 2009). Z principu jeho působení je evidentní, že snižuje metabolickou aktivitu buněk. Snížená metabolická aktivita pravděpodobně působí na vznik perzisterů. Oxacilin a vankomycin jsou antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny (Beneš 2018) a způsobily rapidní pokles membránového potenciálu již první hodinu od jejich přidání ke kultuře. Snížení membránového potenciálu by mohlo být způsobeno narušením buněčné stěny.

Kontinuální měření optické denzity

Během experimentů pro stanovení křivek hynutí metodou CFU mělo přidání sterilních supernatantů na Petriho misku s BHI médiem vždy stimulační účinky, avšak byly pozorovány mírné rozdíly při použití supernatantů z nočních kultur odlišných izolátů. Přidání supernatantu 68VI k izolátu 86A způsobilo spíše pomalé vyrůstání, zatímco supernatant 39A umožnil nárůst kolonií již během 24 hodin kultivace a na misce s tímto supernatantem rostlo výrazně více kolonií než po přidání vlastního supernatantu 86A. Tento fenomén vedl k myšlence, že by supernatanty odlišných izolátů mohly různě ovlivňovat schopnost vyrůstat z perzistence a potenciálně i jiné buněčné procesy. Testován byl vliv supernatantů na růstovou křivku, křivku hynutí po působení oxacilinu a vyrůstání po působení ciprofloxacinu a oxacilinu u všech čtyř izolátů druhé pacientky (29A, 57A, 77A, 77C). Použity byly sterilní supernatanty z nočních kultur izolátů 29A, 57A, 77A, 77C, 86B a 39A. Pro sledování vlivu supernatantů byly buňky

měřeny na přístroji Microplate reader 800TS, kde byla kontinuálně v 10minutovém intervalu po dobu 12 hodin měřena optická denzita.

Růst

Pro měření růstu byla kultura přeočkována do obohaceného BHI média na OD₆₀₀ 0,05 a 0,005 a ke zředěným kulturám byly přidány sterilní supernatanty. Ke srovnání vlivu supernatantů byly využity výsledky z počátečním OD₆₀₀ 0,005, kde byl rozdíl výraznější. Zatímco supernatant 29A vykazoval u všech izolátů vliv na rychlost růstu nejvíce podobnou vzorkům bez přidaného supernatantu, supernatanty ostatních izolátů rychlost růstu spíše snižovaly. U všech izolátů nastávala nejnižší specifická rychlost růstu po přidání supernatantu 86B, u izolátu 77C byla naměřena nízká rychlost růstu také po přidání supernatantu 39A.

Přidání jakéhokoliv supernatantu vždy alespoň mírně snižovalo rychlost růstu populace, proto lze předpokládat, že supernatanty obsahovaly v různých množstvích neznámé molekuly zpomalující množení buněk. Izolát 29A je zcela bez mutací, a pravděpodobně proto přidání jeho sterilního supernatantu nejméně ovlivňuje rychlost růstu. U ostatních izolátů byly nalezeny mutace související s Agr systémem a stringentní odpovědí a byla pozorovatelná nižší schopnost růstu populace.

Izolát 86B, jehož supernatant zpomaloval růst nejvíce, je posledním chronologicky odebraným izolátem od pacientky 1. Obsahuje posunovou a substituční mutaci v *rsbU* a posunovou mutaci v genu pro AgrA. Z tohoto důvodu má zřejmě nefunkční Agr systém a neměl by produkovat molekuly AIP ani jiné jimi pozitivně regulované molekuly.

Překvapivě supernatant 77C vždy způsoboval pomalejší růst než supernatant 77A. Jediný zjištěný rozdíl mezi těmito izoláty je trunkační mutace v genu pro GTP pyrofosfokinázu RelP u izolátu 77A. Kromě toho oba izoláty mají mutaci v proteinu MnmE, u kterého byl prokázán vliv na růst buněk (Federle et al. 2019). MnmE je GTPáza modifikující tRNA. Snižovaný růst buněk a tedy i celé populace u izolátu 77C by mohl být způsoben právě mutací MnmE, zatímco u izolátu 77A pravděpodobně došlo ke vzniku kompenzační mutace v proteinu RelP, a proto se vliv mutace natolik neprojevil.

U izolátu 77C ke snížení růstové rychlosti docházelo také se supernatantem izolátu 39A, který je Agr typu II, ovšem pouze při vyšší počáteční optické denzitě. Tento jev napovídá, že by mohly být zodpovědné molekuly AIP, jež ve vyšší koncentraci zřejmě interagují s Agr systémem izolátu 77C, který je typu I a snižují rychlost růstu. Proč je tento jev vidět pouze u izolátu 77C však prozatím není jasné.

Hynutí s oxacilinem

Pro srovnání vlivu supernatantů na hynutí izolátů byly odebrané buňky resuspendovány v obohaceném BHI médiu, k němuž byly přidány jednotlivé sterilní supernatanty připravené z nočních kultur. K buňkám byl přidán také oxacilin a měřeno bylo hynutí buněk po dobu 12 hodin. Rychlost hynutí byla stanovena ze vzorků ředěných v poměru 1:3, u kterých byl vliv supernatantů snadněji rozlišitelný. Z křivek hynutí byl stanovený časový úsek, ve kterém při logaritmickém zobrazení velikost populace klesala lineárně a z tohoto úseku byla stanovena směrnice přímky. Velikosti směrnic přímek umožnily srovnání vlivu supernatantů na hynutí jednotlivých izolátů.

Populace v čistém obohaceném BHI médiu hynula výrazně pomalejším tempem a přidání supernatantu k buňkám vždy hynutí alespoň mírně urychlilo. Nejrychleji hynuly buňky po použití supernatantů 29A, 57A a 77C. Jedná se o supernatanty izolátů bez zjištěných významných mutací. Na základě těchto výsledků lze predikovat, že supernatanty obsahují molekuly urychlující hynutí populace. Izoláty 77A, 86B a 39A, jejichž supernatanty příliš neurychlovaly hynutí pravděpodobně takových molekul produkují méně. U izolátu 39A, který hynutí neurychloval, nebyly nalezeny mutace související s Agr, nicméně kóduje Agr systém typu II, jenž inhibuje aktivaci Agr systému I, který se vyskytuje u chronologických izolátů obou testovaných pacientek. Ovlivňující molekulou by tedy mohly být molekuly AIP, které dávají buňkám signál o zvýšené koncentraci buněk mechanismem Quorum sensing. Tyto molekuly obsažené v supernatantu po přidání k buňkám indukují produkci toxinů a PSM peptidů lyzujících okolní buňky. Izolát 86B v souvislosti s posunovou mutací v transkripčním regulátoru AgrA postrádá funkční Agr systém. Tento předpoklad byl potvrzen sníženou hemolýzou na krevním agaru provedenou RNDr. Alešem Ulrychem, Ph.D. v Mikrobiologickém Ústavu AVČR. Nefunkční Agr systém brání produkci molekul AIP a měly by se zde syntetizovat toxiny a PSM peptidy v menší míře.

U defektu v obou malých (p)ppGpp syntetázách RelP a RelQ byla skupinou T. Geigera popsána nižší odolnost k antibiotikům působících na buněčnou stěnu, která byla vysvětlena přispíváním (p)ppGpp ke vzniku tolerance ke stresu buněčné stěny (Geiger et al. 2014). V této práci však nebylo potvrzeno rychlejší hynutí u izolátu 77A s trunkační mutací v proteinu RelP. Tato mutace by rovněž měla vést ke snížené hladině (p)ppGpp a tím snižovat syntézu PSM molekul (Geiger et al. 2012). Vzhledem k výsledkům měření je pravděpodobné, že trunkační mutace v proteinu RelP způsobuje snížení syntézy PSM molekul a že PSM molekuly by mohly být zodpovědné za rychlejší hynutí populace buněk.

Vyrůstání z perzistence

Pro navození vyrůstání z perzistence byly buňky kultivovány 18 hodin s antibiotiky ciprofloxacinem nebo oxacilinem. Během této doby byly citlivé buňky usmrceny a přežily pouze buňky v perzistentním stavu. Odstranění antibiotik centrifugací umožnilo perzisterům přejít zpět do metabolicky aktivní formy. Buňky byly resuspendovány v obohaceném BHI médiu, k němuž byly přidány jednotlivé sterilní supernatanty z nočních kultur. Supernatanty zjevně ovlivňovaly rychlost vyrůstání buněk z perzistentního stavu.

Výsledky měření naznačovaly, že supernatant 39A s Agr typem II působil na vyrůstání se stejným účinkem jako supernatanty 29A a 77C s Agr typem I bez relevantních mutací. Tyto supernatanty navozovaly delší Lag fázi a buňky z perzistence vyrůstaly později. Schopnost vyrůst z perzistentního stavu zřejmě není příliš ovlivněna molekulami AIP, jelikož v takovém případě by se buňky po přidání supernatantu 29A chovaly odlišně než po přidání 39A, u kterého by mělo docházet k inhibici Agr systému.

Naopak supernatant izolátu 86B, jenž by neměl obsahovat AIP molekuly, u všech izolátů přechod do metabolicky aktivního stavu usnadňoval. Stejně tomu bylo u supernatantů 57A a 77A. Izolát 77A obsahuje mutaci v proteinu RelP, která vycházejíc z předchozího experimentu pravděpodobně způsobuje nižší produkci peptidů PSM, nejspíše skrze nižší hladinu AIP. Izolát 57A obsahuje mutaci v hypotetickém proteinu, který by potencionálně mohl mít vliv na produkci některých molekul ovlivňujících vyrůstání.

Zdá se, že supernatanty izolátů 57A, 77A a 86B, které nejspíše obsahují nižší hladinu AIP či jimi regulovaných molekul usnadňují buňkám vyrůst z perzistence, zatímco přidání oněch molekul v supernatantech 29A, 77C a 39A, které pocházejí od izolátů bez mutací v Agr systému, schopnost vyrůstání snižuje. Současně však z výsledků vyplývá, že samotné AIP molekuly pravděpodobně nejsou zodpovědné za ovlivnění vyrůstání, neboť nastává stejný účinek po přidání AIP molekul Agr typu I (29A, 77C) i typu II (39A). Jedná se spíše o prozatím neurčené molekuly, jež by mohly být v buňkách přes AIP molekuly aktivované a následně nahromaděné v samotném supernatantu. Pro vysvětlení se nabízí toxiny PSM, jejichž produkované množství by mělo korelovat s hladinou AIP molekul, jelikož jsou aktivovány regulátorem odpovědi AgrA. Ve vyšší koncentraci, nejspíše se vyskytující u izolátů 29A, 77C a 39A, by PSM peptidy mohly zpomalovat vyrůstání buněk z perzistence.

Výsledné křivky vyrůstání se lišily mezi vzorky ředěnými v poměru 1:3 a vzorky neředěnými, u kterých byl naměřen kolísavý průběh. Zdá se, že vyšší počáteční koncentrace

buněk zhoršovala vyrůstání buněk, což by potvrzovalo domněnku s obsahem molekul snižujících bakteriální růst produkovaných buňkami do bezprostředního okolí.

V současné době v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. pod vedením RNDr. Aleše Ulrycha, Ph.D. probíhá LC/MS analýza sterilních supernatantů za účelem objasnění molekul nacházejících se v supernatantech.

SOUHRN

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak adaptační mutace vzniklé v průběhu chronických infekcí ovlivňují schopnost bakterií *Staphylococcus aureus* perzistovat a objasnit, jaký vliv na růst, hynutí a vyrůstání z perzistence mají molekuly obsažené v bezbuněčných supernatantech médií po kultivaci do stacionární fáze kultury. Studováno bylo celkem devět klinických izolátů získaných od dvou pacientek s diagnostikovanou cystickou fibrózou. V diplomové práci bylo dosaženo následujících cílů:

1. Byly charakterizovány chronologické izoláty od dvou pacientek s rozdílnými adaptačními mutacemi.
2. Pomocí TD Testu byla určena schopnost izolátů perzistovat a bylo prokázáno, že mutace v genech Agr systému zvyšují vznik perzisterů v populaci.
3. Stanovením CFU v průběhu křivek hynutí bylo zjištěno, že tato metoda nemusí být spolehlivá s výskytem adaptačních mutací v Agr systému, které snižují schopnost vystupovat ze stavu perzistence.
4. Posunová mutace v *agrA* u dvou posledních chronologicky odebraných izolátů od první pacientky a mutace v některých ze šesti hypotetických proteinů nacházejících se u izolátu 70A zřejmě buňkám umožňuje vstoupit do hlubšího stavu perzistence, ze kterého se hůře vracejí do své virulentní formy.
5. Studovaná antibiotika mají různý vliv na metabolickou aktivitu buněk. Ciprofloxacin významně snižuje redoxní potenciál buněk, ale na membránový potenciál má menší vliv. Naopak oxacilin a vankomycin způsobují méně výrazný pokles redoxního potenciálu, ale významně snižují membránový potenciál.
6. Podařilo se optimalizovat metodu kontinuálního měření optické denzity ke srovnání vlivu supernatantů na růstové charakteristiky studovaných izolátů.
7. Rychlost růstu, hynutí a vyrůstání jsou ovlivněny doposud neurčenými molekulami z extracelulárního prostředí kultur, jejichž vysvětlení bude možné po stanovení složení jednotlivých sterilních supernatantů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, *305*(5690), 1622–1625.
- Baldry, M., Bojer, M. S., Najarzadeh, Z., Vestergaard, M., Meyer, R. L., Otzen, D. E., & Ingmer, H. (2020). Phenol-Soluble Modulins Modulate Persister Cell Formation in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2804.
- Balgová, B. T. (2021). Studium mechanizmů perzistence vůči antibiotikům u *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Bassler, B. L. (2002). Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell*, *109*(4), 421–424.
- Benarroch, J. M., & Asally, M. (2020). The Microbiologist's Guide to Membrane Potential Dynamics. *Trends in Microbiology*, *28*(4), 304–314.
- Beneš, J. (2018). Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. Grada publishing.
- Bibalan, M. H., Shakeri, F., Javid, N., Ghaemi, A., & Ghaemi, E. A. (2014). Accessory gene regulator types of *Staphylococcus aureus* isolated in Gorgan, North of Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *8*(4), DC07.
- Bigger, J. W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*, *244*(6320), 497–500.
- Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bächi, B., & Projan, S. (2004). Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* σ B Regulon. *Journal of Bacteriology*, *186*(13), 4085.
- Bischoff, M., Entenza, J. M., & Giachino, P. (2001). Influence of a Functional sigB Operon on the Global Regulators sar and agr in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *183*(17), 5171.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A. C., Benito, Y., Jacquier, A., Gaspin, C., Vandenesch, F., & Romby, P. (2007). *Staphylococcus aureus* RNAPIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes & Development*, *21*(11), 1353.
- Bojer, M. S., Lindemose, S., Vestergaard, M., & Ingmer, H. (2018). Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *0*(FEB), 255.

- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2008). agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(4).
- Boulet, M. L., Isabelle, C., Guay, I., Brouillette, E., Langlois, J. P., Jacques, P. É., Rodrigue, S., Brzezinski, R., Beauregard, P. B., Bouarab, K., Boyapelly, K., Boudreault, P. L., Marsault, É., & Malouin, F. (2018). Tomatidine Is a Lead Antibiotic Molecule That Targets *Staphylococcus aureus* ATP Synthase Subunit C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6).
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology* 2016 14:5, 14(5), 320–330.
- Bryan, L. E., & Kwan, S. (1983). Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(6), 835–845.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 143–155). Nature Publishing Group.
- Coleman, G. (1985). A comparison of the patterns of extracellular proteins produced by the high alpha-toxin-secreting organism *Staphylococcus aureus* (Wood 46) during aerobic and anaerobic growth. *Journal of General Microbiology*, 131(2), 405–408.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. (1999). The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infection and Immunity*, 67(10), 5427.
- DeLeo, F. R., Diep, B. A., & Otto, M. (2009). Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 23, Issue 1, pp. 17–34). NIH Public Access.
- Donegan, N. P., & Cheung, A. L. (2009). Regulation of the mazEF Toxin-Antitoxin Module in *Staphylococcus aureus* and Its Impact on sigB Expression. *Journal of Bacteriology*, 191(8), 2795.
- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R. P., Bes, M., Etienne, J., & Lina, G. (2002). High Genetic Variability of the agr Locus in *Staphylococcus* Species. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1180.
- Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J., & Goebel, W. (2021). Persistence of Intracellular Bacterial Pathogens—With a Focus on the Metabolic Perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 847.

- Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria - *Knihy Google*. Springer Science & Business Media., 1140.
- Federle, M. J., Liao, S., Anisimov, A. P., Tian, Y., Zhou, R., Gao, T., Yuan, F., Liu, Z., Liu, W., Zhou, D., Yang, K., Duan, Z., Guo, R., Liang, W., & Hu, Q. (2019). MnmE, a Central tRNA-Modifying GTPase, Is Essential for the Growth, Pathogenicity, and Arginine Metabolism of *Streptococcus suis* Serotype 2. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | *Www.Frontiersin.Org*, 1, 173.
- Finkelstein, R. A., & Sulkin, S. E. (1958). Characteristics of Coagulase Positive and Coagulase Negative Staphylococci in Serum-Soft Agar. *Journal of Bacteriology*, 75(3), 339–344.
- Fowler, V. G., Sakoulas, G., McIntyre, L. M., Meka, V. G., Arbeit, R. D., Cabell, C. H., Stryjewski, M. E., Eliopoulos, G. M., Reller, L. B., Corey, G. R., Jones, T., Lucindo, N., Yeaman, M. R., & Bayer, A. S. (2004). Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *Journal of Infectious Diseases*, 190(6), 1140–1149.
- García-Betancur, J.-C., Goñi-Moreno, A., Horger, T., Schott, M., Sharan, M., Eikmeier, J., Wohlmuth, B., Zerneck, A., Ohlsen, K., Kuttler, C., & Lopez, D. (2017). Cell differentiation defines acute and chronic infection cell types in *Staphylococcus aureus*. *ELife*, 6.
- Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., & Balaban, N. Q. (2017). TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. *Scientific Reports*, 7.
- Geiger, T., Francois, P., Liebeke, M., Fraunholz, M., Goerke, C., Krismer, B., Schrenzel, J., Lalk, M., & Wolz, C. (2012). The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLoS Pathogens*, 8(11).
- Geiger, T., Kästle, B., Gratani, F. L., Goerke, C., & Wolz, C. (2014). Two Small (p)ppGpp Synthases in *Staphylococcus aureus* Mediate Tolerance against Cell Envelope Stress Conditions. *Journal of Bacteriology*, 196(4), 894.
- Geisinger, E., Muir, T. W., & Novick, R. P. (2009). agr receptor mutants reveal distinct modes of inhibition by staphylococcal autoinducing peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1216.
- Gupta, R. K., Luong, T. T., & Lee, C. Y. (2015). RNAIII of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(45), 14036–14041.

- Herzog, S., Dach, F., de Buhr, N., Niemann, S., Schlagowski, J., Chaves-Moreno, D., Neumann, C., Goretzko, J., Schwierzeck, V., Mellmann, A., Dübbers, A., Küster, P., Schültingkemper, H., Rescher, U., Pieper, D. H., von Köckritz-Blickwede, M., & Kahl, B. C. (2019). High Nuclease Activity of Long Persisting *Staphylococcus aureus* Isolates Within the Airways of Cystic Fibrosis Patients Protects Against NET-Mediated Killing. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Hodille, E., Cuerq, C., Badiou, C., Bienvenu, F., Steghens, J. P., Cartier, R., Bes, M., Tristan, A., Plesa, A., Le, V. T. M., Diep, B. A., Lina, G., & Dumitrescu, O. (2016). Delta hemolysin and phenol-soluble modulins, but not alpha hemolysin or panton-valentine leukocidin, induce mast cell activation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(DEC), 180.
- Chan, P. F., Foster, S. J., Ingham, E., & Clements, M. O. (1998). The *Staphylococcus aureus* Alternative Sigma Factor ζ B Controls the Environmental Stress Response but Not Starvation Survival or Pathogenicity in a Mouse Abscess Model. *Journal of Bacteriology*, 180(23), 6082.
- Chatterjee, S. S., Joo, H. S., Duong, A. C., Dieringer, T. D., Tan, V. Y., Song, Y., Fischer, E. R., Cheung, G. Y. C., Li, M., & Otto, M. (2013). Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nature Medicine*, 19(3), 364.
- Cheung, A. L., Nishina, K. A., Trotonda, M. P., & Tamber, S. (2008). The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 355.
- Cheung, G. Y. C., Joo, H.-S., Chatterjee, S. S., & Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 698.
- Jabbari, S., King, J. R., & Williams, P. (2012). Cross-Strain Quorum Sensing Inhibition by *Staphylococcus Aureus*. Part 2: A Spatially Inhomogeneous Model. *Bull Math Biol*, 74, 1326–1353.
- Jarraud, S., Lyon, G. J., Figueiredo, A. M. S., Gerard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T. W., & Novick, R. P. (2000). Exfoliatin-Producing Strains Define a Fourth agr Specificity Group in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6517.
- Jenul, C., & Horswill, A. R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology Spectrum*, 7(2).
- Ji, G., Beavis, R., & Novick, R. P. (1997). Bacterial Interference Caused by Autoinducing Peptide Variants. *Science*, 276(5321), 2027–2030.
- Joo, H. S., Chatterjee, S. S., Villaruz, A. E., Dickey, S. W., Tan, V. Y., Chen, Y., Sturdevant, D. E., Ricklefs, S. M., & Otto, M. (2016). Mechanism of Gene Regulation by a *Staphylococcus aureus* Toxin. *MBio*, 7(5).

- Khoramrooz, S. S., Mansouri, F., Marashifard, M., Malek Hosseini, S. A. A., Akbarian Chenarestane-Olia, F., Ganavehei, B., Gharibpour, F., Shahbazi, A., Mirzaii, M., & Darban-Sarokhalil, D. (2016). Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microbial Pathogenesis*, *97*, 45–51.
- Koenig, R. L., Ray, J. L., Maleki, S. J., Smeltzer, M. S., & Hurlburt, B. K. (2004). *Staphylococcus aureus* AgrA Binding to the RNAlII-agr Regulatory Region. *Journal of Bacteriology*, *186*(22), 7549.
- Kotková, H. (2019). Změny ve schopnosti perzistovat u chronologických izolátů *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce, Karlova Univerzita v Praze, Praha.
- Kotková, H., Cabrnchová, M., Lichá, I., Tkadlec, J., Fila, L., Bartošová, J., & Melter, O. (2019). Evaluation of TD test for analysis of persistence or tolerance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*, *167*.
- Kretschmer, P. J., & Egan, J. B. (1975). Genetic map of the Staphylococcal bacteriophage phi 11. *Journal of Virology*, *16*(3), 642.
- Lauderdale, K. J., Boles, B. R., Cheung, A. L., & Horswill, A. R. (2009). Interconnections between Sigma B, agr, and Proteolytic Activity in *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *Infection and Immunity*, *77*(4), 1623.
- Lechner, S., Lewis, K., & Bertram, R. (2012). *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *22*(4), 235.
- Lee, C. Y., & Iandolo, J. J. (1988). Structural analysis of staphylococcal bacteriophage phi 11 attachment sites. *Journal of Bacteriology*, *170*(5), 2409–2411.
- Lin, M. H., Ke, W. J., Liu, C. C., & Yang, M. W. (2016). Modulation of *Staphylococcus aureus* spreading by water. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–9.
- Lister, J. L., & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*(DEC).
- Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J., & Lee, C. Y. (2006). Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *188*(5), 1899.
- Lyon, G. J., Mayville, P., Muir, T. W., & Novick, R. P. (2000). Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(24), 13330–13335.

- Malone, C. L., Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2007). Biosynthesis of *Staphylococcus aureus* autoinducing peptides by using the *Synechocystis* DnaB mini-intein. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6036–6044.
- Mates, S. M., Eisenberg, E. S., Mandel, L. J., Patel, L., Kaback, H. R., & Miller, M. H. (1982). Membrane potential and gentamicin uptake in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(21), 6693.
- Matsuo, M., Hiramatsu, M., Singh, M., Sasaki, T., Hishinuma, T., Yamamoto, N., Morimoto, Y., Kirikae, T., & Hiramatsu, K. (2019). Genetic and transcriptomic analyses of ciprofloxacin-tolerant *Staphylococcus aureus* isolated by the replica plating tolerance isolation system (REPTIS). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2).
- Mishra, N. N., Liu, G. Y., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Proctor, R. A., McKinnell, J., & Bayer, A. S. (2011). Carotenoid-Related Alteration of Cell Membrane Fluidity Impacts *Staphylococcus aureus* Susceptibility to Host Defense Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 526.
- Mitchell, G., Fugère, A., Pépin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E. H., Cantin, A. M., & Malouin, F. (2013). SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. *PLoS ONE*, 8(5).
- Miyazaki, E., Chen, J. M., Ko, C., & Bishai, W. R. (1999). The *Staphylococcus aureus* rsbW (orf159) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *Journal of Bacteriology*, 181(9), 2846–2851.
- Morfeldt, E., Taylor, D., Von Gabain, A., & Arvidson, S. (1995). Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO Journal*, 14(18), 4569–4577.
- Nimer, N. A. (2022). Nosocomial Infection and Antibiotic-Resistant Threat in the Middle East. *Infection and Drug Resistance*, 15, 631.
- Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H., & Shapiro, H. M. (2000). Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4), 827–834.
- Otto, M. (2015). Phenol-soluble modulins. *Int J Med Microbiol*.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., & Hecker, M. (2006). The σ B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(4-5), 237–258.

- Parlet, C. P., Brown, M. M., & Horswill, A. R. (2019). Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. In *Trends in Microbiology* (Vol. 27, Issue 6, pp. 497–507). Elsevier Ltd.
- Pokorny, A., Birkbeck, T. H., & Almeida, P. F. F. (2002). Mechanism and Kinetics of δ -Lysin Interaction with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* 2002, 41, 36, 11044–11056.
- Proctor, R. (2019). Respiration and Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*, 7(3).
- Qin, L., McCausland, J. W., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2016). PSM-Mec—A Virulence Determinant that Connects Transcriptional Regulation, Virulence, and Antibiotic Resistance in Staphylococci. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1293.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., & Ziebuhr, W. (2000). Alternative transcription factor σ B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *Journal of Bacteriology*, 182(23).
- Reyes, D., Andrey, D. O., Monod, A., Kelley, W. L., Zhang, G., & Cheung, A. L. (2011). Coordinated Regulation by AgrA, SarA, and SarR To Control agr Expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 193(21), 6020.
- Ronneau, S., Hill, P. W., & Helaine, S. (2021). Antibiotic persistence and tolerance: not just one and the same. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 76–81.
- Salzer, A., Keinhörster, D., Kästle, C., Kästle, B., & Wolz, C. (2020). Small Alarmone Synthetases RelP and RelQ of *Staphylococcus aureus* Are Involved in Biofilm Formation and Maintenance Under Cell Wall Stress Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Schurig-Briccio, L. A., Solorzano, P. K. P., Lencina, A. M., Radin, J. N., Chen, G. Y., Sauer, J., Kehl-Fie, T. E., & Gennis, R. B. (2020). Role of respiratory NADH oxidation in the regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *EMBO Reports*, 21(5).
- Schwartz, K., Syed, A. K., Stephenson, R. E., Rickard, A. H., & Boles, B. R. (2012). Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 8(6).
- Senn, M. M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., Flückiger, U., Berger-Bächli, B., & Bischoff, M. (2005). Molecular Analysis and Organization of the σ B Operon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 8006.
- Shapiro, H. M. (2001). Multiparameter flow cytometry of bacteria: Implications for diagnostics and therapeutics. *Cytometry*, 43(3), 223–226.

- Siegmund, A., Afzal, M. A., Tetzlaff, F., Keinhörster, D., Gratani, F., Paprotka, K., Westermann, M., Nietzsche, S., Wolz, C., Fraunholz, M., A. Hübner, C., Löffler, B., & Tuchscher, L. (2021). Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells is promoted by the absence of phenol-soluble modulins. *Virulence*, *12*(1), 1186.
- Spaan, A. N., Van Strijp, J. A. G., & Torres, V. J. (2017). Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology* *2017 15*:7, *15*(7), 435-447.
- Sperber, W. H., & Tatini, S. R. (1975). Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*, *29*(4), 502–505.
- Sun, F., Liang, H., Kong, X., Xie, S., Cho, H., Deng, X., Ji, Q., Zhang, H., Alvarez, S., Hicks, L. M., Bae, T., Luo, C., Jiang, H., & He, C. (2012). Quorum-sensing agr mediates bacterial oxidation response via an intramolecular disulfide redox switch in the response regulator AgrA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(23), 9095–9100.
- Sweeney, E., Harrington, N. E., Harley Henriques, A. G., Hassan, M. M., Crealock-Ashurst, B., Smyth, A. R., Hurley, M. N., Tormo-Mas, M. Á., & Harrison, F. (2021). An ex vivo cystic fibrosis model recapitulates key clinical aspects of chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology (United Kingdom)*, *167*(1), 1–15.
- Tamayo, M., Santiso, R., Gosalvez, J., Bou, G., & Fernández, J. L. (2009). Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an in situ DNA fragmentation assay. *BMC Microbiology*, *9*, 69.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 603–661.
- Tuchscher, L., Löffler, B., & Proctor, R. A. (2020). Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). *Frontiers in Microbiology*, *11*.
- Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*, 12.
- Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003). Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(1), 317.

- Wang, L., Quan, C., Xiong, W., Qu, X., Fan, S., & Hu, W. (2014). New insight into transmembrane topology of *Staphylococcus aureus* histidine kinase AgrC. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(3), 988–993.
- Wang, Y., Bojer, M. S., George, S. E., Wang, Z., Jensen, P. R., Wolz, C., & Ingmer, H. (2018). Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Scientific Reports*, 8(1).
- Waters, E. M., Rowe, S. E., O’Gara, J. P., & Conlon, B. P. (2016). Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLOS Pathogens*, 12(12), e1006012.
- West, A. H., & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 369–376.
- Wright, J. S., Jin, R., & Novick, R. P. (2005). Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1691–1696.
- Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., & Zou, B. (2020). NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5(1), 1–37.
- Xiong, Y. Q., Willard, J., Yeaman, M. R., Cheung, A. L., & Bayer, A. S. (2006). Regulation of *Staphylococcus aureus* α -Toxin Gene (hla) Expression by agr, sarA and sae In Vitro and in Experimental Infective Endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(9), 1267–1275.
- Xu, T., Wang, X. Y., Cui, P., Zhang, Y. M., Zhang, W. H., & Zhang, Y. (2017). The Agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 2189.
- Yarwood, J. M., McCormick, J. K., & Schlievert, P. M. (2001). Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1113–1123.
- Zielinska, A. K., Beenken, K. E., Joo, H. S., Mrak, L. N., Griffin, L. M., Luong, T. T., Lee, C. Y., Otto, M., Shaw, L. N., & Smeltzer, M. S. (2011). Defining the Strain-Dependent Impact of the Staphylococcal Accessory Regulator (sarA) on the Alpha-Toxin Phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 2948.