MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno 2013 **Bc. Petra Formanová**

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární biologie

Vliv lyzogenie na citlivost kmenů *Staphylococcus aureus* k polyvalentním fágům

Diplomová práce

Petra Formanová

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc

Brno 2013

Bibliografický záznam

Autor: Bc. Petra Formanová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Vliv lyzogenie na citlivost kmenů *Staphylococcus aureus* k polyvalentním fágům

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc

Akademický rok: 2012/2013

Počet stran: 77

Klíčová slova: bakteriofágy, fágová terapie, lyzogenie, *Staphylococcus aureus*

Bibliographic Entry

Author: Bc. Petra Formanová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Influence of lysogeny on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains to polyvalent bacteriophage

Degree Programme: Biology

Field of Study: Molecular biology and genetics

Supervisor: prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc

Academic Year: 2012/2013

Number of Pages: 77

Keywords: bacteriophages, phage therapy, lysogeny, *Staphylococcus aureus*

ABSTRAKT

Staphylococcus aureus je oportunní patogen, který u lidí s oslabenou imunitou vyvolává závažná onemocnění, jež mohou mít fatální následky. V současné době je léčba těchto infekcí značně problematická a to díky zvyšujícímu se počtu kmenů rezistentních k antibiotikům. Východiskem by mohla být fágová terapie, která se již řadu let aplikuje v některých východních státech, například v Gruzii, Rusku nebo Polsku. Jedním z problémů fágové terapie je rezistence vůči polyvalentním fágům, které se k této terapii používají. Tato rezistence k fágům může mít řadu příčin. Doposud byla pozornost zaměřena spíše na restrikčně-modifikační systémy, významný vliv však mohou mít i profágy integrované v genomech kmenů rezistentních k polyvalentním fágům. Tato diplomová práce se zabývá vlivem lyzogenie na citlivost kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům. Schopnost navodit rezistenci u svých hostitelů byla prokázána u několika mírných fágů. Pomocí komparativní genomiky byl identifikován gen, který by mohl být zodpovědný za navození rezistence vůči fágům, a byla navržena PCR na detekci tohoto genu.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen that in people with weakened immune systems raises serious disease that can be fatal. Currently, the treatment of these infections is very problematic due to the increasing number of strains resistant to antibiotics. The starting point could be phage therapy, which has been applied for many years in some Eastern countries, such as Georgia, Russia or Poland. One of the problems of phage therapy is resistance to polyvalent phages used in this therapy. This resistance to phages can have many causes. So far, the attention has been focused more on restriction-modification systems. However, the prophages integrated in the genomes of strains resistant to polyvalent phages may be important too. This thesis examines the influence of lysogeny on the sensitivity of strains of S. aureus to polyvalent phage. The ability to induce resistance in its hosts has been demonstrated in a number of temperate phages. With comparative genomics a gene has been identified that could be responsible for inducing resistance to phages, and the PCR has been designed to detect this gen.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Jiřímu Doškařovi, CSc za cenné rady a odborné vedení při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů za cenné rady a pomoc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 10. května 2013 **……..**

Petra Formanová

Vysoká škola: Masarykova univerzita **Fakulta:** přírodovědecká

Pracoviště: Ústav experimentální biologie **Akademický rok:** 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Student(ka): Bc. Petra Formanová

Vedoucí diplomové práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., čl. o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto diplomovou práci:

Název tématu: Vliv lyzogenie na citlivost kmenů Staphylococcus aureus k polyvalentním fágům

Název tématu anglicky: Influence of lysogeny on the sensitivity of Staphylococcus aureus strains to polyvalent bacteriophages

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Jazyk práce: český (jiný jazyk jen na základě přiložené žádosti)

Zásady pro vypracování

Anotace: Polyvalentní stafylokokové bakteriofágy jsou vzhledem ke svému širokému rozmezí hostitelů využívány k přípravě preparátů pro terapii stafylokokových infekcí. Některé kmeny stafylokoků druhu S. aureus jsou však k těmto fágům necitlivé, což může účinnost fágové terapie negativně ovlivňovat. Bylo zjištěno, že necitlivost kmenů může být způsobena přítomností profágů začleněných v jejich genomu. Cílem diplomové práce je stanovit, do jaké míry je necitlivost kmenů S. aureus k polyvalentním fágů ovlivněna přítomností profágů v jejich genomech, které profágy tuto necitlivost specificky navozují a následně tyto profágy blíže charakterizovat z hlediska jejich genomové struktury, obsahu genů a dalších vlastností.

Časový harmonogram řešení (postup):
PS 2011 Studium literatury, zahájení experimentálního zpracování DP
JS 2012 Pokračování ve studiu literatury a experimentálním zpracování DP
PS 2012 Dokončení experimentálního zpracování, vypracování literární rešerše k tématu DP
JS 2013 Sepsání DP

Rozsah diplomové práce: 50-60 stran

Rozsah grafických příloh: 10-20

Doporučená literatura:
1. Odborné články dle doporučení školitele, zdroje z internetu

Datum zadání diplomové práce: 6.12.2011

Termín odevzdání diplomové práce:
Termín odevzdání diplomové práce dle harmonogramu příslušného akademického roku.

V Brně dne 6.12.2011.

Bc. Petra Formanová
podpis studenta

prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.
podpis vedoucího diplomové práce

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel ústavu

OBSAH

OBSAH....8
ZKRATKY....10
1.ÚVOD....11
1.1. Druh *Staphylococcus aureus*....12
1.1.1. Genom *Staphylococcus aureus*....13
1.2. Bakteriofágy....14
1.2.1 Mírné bakteriofágy....15
1.2.2. Polyvalentní bakteriofágy....18
1.3. Fágová terapie....20
1.4. Mechanismy rezistence bakterií vůči fágům....22
1.4.1. Zabránění adsorpce fága....22
1.4.2. Zabránění vstupu fágové DNA do buňky....23
1.4.3. Restrikčně modifikační systémy....24
1.5. Struktura genomu mírných fágů druhu *S. aureus*....26
1.5.1. Začlenění fágové DNA do genomu bakterie....28
1.5.2. Oblast kontroly lyzogenního stavu....28
1.5.3. Modul regulace transkripce....28
1.5.4. Morfologický modul....28
1.5.5. Lytický modul....29
2. CÍLE PRÁCE....30
3. MATERIÁL A METODY....31
3.1. Bakteriální kmeny a bakteriofágy....31
3.2. Materiál....32
3.2.1. Kultivační média....32
3.2.2. Materiál pro elektroforézu....34
3.2.3. DNA markery....35
3.2.4. Materiál pro PCR....35
3.3. Laboratorní přístroje....35
3.3.1. Počítačový software a internetové nástroje pro analýzu sekvencí....36
3.4. Metody....36
3.4.1. Stanovení citlivosti lyzogenních kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům....36
3.4.2. Titr fágových částic....37
3.4.3. Stanovení adsorpce fágů na bakteriální buňky....37
3.4.4. Zamražení bakteriálních kultur....38
3.4.5. Příprava hrubého lyzátu pro PCR....38
3.4.6. Multiplex PCR na detekci typu serologické skupiny profágů....38
3.4.7. Multiplex PCR na detekci genů pro fágové amidázy....39
3.4.8. Multiplex PCR na detekci genů pro fágové dUTPázy....40
3.4.9. Multiplex PCR na detekci fágového antirepresoru....41
3.4.10. Návrh a optimalizace simplex PCR na detekci genu pro neznámý protein....43
3.4.11. Elektroforéza v agarózovém gelu....44
3.4.12. Indukce profágů UV zářením....44
3.4.13. Lyzogenizace....45
4. VÝSLEDKY....47
4.1. Citlivost vybraných kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům....47
4.2. Stanovení schopnosti adsorpce polyvalentních fágů 812 a 812a na buňky *S. aureus*....49
4.3. Profágový profil u vybraných kmenů....52
4.3.1. Morfologický modul profágů....52
4.3.2. Lytický modul profágů....55

4.3.3. Modul regulace transkripce.....58
4.3.4. Modul kontroly lyzogenního stavu.....60
4.4. Indukce profágů z necitlivých kmenů a lyzogenizace kmene *S. aureus* 1039.....63
4.5. Analýza *in silico*.....63
4.5.1.Návrh PCR na 53ORF016.....64
5. DISKUZE.....66
5.1 Citlivost vybraných kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům.....66
5.2. Schopnost adsorpce polyvalentních fágů na buňky *S. aureus*.....67
5.3. Profágový profil u vybraných kmenů.....67
5.4. Indukce neznámých profágů a následná lyzogenizace citlivého kmene.....69
5.5. Analýza genu pro neznámý protein.....70
6. ZÁVĚR.....71
7. SEZNAM LITERATURY.....72

ZKRATKY

CCM - Česká sbírka mikroorganismů

EOP - „angl.“ „efficiency of plating" - efektivita výsevu

dsDNA - dvouřetězcová DNA (double-stranded DNA)

HMFM - „angl.“ „Hogness modified freezing medium“ – zamražovací médium

LMDM - Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů

MRSA - meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

MSSA – meticilin-senzitivní *Staphylococcus aureus*

MLST - multilokusová sekvenční typizace

MPA - masopeptonový agar

MPB - masopeptonový bujón

NCBI – národní centrum pro biotechnologické informace

ORF - otevřený čtecí rámec

PFU - „angl.“ „plaque forming units" – částice tvořící plaky

PCR - polymerázová řetězová reakce

RM - restrikčně-modifikační

SaPI - ostrov patogenity u *S. aureus*

SCC*mec* - stafylokoková chromozomová kazeta nesoucí gen *mec*

VRSA – vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

1. ÚVOD

Staphylococcus aureus je významným patogenem lidí i zvířat. Jedná se o extrémně flexibilní organismus, jehož evoluce probíhá vysokou rychlostí. Může být komenzálem, ale stejně tak i život ohrožující bakterií. V současné době jeho význam roste. Je totiž častým problémem v nemocnicích po celém světě a to díky vzrůstajícímu počtu k antibiotikům rezistentních kmenů MRSA (meticilin rezistentní *S. aureus*) a VRSA (vankomycin rezistentní *S. aureus*). Šíření této rezistence je způsobeno rychlou evolucí této bakterie a schopností horizontálního přenosu genů.

Proto se současné výzkumy zabývají hledáním alternativní cesty k antibiotikům a jako nejvhodnější z nich se jeví právě fágová terapie. Fágová terapie má své počátky již na začátku 20. století, pravděpodobně poprvé byla užita v roce 1921 na kožní onemocnění vyvolané stafylokoky (Bruynoghe a Maisin, 1921). Poté však zájem o fágovou terapii poklesl, jednak díky objevu antibiotik, a dále také díky špatné kvalitě přípravků, způsobené nedostatečnými znalostmi biologie bakteriofágů. Přesto se tato alternativní cesta stále rozvíjela a to zejména v Gruzii, Rusku a Polsku. Po rozšíření rezistence k antibiotikům se fágová terapie stala opět světově aktuální a v současné době se jí zabývá řada výzkumů. Na trhu jsou k dostání první přípravky na bázi bakteriofágů.

Fágová terapie se však také potýká s řadou problémů. Jedním z nich je i rezistence bakterií vůči užívaným polyvalentním fágům. Ta může mít řadu příčin, např. RM systémy (restrikčně-modifikační), Sie systémy (superinfekci vylučující) či abortivní infekce. Často je příčina rezistence neznámá, zejména u druhu *S. aureus*. Většina studií se zabývá vlivem restrikčně-modifikačních sytémů na rezistenci bakterií. U mnoha rezistentních kmenů se v genomu nachází mírné bakteriofágy ve formě profágů, jež také mohou nést geny pro rezistenci k polyvalentním fágům. A právě rezistencí podmíněnou profágem se zabývá tato diplomová práce.

1.1. Druh *Staphylococcus aureus*

S. aureus patří mezi grampozitivní nesporulující koky o velikosti 1 μm. Jeho kolonie tvoří shluky hroznovitých tvarů a mají charakteristickou nažloutlou barvu. Poprvé byl tento bakteriální druh pozorován v roce 1880 chirurgem Alexandrem Ogstonem, který ho izoloval z otevřených hnisajících ran a posléze ho pojmenoval *Staphylococcus*. Používal slepičí vejce, aby vyizoloval čistou kulturu, kterou pak infikoval králíky. Dokázal tak, že tyto bakterie způsobují abscesy u infikovaných zvířat. Taxonomicky patří druh *Staphylococcus aureus* do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales*, čeledi *Staphylococcaceae* a rodu *Staphylococcus*. Tento druh je fakultativně anaerobní bakterií a v praxi se pro jeho selekci používá schopnost růstu v médiu s 10% NaCl.

Obrázek 1: *S. aureus*. Převzato z http://www.sciogena.eu/wp-content/Staphylococcus-aureus.jpeg, http://3.bp.blogspot.com/.

Z hlediska patogenity je *S. aureus* oportunní patogen., který se nejčastěji vyskytuje na povrchu nosní sliznice, případně na povrchu kůže a zdravému nositeli nezpůsobuje žádné komplikace. V případě oslabení imunity však může způsobovat závažná onemocnění. Mezi ně patří kožní či tkáňové abscesy, pneumonie, syndrom toxického šoku, endokarditida, osteomyelitida nebo meningitida. V populaci se šíří fyzickým kontaktem. Díky masivnímu používání antibiotik ve 40. letech se objevily kmeny rezistentní k penicilinu. Proti nim se začal široce užívat meticilin, což vedlo k rozšíření MRSA kmenů a v současnosti jsou tyto kmeny velkým problémem v nemocnicích po celém světě (DeLeo a Chambers, 2009). Všechna beta-laktamová antibiotika jsou vůči těmto infekcím neúčinná. Za tuto rezistenci je odpovědný gen *mecA* na chromozomové kazetě SCC*mec* (Hiramatsu a kol., 2001). Proto se v současnosti používá k léčbě vankomycin, přesto se již objevily kmeny k němu rezistentní (Hiramatsu a kol. 1997). Důvodem je zřejmě horizontální přenos genu *vanA*, jenž má původ u

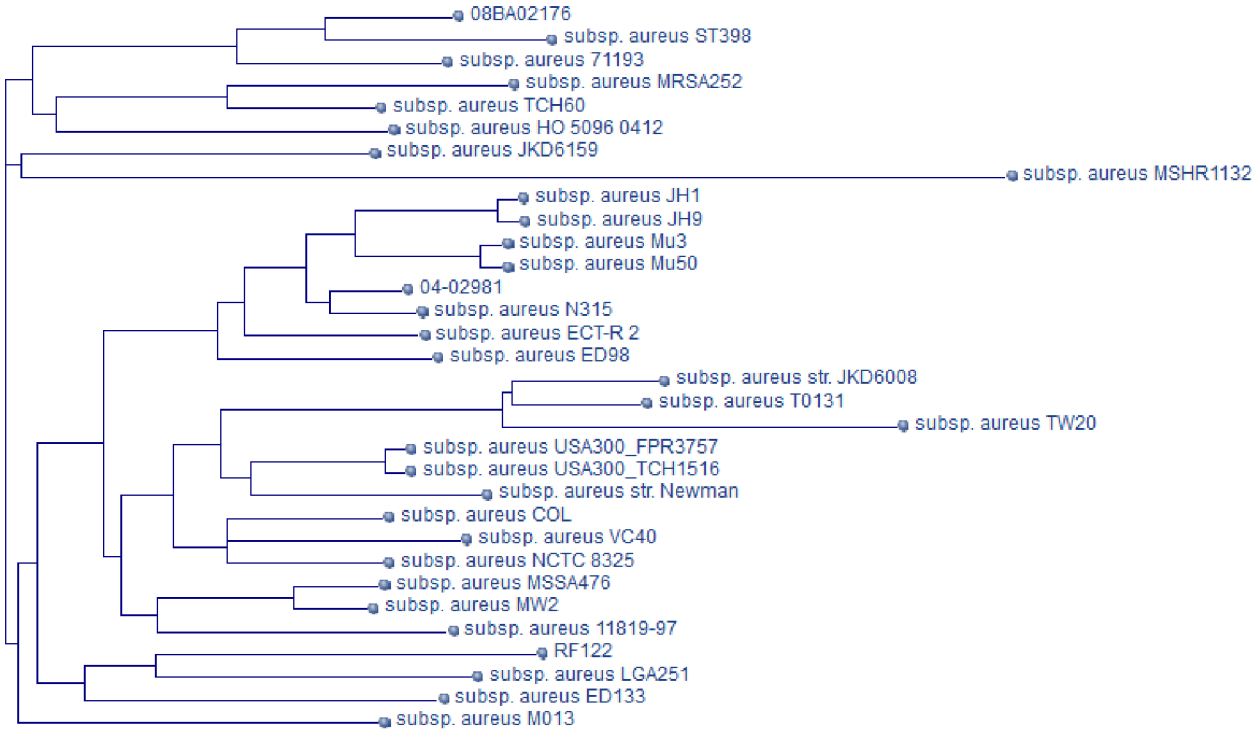
Enterococcus faecalis (Chang a kol., 2003). V budoucnu se tak dá očekávat rychlý nárůst rezistence i k tomuto antibiotiku.

1.1.1. Genom *S. aureus*

Genom *S. aureus* je tvořen jednou molekulou dvouřetězcové DNA a přídatnými plazmidy. Celková velikost se pohybuje od 2,7 Mb – 2,9 Mb. Genomová sekvence je asi z 80% tvořená společnými geny pro všechny kmeny, jde o tzv. jádro genomu složené z esenciálních genů (Lindsay a Holden, 2004). Genetická informace *S. aureus* však vykazuje i obrovskou diverzitu přídatných genetických elementů. Přídatné geny reprezentují rozmanitost bakteriálního druhu, neboť kódují proteiny potřebné pro adaptaci bakterií v různých ekologických niche. Je pro ně také typický odlišný obsah G + C, což je často dáno tím, že mají jiný původ než zbytek genomové sekvence.

Jako první byly sekvenovány kmeny Mu50 a N315, jejichž genomová sekvence je téměř identická. Díky potřebě porozumění příčinám rezistence a patogenity bylo sekvenováno několik dalších kmenů (Obr. 2).

Obrázek 2: Osekvenované kmeny *S. aureus. Převzato z http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.*



Populace *S. aureus* vykazuje vysokou klonální strukturu (Feng a kol., 2008). Velmi populární typizační metodou je MLST (multilokusová sekvenční typizace), založená na sekvenaci 7 „housekeeping" genů (*arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi* a *ygiL*). Pokud se izoláty shodují nejméně v 6 z těchto 7 genů, náleží do stejného klonálního klastru (CC). Většina MRSA kmenů pak spadá do 5 klonálních linií CC8, CC5, CC30, CC45, a CC22 (Enright a kol., 2002). *S. aureus* je tak patrně pravým klonálním typem, o čemž svědčí i to, že se jednotlivé mobilní genetické elementy nemohou mezi kmeny zcela volně pohybovat. V laboratoři je pak značně obtížné geneticky manipulovat s tímto druhem díky rejekci exogenních plazmidů.

Z mobilních genetických elementů se u *S. aureus* vyskytují profágy, inzerční sekvence (IS), transpozony (Tn), stafylokokové chromozomové kazety (SCC), plazmidy, chromozomové ostrovy a ostrovy patogenity – (SaPIs). Celkově zaujímají asi 25% celkového genomu (Lindsay a Holden, 2004). SCC*mec* obsahuje 2 důležité oblasti, jednak gen *mecA,* který zodpovídá za rezistenci k beta-laktamázovým antibiotikům a dále *ccr* komplex, jež umožňuje mobilitu tohoto elementu (Hiramatsu a kol., 2001). Na této kazetě byly nalezeny rozličné inzerční sekvence, transpozony a plazmidy, např. Tn554, IS1272, IS431, pUB110, pT181, a p1258 (Feng a kol., 2008). Většina kmenů obsahuje 2 genomické ostrovy - νSaα. a νSa β. Ostrovy patogenity jsou důležité vektory, jež mohou přenášet virulentní faktory, např. enterotoxiny a toxin syndromu toxického šoku. Přenos těchto elementů je závislý na pomocném fágu. Např. SaPI 1 je nejčastěji přenášen pomocí fágů 13 a 80α (Lindsay a kol., 1998; Ruzin a kol., 2001). Profágy tvoří rozsáhlou skupinu MGE u druhu *S. aureus*. Téměř každý kmen obsahuje nějakého profága a většina je stále neznámá.

1.2. Bakteriofágy

Bakteriofágy jsou všeobecně definované jako viry infikující bakterie. Některé bakteriofágy pak mají schopnost začlenit svou DNA do chromozomu hostitelské buňky a přetrvávat zde ve stavu profága. Profág je tedy bakteriofágový genom začleněný v bakteriálním chromozomu a patří mezi mobilní genetické elementy.

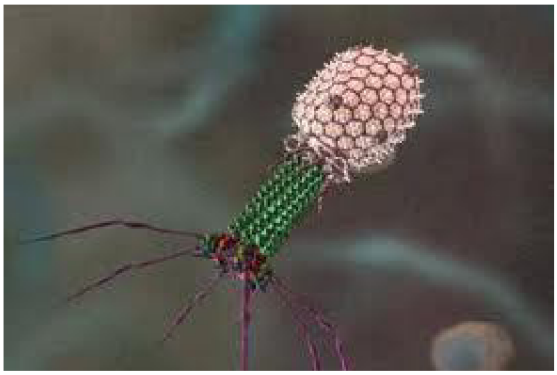
Bakteriofágy byly poprvé objeveny nezávisle na sobě Twortem, Londonem a d'Herellem jako činitelé bakteriální lyze, které je možno filtrovat a infikovat jimi další bakteriální kulturu. Zpočátku se myslelo, že byl nalezen klíč k potlačení bakteriálních infekcí, tehdejší rané studie však vykazovaly značný neúspěch. V současné době význam fágové terapie roste.

Bakteriofágy schopné infikovat většinu prokaryot můžeme vyizolovat z půdy, vody, odpadních vod a prakticky z většiny prostředí, která jsou kolonizována bakteriemi. Je vcelku logické, že bakteriofágy vykazují obdobnou variabilitu a všestrannost jako jejich hostitelé. Některé bakteriofágy mohou stejně jako některé bakterie přežít v extrémních podmínkách, mezi něž patří vysoká teplota (nad 95 ° C) nebo nízké pH (až 1,3 pH). Fágy, jež jsou užívány k terapii v Gruzii, byly často izolovány právě z odpadních vod.

Bakteriofágy náleží do několika čeledí: *Corticoviridae, Podoviridae, Myoviridae, Inoviridae, Microviridae, Cystoviridae, Plasmaviridae, Siphoviridae, Leviviridae, Tectiviridae, Fuselloviridae, Rudiviridae* a *Lipothrixviridae* (Ackermann, 2003). U druhu *S. aureus* nalezneme zástupce z čeledi *Myoviridae, Siphoviridae* a *Podoviridae*.

Bakteriofágy přenáší svou genetickou informaci ve formě DNA nebo RNA. Dále má většina bakteriofágů proteinovou kapsidu a bičíková vlákna (obr. 3), kterými se fágy navazují na specifické receptory na povrchu bakterií. Těmi mohou být například karbohydráty, proteiny anebo lipopolysacharidy. Bakteriofágy můžeme dělit do dvou skupin, na virulentní a mírné. Virulentní bakteriofág vyvolá lytickou infekci, vedoucí k lyzi hostitele. Mírný bakteriofág využívá tzv. lyzogenní cyklus.

Obrázek 3: Struktura bakteriofágů. Převzato z: http://www.sciogena.eu/wp-content/phage-3.jpeg.



1.2.1. Mírné bakteriofágy

Mírné bakteriofágy mohou mít lytický i lyzogenní cyklus. Při lyzogenním cyklu je bakteriofág schopen začlenit svou vlastní nukleovou kyselinu do genomu hostitele. V případě DNA se genetická informace může přímo včlenit do genomu, jedná-li se o RNA, pak tomuto začlenění předchází reverzní transkripce za pomocí speciálního enzymu reverzní transkriptázy. Samotný včleněný virový genom se nazývá profág a je přenášen do všech dceřiných buněk hostitele. Virus tak využívá replikačních mechanismů hostitele, aniž by zapříčinil jeho smrt. Některé profágy mohou být spontánně indukovány a to například UV

zářením, anebo chemickými mutageny. Tato lyzogenní indukce pak vede k transkripci, produkci nových fágových částic a následné lyzi bakteriální buňky.

Mnoho profágů nese geny výhodné pro hostitele a velký význam bakteriofágů spočívá v přenosu genetické informace mezi bakteriemi a to transdukci a lyzogenní konverzi. Přenos genů pomocí bakteriofágů je u druhu *S. aureus* nejčastějším způsobem horizontálního přenosu genů (Holden a Lindsay, 2008). Šíření genů spojených s virulencí pomocí lyzogenizujících bakteriofágů je obecným jevem u grampozitivních i gramnegativních bakterií (Boyd a kol., 2001). Přítomnost genů kódujících „záškrtový" toxin na lyzogenizujícím bakteriofágu u *Corynebacterium diphtheriae* byla zjištěna téměř před půl stoletím a v následujících letech byla objevena spousta dalších toxinů kódovaných bakteriofágy, např. shigatoxinu u *Enterobacteriacee*, toxinu cholery u *Vibrio cholerae*, neurotoxinů u *Clostridium botulinum,* nebo cytotoxinu u *Pseudomonas aeruginosa (Cheetham* a Katz, 1995). U druhu *S. aureus* je nejvýznamnějším příkladem gen *eta* pro exfoliativní toxin A, jež se nachází v genomu konvertujícího bakteriofága (Yamaguchi a kol., 2000). Tento toxin způsobuje u člověka závažné epidermolýzy např. syndrom opařené kůže (obr. 4).

Obrázek 4.: Syndrom opařené kůže způsobený exfoliativním toxinem A. Převzato z http://detskakuze.phorum.cz/imagesnovor/14.jpg.

Pokud se po začlenění genomu fága změní fenotyp hostitelské buňky, dochází k tzv. lyzogenní konverzi. Začlenění profágové DNA do bakteriálního genomu může mít několik důsledků a to:

(i) modifikaci povrchových struktur, chránících bakteriální buňku před účinky protilátek, makrofágů, antibiotik nebo bakteriofágů,

(ii) odlišné chemické složení kapsulárních polysacharidů, které mechanicky chrání bakteriální buňku před vnějšími faktory,

(iii) produkci exotoxinu, který působí na různé systémy makroorganismu,

(iv) produkci specifických proteinů (internalinů nebo invazinů), které umožňují bakteriální invazi do krevního oběhu a buněk makroorganismu,

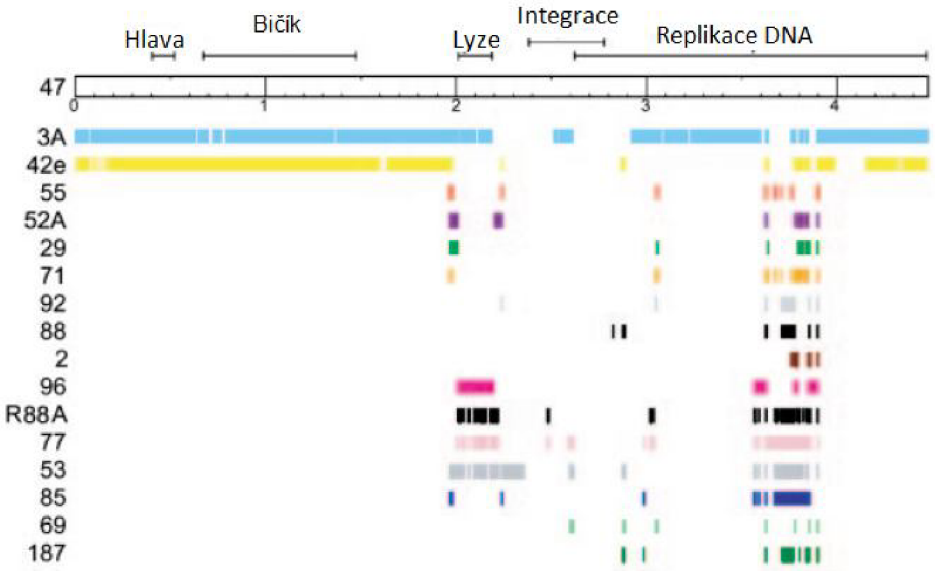
(v) uspořádání biofilmu, jehož výsledkem je bakteriální adheze na epiteliální buňku a radikální změna vlastností, která se týká nepřístupnosti a vysoké rezistence k různým faktorům a

(vi) mnohonásobnou rezistentnci k antibiotikům (Krylov, 2003).

Přítomnost určitých profágů koreluje i s přítomností určité rezistence k antibiotikům. Kmeny MRSA a MSSA byly testovány na citlivost k antibiotikům současně s PCR detekcí přítomnosti určité skupiny mezinárodní řady profágů (Mehndiratta a kol., 2010). Fágy byly rozděleny na základě podobnosti do skupin I- fágy 29, 52, 52A, 79, 80, II- fágy 3A, 3C, 55, 71, III- fágy 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85, IV- fágy 94, 96 a dále nezařazené fágy 81,95. Všechny kmeny MSSA obsahující profágy typu 81 byly citlivé na všechna testovaná antibiotika kromě penicilinu, na který byly všechny rezistentní. Dále pak bylo zjištěno, že 45 % kmenů MRSA s profágem ze skupiny III je multirezistentních. Přítomnost určitého profága tak může předpovídat rezistenci k antibiotikům.

Asi 93% fágu *S. aureus* je mírných a z toho většina patří do čeledi *Siphoviridae* (Goerke a kol., 2009). Řada z nich již byla osekvenována. Mají modulární uspořádání a jsou mozaikovité povahy, to znamená, že jednotlivé sekvence najdou zastoupení v genomech různých fágů (obr. 5). Je to dáno postupnou nezávislou evolucí spojenou s horizontálním přenosem genů a rekombinací (Kwan a kol., 2005). Mírné fágy mají u druhu *S. aureus* velký význam při přenosu genů. Jsou nejrozšířenějším mobilním genetickým elementem (Witney a kol., 2005). Většina kmenů obsahuje minimálně jednoho profága, bezprofágové kmeny se vyskytují vzácně (Goerke a kol., 2009; Pantůček a kol., 2004).

Obrázek 5.: Mozaikovité uspořádání genomu fágů z čeledi *Siphoviridae*. Srovnávací fág 47. Převzato z Kwan a kol. (2005); upraveno.



Neméně významná je jejich role při mobilizaci ostrovů patogenity. U druhu *S. aureus* se nachází několik odlišných SaPIs. Jsou to mobilní elementy, které jsou přenášeny za pomocí bakteriofága. Díky tomu dochází k častějšímu přenosu a to nejen u druhu *S. aureus* (Lindsay a kol., 1998), ale také u dalších druhů *Staphylococcus sp.* (Maiques a kol., 2007) a dokonce k přenosu i na *Listeria monocytogenes* (Chen a Novick, 2009). Při infekci hostitelské buňky fágem se SaPIs vyštěpí, autonomně replikují a poté jsou zabaleny do fágových částic namísto fágové DNA (Tallent a kol., 2007; Tormo a kol., 2008).

Fág 80α umí mobilizovat značnou část ostrovů patogenity. Původně se myslelo, že fág 80α je odvozený od fága 80, jelikož byl izolován jako plaka na kmeni NCTC 8325 a je tedy schopen na tomto kmeni růst (Novick, 1967). Při srovnávání genomu a schopnosti mobilizace však byl zjištěno, že fág 80α je jen vzdáleně příbuzný k fágu 80 a naopak má sekvenci genomu blízkou fágu 53 (Christie a kol., 2010). Téměř 90% genomu 80α je shodných s publikovanou sekvencí 53. Pravděpodobně tak bude 80α variantou 53, který zřejmě tehdejší studie kontaminoval. Taktéž u fága 53 byla zjištěna schopnost mobilizovat SaPI1 a 2. Jelikož fág 53 má schopnost navodit rezistenci vůči polyvalentním fágům, přináší tak svému hostiteli hned dvojí výhodu.

1.2.2. Polyvalentní bakteriofágy *S. aureus*

Polyvalentní bakteriofágy jsou lytické fágy se širokým spektrem hostitelů. Proto jsou ideálními fágy pro využití ve fágové terapii. Na rozdíl od mírných fágů mají tyto fágy pouze

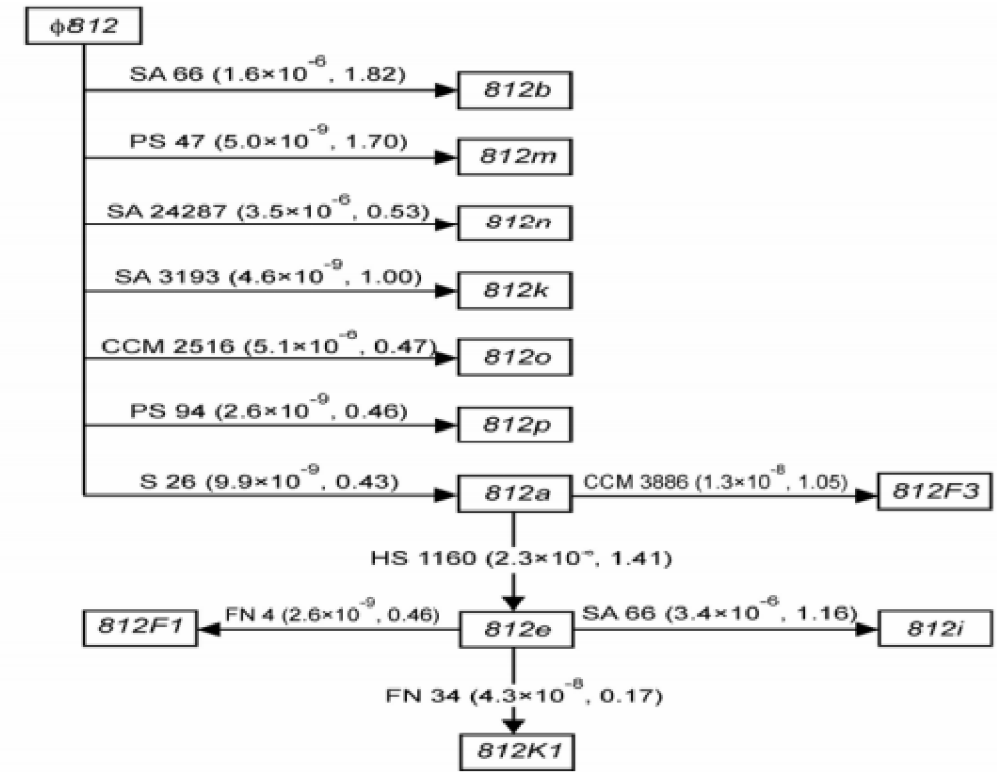
lytický cyklus. Nejprve se fág adsorbuje na hostitelskou buňku pomocí jejích povrchových molekul. Poté bakteriofág vstřikuje svoji nukleovou kyselinu do buňky. Uvnitř buňky využívá jejích replikačních, transkripčních a translačních mechanismů k replikaci vlastní genetické informace, a k translaci proteinů potřebných pro sestavení nových fágových částic. Poté se tvoří nové fágové částice, počet vzniklých fágů během jediného cyklu infekce se pohybuje od 50 až po 200 nových částic. Následuje lyze bakteriální buňky za pomocí endolyzinů, jež naruší buněčnou stěnu a nové částice se dostanou vně buňky.

Prvním krokem při infekci je tedy adsorpce na povrchový receptor. Ztrátou nebo změnou svých povrchových struktur může bakterie zabránit bakteriofágům v přichycení a stát se rezistentní vůči fágům, které využívají tyto molekuly. Dále mohou bakterie využít specifické mechanizmy k ochraně proti invazi cizí DNA, např. RM systémy. Podrobnější informace o možnostech resistence vůči fágům jsou uvedeny v další části této práce. Mezi klasické zástupce polyvalentních fágů u druhu *S. aureus* patří fág 812, K a G.

Bakteriofág 812 patří mezi polyvalentní fágy s rozsáhlým spektrem hostitelských kmenů. Je morfotypu A1 a serotypu D (Ackermann a DuBow, 1987) a náleží do čeledi *Myoviridae*, druhu *Twort*, tak jako řada dalších polyvalentních fágů se širokým účinkem, jež mají využití ve fágové terapii, např. K1, G1 a Twort (Muphy a kol., 1995). Jeho hlava má ikozahedrický tvar o průměru 92 nm, bičík je 209 nm dlouhý, s kontraktilním pouzdrem a bazální destičkou. Má lineární dsDNA o velikosti 146,5 kb, nemá kohezní konce a obsah G+C v jeho genomu je 35,1% (Pantůček a kol., 1998).

Z tohoto fága byla odvozena řada mutant, které dohromady se standardním typem 812 vykazují vysokou účinnost u většiny kmenů – až 95% kmenů *S. aureus subsp. aureus* a 43% rozličných druhů koaguláza-negativních stafylokoků, např. *S. capititis, S. carnosus, S haemolyticus, S. hominis* nebo *S. epidermisis* (Rosypal a kol., 1986; Pantůček a kol., 1998). Na obrázku 6 je vidět postupná izolace mutant v rozmezí hostitele.

Obrázek 6: Mutanty v rozmezí hostitele fága 812. V závorce uvedena frekvence mutace a efektivita výsevu. Převzato z Rosypal a kol. (1986).



Mezi další polyvalentní fágy *S. aureus* patří bakteriofág K, jenž je blízce příbuzný fágu 812. Jeho velikost je 127,4 kb (O´Flaherty a kol., 2004). Fág K je schopný infikovat mnoho koaguláza-negativních i pozitivních druhů stafylokoků (Rountee 1949). U tohoto fága byla také prokázána schopnost prevence utváření biofilmu spolu s dalšími 6 od něj odvozenými fágy (Kelly a kol., 2012).

Nově izolovaným fágem je fág MSA6 (Kwiatek a kol., 2012). Byl izolován z kravské mastitidy a jeho genom je 143 kb velký, což odpovídá velikosti fága 812. Morfologicky je podobný fágům z čeledi *Myoviridae* a náleží do stejné seroskupiny jako fágy druhu *Twort.* Jeho kapsidový protein vykazuje 82% podobnost sekvence s fágem K. MSA6 je schopen lyzovat 27 testovaných kmenů MRSA z 28 a je tak zřejmě dalším vhodným fágem pro terapeutické účely.

1.3. Fágová terapie

V poslední době se hodně studií věnuje možnosti fágové terapie. Nemocniční studie ukázaly, že použitím bakteriofágů na ošetření místností, jako jsou toalety apod., zabraňuje přenosu *E. coli* na pacienty. Další možností je použití fágové terapie při bakteriální infekci

namísto antibiotik. Fágová terapie nabízí mnoho výhod oproti léčbě antibiotiky. Je účinná i na organismy rezistentní k antibiotikům a může být užitá jako alternativní terapie pro pacienty s alergií na antibiotika (Marks a Sharp, 2000). Bakteriofágy nabízí vysokou přesnost k cílovému organismu a zároveň nemají žádny vliv na ostatní organismy. Jsou schopny autoreplikace. Pakliže je cílový organismus přítomen, replikují se, dokud nejsou všechny cílové bakterie zlyzovány. Zároveň v případě, že cílový organismus chybí, vyloučí se z těla ven. Dokáží přirozeně mutovat, aby překonali rezistenci hostitele, případně mohou být v laboratoři zmutovány záměrně. S rozvíjející se antibiotikovou rezistenci je vyvinutí alternativních terapií stále více urgentní a fágová terapie může mít v budoucnu velký význam jak samostatně, tak v kombinaci s léčbou antibiotiky.

Hlavními problémy fágové terapie jsou:

I. rezistence bakterií vůči užívaným fágům,
II. inaktivace fágových částic imunitním systémem pacienta,
III. toxický šok pacienta díky rychlé lyzi bakterií a vyplavení toxických látek do krevního oběhu,
IV. nutnost přesné diagnostiky původce onemocnění.

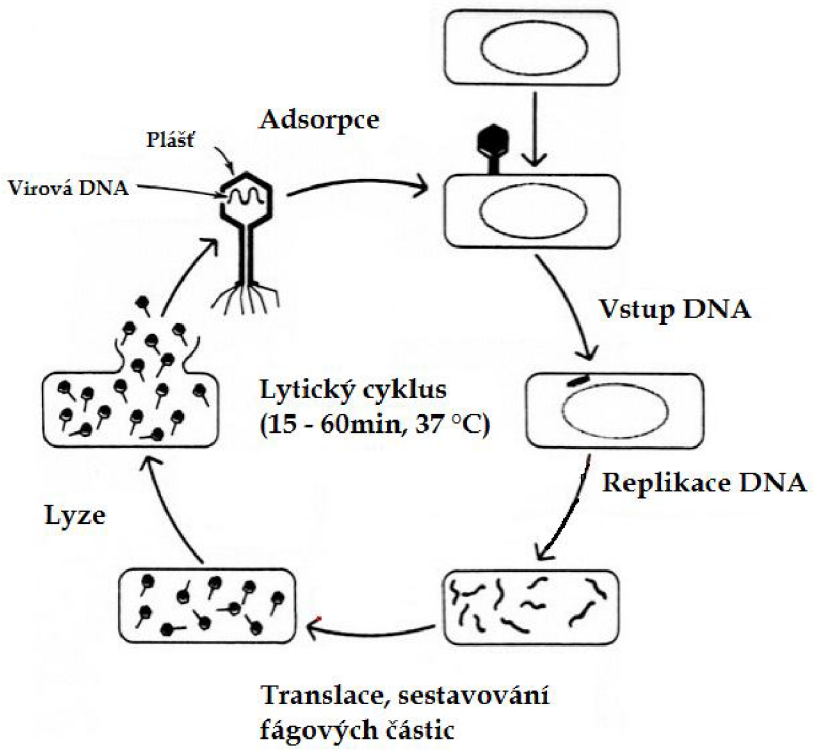
Studie fágové terapie na myších dokazuje, že se lze těmto problémům vyhnout vhodnou selekcí používaných fágů (Capparelli a kol. 2007). Nejprve byl vybrán fág W^{Sa}, který vykazoval největší šíři hostitelů u druhu *S. aureus*. Dále byl současnou aplikací fága a stafylokoka intravenózně do myši získán mutant M^{Sa}, který byl schopen v myších perzistovat až 25 dní. Následně byly prováděny experimenty, jež dokázali účinnost tohoto fága při léčbě. Při aplikování smrtelné dávky kmene A170 myším, spolu s fágem M^{Sa} přežilo 97% myší a bakterie byly zcela eradikovány již během 4 dnů fágové terapie. Fág byl účinný při lokální, systematické i vnitrobuněčné infekci, stejně tak účinkoval i na MRSA kmeny. Zároveň byl fág dobře tolerován zvířaty, nevyvolal produkci protilátek, ani šok po rychlé bakteriální lyzi. Fág fungoval i při aplikaci na již propuklou infekci. Dávky byli aplikováni intravenózně či podkožně, stačila 1 injekce k vyléčení, pouze u abscesů bylo potřeba opakované dávky.

V případě tzv. trpasličích kmenů *S. aureus* byla situace poněkud obtížnější. Tyto kmeny jsou schopné přežívat v hostiteli vnitrobuněčně, zatímco bakteriofág se dovnitř eukaryotické buňky není schopen dostat. I tyto kmeny je možné eliminovat za pomocí bakterií, jež jsou již napadené fágem a zanesou ho dovnitř buňky. Tento experiment tak ukazuje velký potenciál fágové terapie.

1.4. Mechanismy rezistence bakterií vůči fágům

Je známo mnoho mechanismů, jimiž mohou bakterie zabránit infekci bakteriofágem. Lytický cyklus polyvalentních fágů se skládá z několika kroků (obr. 7) a bakterie vyvinuly rozmanité způsoby rezistence namířené vůči různým stádiím infekce.

Obrázek 7: Lytický cyklus polyvalentních fágů. Převzato z: http://textbookofbacteriology.net/; upraveno.



1.4.1. Zabránění adsorpce fága

Nejdříve se fág musí na hostitelskou buňku adsorbovat. Využívá k tomu různé molekuly na povrchu hostitele. U druhu *S. aureus* je k adsorpci často využíván protein A, který je zároveň virulentním faktorem (Labrie a kol., 2010). Jeho překrytím pak bakterie zabraňuje adsorpci. Polyvalentní fág K však dokázal tuto rezistenci překonat tím, že se navazuje na jinou molekulu, konkrétně na N-acetylglukosamin teichoové kyseliny (Chatterjee, 1969). Při studii rezistence vůči polyvalentnímu fágu K, bylo objeveno, že většina rezistentních kmenů obsahuje RM systémy degradující fágovou DNA (Kelly a kol., 2010). U třech kmenů však byla zjištěna neschopnost adsorpce. Jde tedy o neustálý evoluční boj mezi fágem a jeho hostitelem.

Další možností obrany bakterií je produkce extracelulárních polymerů, jež tvoří fyzickou bariéru mezi fágem a bakterií (Labrie a kol., 2010). Přesto se některé fágy dokázaly

adaptovat a naopak rozpoznávají tyto specifické polymery. Kyselina hyaluronová je produkována některými streptokoky jakou součást jejich kapsule. To jim pomáhá uniknout před imunitním systémem i před bakteriofágy (Moses a kol., 1997). U některých profágů byly nalezeny geny pro enzymy degradující kyselinu hyauluronovou, které neničí jen tu bakteriální, ale i tu lidskou a pomáhají tak bakterii šířit se skrze pojivovou tkáň.

U *Haemophilus infuenzae* se jeho fág HP1c1 nemůže adsorbovat díky fázové variaci (Zaleski a kol., 2005). Za to je zodpovědná modifikace genu *lic2A* pro protein podílející se na syntéze lipooligosacharidů.

1.4.2. Zabránění vstupu fágové DNA do buňky

Dalším krokem je vstup fágové DNA do buňky. Superinfekci vylučující systémy (Sie) jsou složeny z proteinů, které blokují vstup DNA do buňky. Řada z nich je nesena na profágových genomech a většina je známa u gramnegativních bakterií. Jako příklad bych jmenovala dnes již dobře charakterizované systémy Imm a Sp u colifága T4. Oba tyto systémy způsobují inhibici injekce DNA a zabraňují tak infekci dalším T4 podobným fágem (Labrie a kol., 2010). Imm zamezuje přenosu fágové DNA do bakteriální cytoplasmy změnou konformace vstupního místa. Obsahuje dvě transmembránové domény, pravděpodobně je lokalizován v membránovém prostoru a je spojen s membránou ve specifických místech (Lu a kol., 1993). Imunita navozená pouze tímto proteinem není kompletní a pravděpodobně je spojen ještě s dalším membránovým proteinem, s nímž je schopen navodit kompletní imunitu. Sp je membránový protein, jenž inhibuje aktivitu lysozymu bakteriofága T4 (Lu a Henning, 1994). Ten pak nemůže proděravět buněčnou stěnu a injikovat svoji DNA do buňky.

U grampozitivích bakterií bylo dosud objeveno pouze několik mechanismů. Většina z nich byla nalezena u bakterie *Lactococcus lactis*, která je užívána v průmyslu při fermentačních procesech mléka (Akcelik, 1998). Nejlépe charakterizovaným systémem je Sie_{2009}. Je nesen profágem Tuc2009 a byl nalezen i u několika dalších mírných fágů. Většina těchto fágů patří do skupiny P335 laktokokových fágů, avšak jimi nesený Sie_{2009} způsobuje rezistenci vůči odlišné fágové skupině 936, která je hlavní skupinou fágů vyskytujících se v mléčném průmyslu. (McGrath a kol., 2002). Kromě tohoto systému byla objevena řada dalších podobných systémů, jež jsou neseny profágy, např. $Sie_{mg2/312}$, nebo Sie_{T712} (Mahony a kol., 2008). Předpokládá se, že jsou lokalizovány na membráně a zabraňují vstupu DNA do buňky.

Dalším z objevených fágových genů, zodpovědných za rezistenci hostitele vůči superinfekci, je gen *lp*t pro lipoprotein. Je nesen fágem TP J34, který infikuje *Streptococcus*

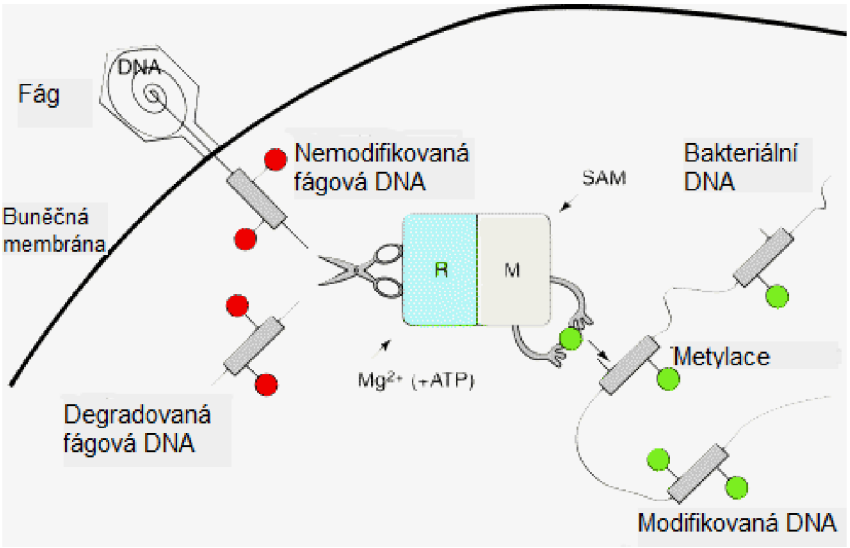
thermophilus (Neve a kol., 1998). Tento gen je lokalizován v operonu s třemi dalšími geny (genem pro integrázu a genem pro protein s metaloproteinázovým motivem) a celý operon pak začíná represorem, potřebným k udržení lyzogenního stavu. Je složený ze 142 AMK (von Heijne,1989). *Lpt* se exprimuje během lyzogenního cyklu a je aktivní proti superinfekci (Sun a kol., 2006). Neovlivnuje adsorpci, ale narušuje injekci DNA do buňky.

Lipoproteiny jsou u fágů vcelku vzácné. U fága λ se během lyzogenního cyklu exprimují 2 geny pro lipoproteiny, a to gen *bor*, jehož produkt je zahrnut v rezistentním séru lyzogenních buněk (Barondes a Beckwirth, 1995), a dále gen *rzl*, jež se uplatní v lytickém cyklu (Kedzierska a kol., 1996).

1.4.3. Restrikčně-modifikační systémy

Když nemethylovaná fágová DNA vstoupí do hostitelské buňky, je rozeznána restrikčním enzymem a degradována (obr. 8). Tato restrikce vede k rozštěpení jakékoliv cizí DNA, která nenese odpovídající metylaci. Malý počet nemodifikovaných fágových genomů je však schopen se tomuto štěpení vyhnout, díky následné replikaci spolu s bakteriálním genomem získává modifikaci methylázou a je schopen se vyhnout restrikci i v následujících infekčních cyklech (Marks a Sharp, 2000). Osud fágové DNA v hostitelské buňce je tedy určen těmito dvěma enzymy. Vlastní DNA mají bakterie modifikovanou metylací na specifických místech a ta je pak chráněna proti rozštěpení restrikčními endonukleázami. RM systémy se člení do 4 základních typů (typ I, II, III, IV) na základě odlišnosti enzymové struktury, reakčního mechanismu a typu DNA, jež rozeznávají (http://rebase.neb.com). Zástupci všech těchto typů byli nalezeni i u druhu *S. aureus*.

Obr č. 8: Funkce RM systému. Převzato z Tock a Drayen (2005); upraveno.

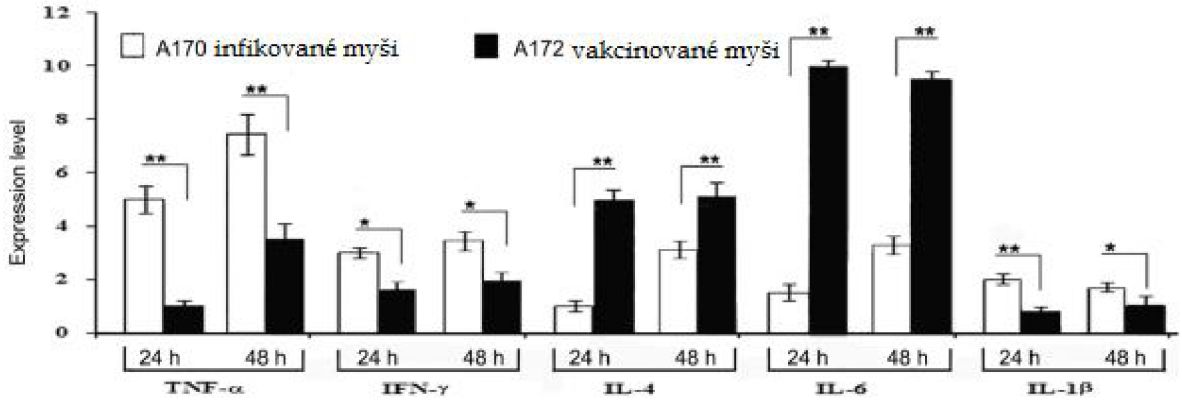


Aby se fágy vypořádaly s těmito systémy, vyvinuly několik strategií. Jedna z nich je absence míst, která jsou rozeznávána restriktázou, pomocí hromadění bodových mutací. Např. stafylokokový polyvalentní fág K se dokáže vyhnout restrikci tím, že nemá ve svém řetězci sekvenci 5´-GATC- 3´, jež je rozpoznávána RM systémem Sau3A (Kruger a kol., 1988).

Některé fágy se vyhnou restrikci díky glukosylaci DNA. *E. coli* CT596 je však schopná atakovat i glukosylovanou DNA a to díky dvoukomponentímu systému složenému ze 2 proteinů: GmrS a GmrD (Bair a kol., 2007). Jsou kódovány profágem a rozpoznávají a rozstřihávají pouze tu DNA, která obsahuje glukosylovaný hydroxymethylcytosin.

Rezistence vůči bakteriofágům nemusí bakterii přinášet pouze výhody. Když se bakterie přizpůsobuje prostředí a stává se rezistentní vůči mnoha fágům, často přitom ztrácí původní vlastnosti, např. virulentní faktory. Fágy mohou využívat jako receptor esenciální součást buněčné stěny a tak aby bakterie získala rezistenci, musí se této části zbavit anebo ji pozměnit (Scott a kol., 2007). Díky tomu se může stát méně virulentní. Toho by mohlo být využito při přípravě vakcíny proti stafylokokové infekci (Capparelli a kol., 2010). Pomocí selekce na rezistenci vůči antibiotikům a fágům byl připraven oslabený kmen A172. Z něj byla připravena vakcína A172 HK (heat killed), která byla následně podána myším. Tyto myši pak byly vystaveny působení MRSA a VRSA kmenů. Vakcína poskytovala efektivní ochranu proti těmto kmenům po dobu nejméně 20 týdnů. Příliš vysoká dávka vakcíny však způsobila úmrtí 40% - 50%. Vakcinace A172HK mění expresi genů (obr. 9), kódujících prozánětlivé cytokiny (IFN-γ, I1-β a TNF-α) a indukuje transkripci protizánětlivých cytokinů Il-4 a Il-6 (ten reguluje expresi prozánětlivých cytokinů).

Obrázek 9: Protizánětlivá aktivita vakcíny A172. Převzato z Capparelli a kol. (2010).



Stafylokoková infekce způsobuje zvýšené uvolňování prozánětlivých cytokinů, díky čemuž se zvýší propustnost cév a infekce se rozšíří z krve do tkání (Nilsson a kol., 1998). Zvýšená sekrece INF- γ pak způsobuje nekrózu v ledvinách myší, jež jsou nakaženy stafylokoky (Hu a kol., 2003). Vakcinace A172 tak indukuje balancovanou pro i proti zánětlivé imunitní odpovědi (Capparelli a kol., 2010). Selekční nevýhoda senzitivních bakterií je tak vyvážena sníženou fitness rezistentních bakterií, což přispívá k diverzitě bakteriální populace (Middelboc a kol., 2001).

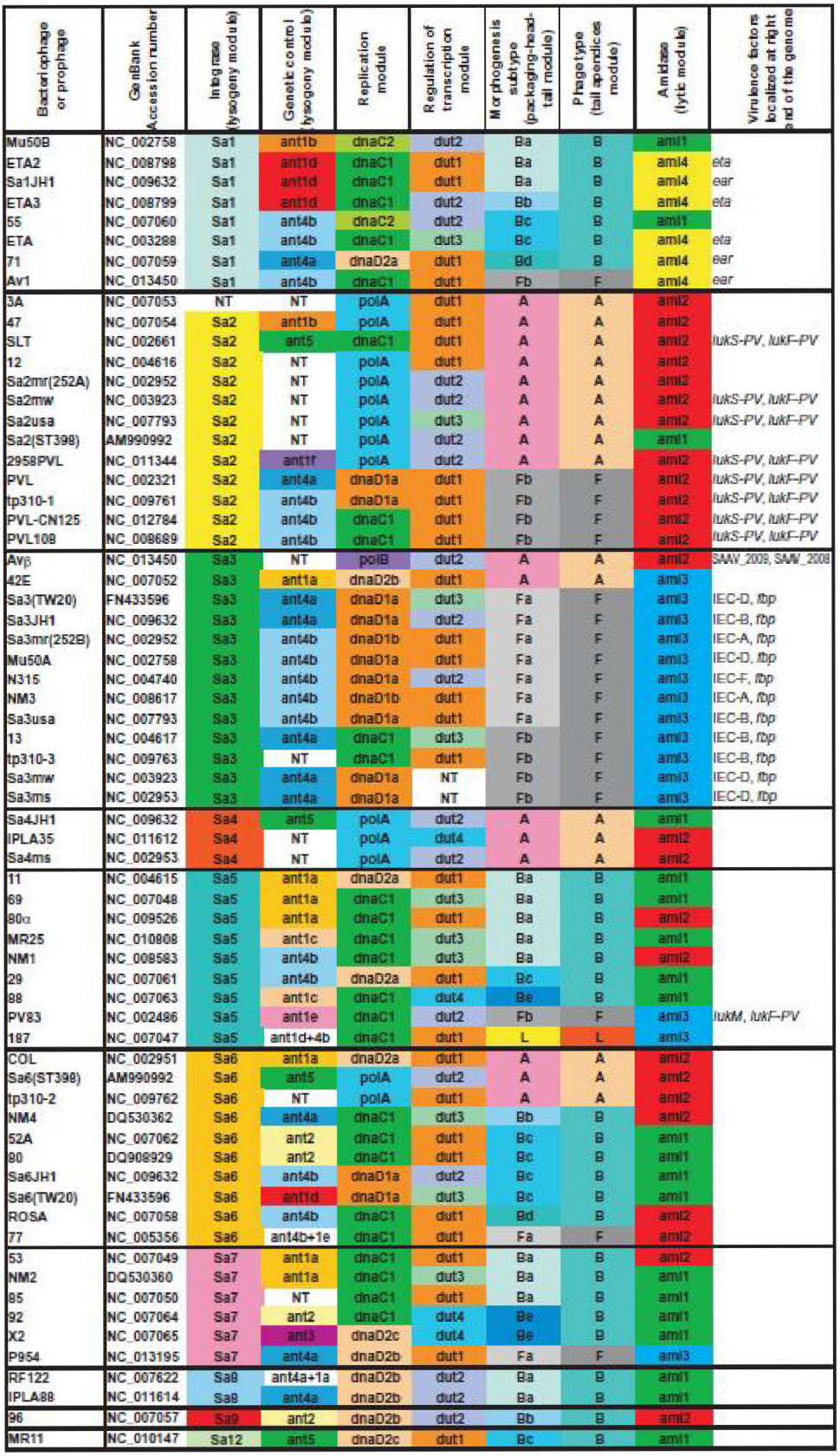
1.5. Struktura genomu mírných fágů druhu *S. aureus*

Genom mírných fágů má modulové uspořádání. Postupně jsou za sebou řazeny geny, které souvisí s určitými funkcemi. Celkově tak můžeme rozlišit 8 hlavních modulů (obr. 10).

Obrázek 10: Modulové uspořádání genů u mírných fágů *S. aureus*. Převzato z Iandolo a kol. (2002); upraveno.

Toto uspořádání nám umožňuje charakteristiku a klasifikaci profágů s využitím jednotlivých modulů. Postupně byly vybrány reprezentativní ORF pro PCR, jež dobře charakterizují jednotlivé moduly a odpovídají jednotlivým typům a podtypům a to s využitím komparativní genomové analýzy dostupných fágových genomů (Pantůček a kol., 2004; Goerke a kol., 2009; Kahánková a kol., 2010). Na základě těchto PCR se tak dají profágy čeledi *Siphoviridae* dobře charakterizovat (obr. 11).

Obrázek 11: *In silico* klasifikace mírných fágů u druhu *S. aureus*; převzato z Kahánková a kol. (2010).



Bacteriophage or prophage	GenBank Accession number	Integrase (lysogeny module)	Genetic control (lysogeny module)	Replication module	Regulation of transcription module	Morphogenesis subtype (packaging-head-tail module)	Phagetype (tail appendices module)	Amidase (lytic module)	Virulence factors localized at right end of the genome
Mu50B	NC_002758	Sa1	ant1b	dnaC2	dut2	Ba	B	ami1	
ETA2	NC_008798	Sa1	ant1d	dnaC1	dut1	Ba	B	ami4	*eta*
Sa1JH1	NC_009632	Sa1	ant1d	dnaC1	dut1	Ba	B	ami4	*ear*
ETA3	NC_008799	Sa1	ant1d	dnaC1	dut2	Bb	B	ami4	*eta*
55	NC_007060	Sa1	ant4b	dnaC2	dut2	Bc	B	ami1	
ETA	NC_003288	Sa1	ant4b	dnaC1	dut3	Bc	B	ami4	*eta*
71	NC_007059	Sa1	ant4a	dnaD2a	dut1	Bd	B	ami4	*ear*
Av1	NC_013450	Sa1	ant4b	dnaC1	dut1	Fb	F	ami4	*ear*
3A	NC_007053	NT	NT	polA	dut1	A	A	ami2	
47	NC_007054	Sa2	ant1b	polA	dut1	A	A	ami2	
SLT	NC_002661	Sa2	ant5	dnaC1	dut1	A	A	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
12	NC_004616	Sa2	NT	polA	dut1	A	A	ami2	
Sa2mr(252A)	NC_002952	Sa2	NT	polA	dut2	A	A	ami2	
Sa2mw	NC_003923	Sa2	NT	polA	dut2	A	A	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
Sa2usa	NC_007793	Sa2	NT	polA	dut3	A	A	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
Sa2(ST398)	AM990992	Sa2	NT	polA	dut2	A	A	ami1	
2958PVL	NC_011344	Sa2	ant1f	polA	dut2	A	A	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
PVL	NC_002321	Sa2	ant4a	dnaD1a	dut1	Fb	F	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
tp310-1	NC_009761	Sa2	ant4b	dnaD1a	dut1	Fb	F	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
PVL-CN125	NC_012784	Sa2	ant4b	dnaC1	dut1	Fb	F	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
PVL108	NC_008689	Sa2	ant4b	dnaC1	dut1	Fb	F	ami2	*lukS-PV, lukF-PV*
Avβ	NC_013450	Sa3	NT	polB	dut2	A	A	ami2	SAAV_2009, SAAV_2008
42E	NC_007052	Sa3	ant1a	dnaD2b	dut1	A	A	ami3	
Sa3(TW20)	FN433596	Sa3	ant4a	dnaD1a	dut3	Fa	F	ami3	IEC-D, *fbp*
Sa3JH1	NC_009632	Sa3	ant4a	dnaD1a	dut2	Fa	F	ami3	IEC-B, *fbp*
Sa3mr(252B)	NC_002952	Sa3	ant4b	dnaD1b	dut1	Fa	F	ami3	IEC-A, *fbp*
Mu50A	NC_002758	Sa3	ant4b	dnaD1a	dut1	Fa	F	ami3	IEC-D, *fbp*
N315	NC_004740	Sa3	ant4b	dnaD1a	dut2	Fa	F	ami3	IEC-F, *fbp*
NM3	NC_008617	Sa3	ant4b	dnaD1b	dut1	Fa	F	ami3	IEC-A, *fbp*
Sa3usa	NC_007793	Sa3	ant4b	dnaD1a	dut1	Fa	F	ami3	IEC-B, *fbp*
13	NC_004617	Sa3	ant4a	dnaC1	dut3	Fb	F	ami3	IEC-B, *fbp*
tp310-3	NC_009763	Sa3	NT	dnaC1	dut1	Fb	F	ami3	IEC-B, *fbp*
Sa3mw	NC_003923	Sa3	ant4a	dnaD1a	NT	Fb	F	ami3	IEC-D, *fbp*
Sa3ms	NC_002953	Sa3	ant4a	dnaD1a	NT	Fb	F	ami3	IEC-D, *fbp*
Sa4JH1	NC_009632	Sa4	ant5	polA	dut2	A	A	ami1	
IPLA35	NC_011612	Sa4	NT	polA	dut4	A	A	ami2	
Sa4ms	NC_002953	Sa4	NT	polA	dut2	A	A	ami2	
11	NC_004615	Sa5	ant1a	dnaD2a	dut1	Ba	B	ami1	
69	NC_007048	Sa5	ant1a	dnaC1	dut3	Ba	B	ami1	
80α	NC_009526	Sa5	ant1a	dnaC1	dut1	Ba	B	ami2	
MR25	NC_010808	Sa5	ant1c	dnaC1	dut3	Ba	B	ami1	
NM1	NC_008583	Sa5	ant4b	dnaC1	dut3	Ba	B	ami2	
29	NC_007061	Sa5	ant4b	dnaD2a	dut1	Bc	B	ami1	
88	NC_007063	Sa5	ant1c	dnaC1	dut4	Be	B	ami1	
PV83	NC_002486	Sa5	ant1e	dnaC1	dut2	Fb	F	ami3	*lukM, lukF-PV*
187	NC_007047	Sa5	ant1d+4b	dnaC1	dut1	L	L	ami3	
COL	NC_002951	Sa6	ant1a	dnaD2a	dut1	A	A	ami2	
Sa6(ST398)	AM990992	Sa6	ant5	polA	dut2	A	A	ami2	
tp310-2	NC_009762	Sa6	NT	polA	dut1	A	A	ami2	
NM4	DQ530362	Sa6	ant4a	dnaC1	dut3	Bb	B	ami2	
52A	NC_007062	Sa6	ant2	dnaC1	dut1	Bc	B	ami1	
80	DQ908929	Sa6	ant2	dnaC1	dut1	Bc	B	ami1	
Sa6JH1	NC_009632	Sa6	ant4b	dnaD1a	dut2	Bc	B	ami1	
Sa6(TW20)	FN433596	Sa6	ant1d	dnaD1a	dut3	Bc	B	ami1	
ROSA	NC_007058	Sa6	ant4b	dnaC1	dut1	Bd	B	ami2	
77	NC_005356	Sa6	ant4b+1e	dnaC1	dut1	Fa	F	ami2	
53	NC_007049	Sa7	ant1a	dnaC1	dut1	Ba	B	ami2	
NM2	DQ530360	Sa7	ant1a	dnaC1	dut3	Ba	B	ami1	
85	NC_007050	Sa7	NT	dnaC1	dut1	Ba	B	ami1	
92	NC_007064	Sa7	ant2	dnaC1	dut4	Be	B	ami1	
X2	NC_007065	Sa7	ant3	dnaD2c	dut4	Be	B	ami1	
P954	NC_013195	Sa7	ant4a	dnaD2b	dut1	Fa	F	ami3	
RF122	NC_007622	Sa8	ant4a+1a	dnaD2b	dut2	Ba	B	ami1	
IPLA88	NC_011614	Sa8	ant4a	dnaD2b	dut2	Ba	B	ami1	
96	NC_007057	Sa9	ant2	dnaD2b	dut2	Bb	B	ami2	
MR11	NC_010147	Sa12	ant5	dnaD2c	dut1	Bc	B	ami1	

1.5.1. Začlenění fágové DNA do genomu bakterie

Nejdříve se fágová DNA musí začlenit do bakteriálního genomu, k čemuž využívá enzym integrázu. Ta zprostředkovává jednosměrnou, místně specifickou rekombinaci mezi dvěma úseky DNA (att místa) a vnoří tak fágový genom do hostitelského. Experimentálně byly klasifikovány integrázové typy Saint1 – Saint7 (Goreke a kol., 2009). Dále byl přidán Sa8int (nalezený u RF122) a Sa9int (nalezený u PS96);(Kahánková a kol., 2010).

1.5.2. Oblast kontroly lyzogenního stavu

Tento region zahrnuje lyzogenní modul kromě genů pro integrázu. Charakteristická vlastnost tohoto regionu je střídání se oblastí s vysokou homologií DNA a segmenty DNA s nízkou homologií (Kahánková a kol., 2010). Pro charakterizaci tohoto modulu byl použit gen pro antirepresor právě díky přítomnosti konzervativních i variabilních oblastí a kvůli ideální délce. Navíc tento gen koreluje s typy kontrolní oblasti lyzogenie a umožňuje tedy rychlé rozpoznání tohoto regionu. Antirepresory jsou většinou složeny ze 2 domén, jež se vážou na DNA. Zároveň je možná rekombinace mezi oblastmi, které tyto domény kódují. U *S. aureus* bylo identifikováno několik typů domén. První je BRO-N doména, jež se nachází téměř vždy na N konci a často je spojena s C koncovou doménou. Další je KilA-C doména (podílí se na usmrcení hostitelské buňky), AntA doména (antirepresor), ORF6C doména a Rha doména (Iyer etal., 2002).

1.5.3. Modul regulace transkripce

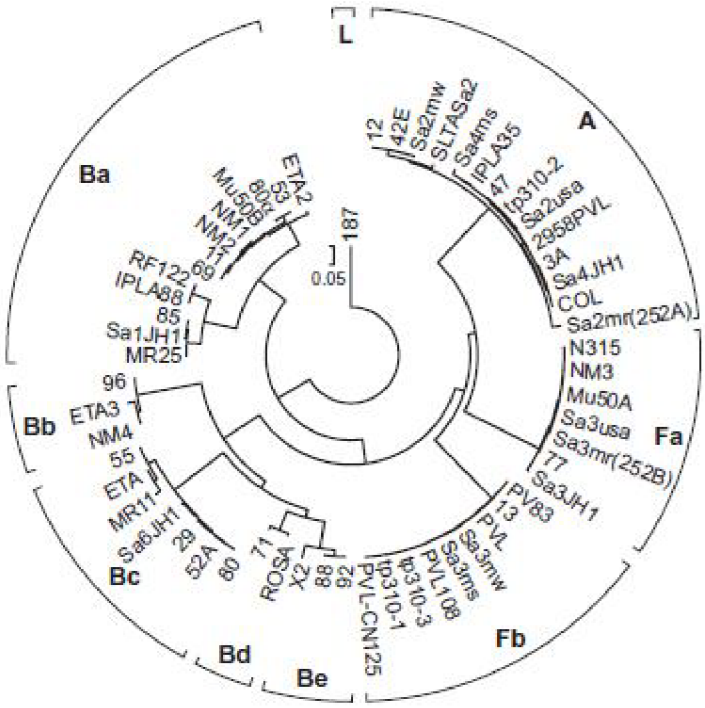
Tento modul je vymezen ORF50 ΦPVL na 5' konci a *rinB* na 3' konci a obsahuje geny spojené s regulací transkripce. Pro charakterizaci tohoto modulu byl zvolen gen pro dUTPázu. Tento gen má 4 varianty a to dut1, dut2, dut3 a dut4. DUTPáza je enzym, který hydrolyzuje dUTP na dUMP pyrofosfát. DUTPázy jsou rozděleny do 4 skupin na základě jejich podobnosti. Mezi skupinami se podobnost pohybuje od 42% do 72%, zatímco uvnitř skupin je podobnost mezi 76% - 100%. (Kahánková a kol., 2010)

1.5.4. Morfologický modul

Jedná se o oblast s geny pozdní exprese, které kódují strukturní proteiny pro sbalování DNA, fágovou hlavu a bičík. Podle dotplotového srovnání se všechny tři oblasti u sifofágů přenáší při horizontálním přenosu společně (Kahánková a kol., 2010). Pro diagnostiku byl vybrán nejvíce konzervovaný region pro sbalování DNA. Začíná pravděpodobně krátkým genem pro terminázu a končí genem *Clp* pro proteázu nebo

„prohead“ genem u seroskupin F a A, popřípadě hlavovým orfogenetickým proteinem (Mu-F) u seroskupiny B. Zatímco u skupiny A existuje pouze jeden morfogenetický typ, skupina B i F obsahuje ještě další podtypy na základě genu pro portálový protein. Skupina F se dále dělí na Fa a Fb (Pantůček a kol., 2004). U skupiny B bylo rozlišeno 5 podtypů Ba – Be (Kahánková a kol., 2010) obr. Oblast pro tvorbu bičíku odpovídá serologickým skupinámA,B, F a L fágů mezinárodní typizační sady a experimentálních fágů (Pantůček a kol., 2004).

Obrázek 12: Dendogramy ukazující podobnost sekvencí morfogenetického modulu u Siphoviridae. Převzato z Kahánková a kol. (2010).



1.5.5. Lytický modul

Tento modul je složen pouze z dvou genů a to pro enzymy holin a endolyzin, jež se uplatňují na konci lytického cyklu při buněčné lyzi. Endolyzin degraduje buněčnou stěnu, zatímco holin perforuje cytoplazmatickou membránu. Pro charakterizaci pomocí PCR byl vybrán pouze gen pro endolyzin, klasifikace holinu i endolyzinu spolu souvisí (Kahánková a kol., 2010). Většina endolyzinů je modulární struktury a obsahuje C-koncové vazebné (SH3b) a N-koncové katalytické domény (Young, 1992).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo popsat vliv lyzogenie na rezistenco kmenů *S. aureus* vůči polyvalentním fágům, zjistit které profágy navozují tuto necitlivost a následně tyto profágy blíže charakterizovat z hlediska jejich genomové struktury, obsahu genů a dalších vlastností.

Dílčí úkoly:

1. Stanovení citlivosti vybraných kmenů MRSA, obsahujících profágy, k polyvalentním fágům.
2. Výběr vhodných kmenů pro bližší charakterizaci jejich profágů.
3. Charakterizace profágů s využitím PCR pro klasifikaci fágových modulů.
4. Indukce profágů z necitlivých kmenů a následná lyzogenizace kmenů citlivých.
5. Komparativní genomika profágů u nichž jsou dostupné sekvence a jež navozují u svých hostitelů rezistenci.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Bakteriální kmeny a bakteriofágy

Bakteriofág 812 a jeho mutanty v rozmezí hostitele 812a, 812b, 812i, 812K1 a 812F1 a jejich pomnožovací kmen *S. aureus* 812 pochází ze sbírky Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů (LMDM).

Tabulka 1: Studované kmeny *S. aureus*. Zdroj kmenů: FN – fakultní nemocnice, LMDM - Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů

Kmen	Původ
PS6 (53+)	Sbírka LMDM
PS47	Sbírka LMDM
PS47 (53+)	Sbírka LMDM
PS47 (77+)	Sbírka LMDM
PS54 (53+)	Sbírka LMDM
PS83A (53+)	Sbírka LMDM
8511	Sbírka LMDM
8511 (53+)	Sbírka LMDM
8511 (77+)	Sbírka LMDM
8511 (85+)	Sbírka LMDM
8511 (84+)	Sbírka LMDM
S 26	Sbírka LMDM
ISP8	Sbírka LMDM
ISP8 (53+)	Sbírka LMDM
ISP8 (53+,77,M+)	Sbírka LMDM
ISP8 (53+,77+)	Sbírka LMDM
ISP8 (53+,M+)	Sbírka LMDM
ISP8 (53-)	Sbírka LMDM
ISP8 (77+)	Sbírka LMDM
ISP8 (47+, 11+)	Sbírka LMDM
ISP8 (47+)	Sbírka LMDM
ISP8 (85+)	Sbírka LMDM
1039 (42E+)	Sbírka LMDM
CCM5757	Česká sbírka mikroorganismů
420	FN Brno
08/3556	FN Brno
E14	FN Brno
HDE288	FN Brno
FN4	FN Brno
06/1298	FN Brno
E19	FN Brno
E26	FN Brno

09/2650	FN Brno
EP17	FN Brno
06/622	Praha Homolka
NRL 07/910	FN Brno
EP5	FN Brno
E48	FN Brno
E43	FN Brno
E53	FN Brno
E29	FN Brno
FN32	FN Brno
3A	Sbírka LMDM
3C	Sbírka LMDM
6	Sbírka LMDM
29	Sbírka LMDM
42D	Sbírka LMDM
42E	Sbírka LMDM
52	Sbírka LMDM
52A	Sbírka LMDM
53	Sbírka LMDM
54	Sbírka LMDM
55	Sbírka LMDM
71	Sbírka LMDM
75	Sbírka LMDM
80	Sbírka LMDM
83A	Sbírka LMDM
84	Sbírka LMDM
85	Sbírka LMDM
95	Sbírka LMDM
96	Sbírka LMDM
187	Sbírka LMDM

3.2. Materiál

3.2.1. Kultivační média

Masopeptonový agar 1,5% (MPA):

Nutrient broth (Oxoid) ..... 13 g

Yeast extract (Oxoid) ..... 3 g

Pepton (Imuna) ..... 5 g

Agar (Oxoid) ..... 15 g

Masopeptonový agar 0,7% (MPA):

Nutrient broth (Oxoid) ..... 13 g

Yeast extract (Oxoid) ..... 3 g

Pepton (Imuna) ..... 5 g

Agar (Oxoid) ..... 7 g

destilovaná voda ..... 1000 ml

pH upraveno 10M NaOH na hodnotu 7,2

Masopeptonový bujón (MPB):

Nutrient broth (Oxoid) ..... 13 g

Yeast extract (Oxoid) ..... 3 g

Pepton (Imuna) ..... 5 g

destilovaná voda ..... 1000 ml

ml

pH upraveno 10M NaOH na hodnotu 7,2

2×YT médium:

Trypton (Oxoid) .....16 g

Yeast extract (Oxoid) ..... 10 g

NaCl (Lachema) ..... 5 g

destilovaná voda ..... 1000 ml

pH upraveno 10M NaOH na hodnotu 7,0

destilovaná voda ..... 1000 ml

pH upraveno 10M NaOH na hodnotu 7,2

Luria-Bertani (LB) bujón:

Trypton (Oxoid) ..... 10 g

Yeast extract (Oxoid) ..... 5 g

NaCl (Lachema) ..... 5 g

destilovaná voda 1000

pH upraveno 10M NaOH na hodnotu 7,0

10× koncentrovaný profágový bujón:

Nutrient broth (Oxoid) .....3 g

NaCl (Lachema) .....2 g

Yeast extract (Oxoid) .....2 g

Trypton (Oxoid) .....10 g

destilovaná voda .....100 ml

Zamražovací médium HMFM

(Hogness modified freezing medium):

3,6mM K_2HPO_4 ..... 0,164 g

1,3mM KH_2PO_4 ..... 0,035 g

2,0mM citrát sodný ..... 0,118 g

1,0mM $MgSO_4.7H_2O$ ..... 0,049 g

4,4% (v/v) glycerol ..... 8,8 ml

voda doplněna do celkového objemu 200 ml

3.2.2. Materiál pro elektroforézu

agaróza na přípravu gelu pro elektroforézu (Lachema, SERVA)

agaróua s nízkou teplotou tání na přípravu gelu pro elektroforézu (Lachema, FLUKA)

1× koncentrovaný TAE pufr (40mM Tris-acetát, 1mM EDTA, pH 8,2)

3.2.3. DNA markery

100 bp DNA ladder (BioLabs) – velikost fragmentů 100 bp – 1 517 bp

2-log DNA ladder (BioLabs) – velikost fragmentů 100 bp – 10 000 bp

3.2.4. Materiál pro PCR

Taq DNA polymeráza (Invitrogen)

10× koncentrovaný pufr pro PCR bez $MgCl_2$ (Invitrogen)

roztok $MgCl_2$ v zásobní koncentraci 50 mM (Invitrogen)

nukleotidy dATP, dGTP, dTTP, dCTP v zásobních koncentracích 2 mM (Roche Diagnostics)

2× koncentrovaný FastStart PCR Master (Roche Diagnostics, Německo)

3.3. Laboratorní přístroje

Centrifugy:

Mini Spin plus (Eppendorf)

BR4i (Thermo Electron Corporation)

Mikro 220R (Hettich Zentrifugen)

Box na PCR Biosan (Biotech)

Termocykler T-gradient a T Personal Thermocykler (Biometra)

Termostat BT 120 (Laboratorní prístroje Praha)

Termostat Shaking incubator SHEL LAB (Biotech)

Thermo Shaker TS-100 Biosan (Biotech)

Proudový zdroj pro elektroforézu:

Power PAC 300 (BioRad)

EC 105 (Thermo Electron Corporation)

Trepacka Lab Dancer (IKA)

Váhy Navigator (OHAUS)

Vakuová odparka Savant SPD121P (Thermo Electron Corporation)

Vortex-2 Genie (Scientific Industries)

Cell Density Meter (WPA Biowave)

Digitální kamerový systém EDAS 290

(Kodac)

Laminární box Steril Antares (Schoeller Instruments)

pH metr pH210 (HANNA Instruments)

Spektrofotometr Nanodrop ND-2000c (Thermo Scientific)

3.3.1. Počítačový software a internetové nástroje pro analýzu sekvencí

BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA) – analýza sekvencí

mVista (Vista Tools for Comparative Genomics) – analýza sekvencí

Oligosearch 6.44 – analýza primerů

S.W.O.T Analysis (Protein Bar) – analýza proteinu

3.4. Metody

3.4.1. Stanovení citlivosti lyzogenních kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům

1. Do 18 hodinové bakteriální kultury *S. aureus* ve 20 ml MPB byly přidány 2 ml $CaCl_2$ (0,02M).

2. 100 µl této kultury bylo nepipetováno do 2,5 ml předem rozvařeného 0,7% MPA vytemperovaného na 45 °C. Obsah zkumavky byl rovnoměrně rozvrstven na misku s 1,5% MPA.

3. Po utuhnutí byly na povrch agaru nanášeny 10µl kapky příslušného ředění fágového lyzátu (nejčastěji bylo použito ředění 10^{-2} a 10^{-6}).

4. Následně proběhla kultivace 24hod/37 °C. U citlivého kmene se vytvořila jasná lytická zóna, v nižších ředěních byly patrné plaky. V opačném případě byl kmen považován za necitlivý. Pokud se vytvořila pouze matná plocha a ani v nižších ředěních nebyli přítomny plaky, byl kmen považován za necitlivý.

3.4.2. Titr fágových částic

Stanovení titru fágových částic bylo provedeno na standartním kmeni *S. aureus* 1039. Titry byly prováděny na 3 miskách od každého ředění, aby se odhalila případná chyba v provedení, výsledné počty se zprůměrovaly.

1. Fágový lyzát byl naředěn 10^{-3} až 10^{-7} dle očekávaného výsledku (do 0,9 ml bujónu 0,1 ml lyzátu, promícháno, novou pipetou přenést 0,1 ml lyzátu do dalších 0,9 ml bujónu atd.)

2. Do zkumavky s vytemperovaným 0,7% MPA na 45 °C bylo přidáno 100 ml 18hod bakt. kultury obsahující CaCl2 do výsledné koncentrace 0,002 M a 100 ml lyzátu v daném ředění;

3. Od jednoho ředění byl proveden výsev na 3 misky

4. Následně probíhala kultivace 18 hod / 37 °C. Na základě ředění a počtu plak na jednotlivých miskách byl poté spočten titr fágových částic v 1 ml indukovaného fágového lyzátu.

3.4.3. Stanovení adsorpce fágů na bakteriální buňku

Stanovení adsorpce fágů vychází z předpokladu, že pokud se fágové částice neadsorbují na bakteriální stěnu a zároveň ještě neproběhl celý lytický cyklus, poklesne výrazně titr fágových částic.

1. Byl proveden fágový titr na standardním kmeni 1039
2. Ve zkumavce bylo smícháno 5 ml testované 18tihodinové kultury, 0,5 ml $CaCl_2$ (0,02M) a 0,5 ml testovaného fága.
3. V časových intervalech 5,10 a 20 minut bylo odebráno 0,5 ml směsi.
4. Tato směs byla následně centrifugována (3 min/10 000 rpm) a bylo odebráno 0,2 ml supernatantu.
5. Supernatant byl naředěn až na 10^{-4} a byl proveden titr fága opět na standardním kmeni

3.4.4. Zamražení bakteriálních kultur

1. Do mikrozkumavky bylo napipetováno 500 ml sterilního HMFM.

2. Do ní byla naočkována1 platinová klička (cca 3 mm3) 24hod kultury narostlé na misce.

3. Na vortexu bylo vše důkladně promícháno a následně umístěno do mrazícího boxu o teplotě -70 °C

3.4.5. Příprava hrubého lyzátu pro PCR

1. 24-hodinová stacionární kultura narostlá v mikrozkumavce v 1 ml média MPB byla centrifugována 4 minuty při 12 000 rpm.
2. Pelet byl resuspendován v 1 ml sterilní vody a centrifugován stejným způsobem jako v předchozím bodě.
3. Pelet byl resuspendován v 1 ml sterilní vody a temperován ve stolním zahřívacím bloku 20 minut při 80 °C (lyze varem).
4. Zlyzované bakteriální buňky byly centrifugovány 4 minuty při 12 000 rpm.
5. Bakteriální DNA uvolněná v supernatantu byla použita jako templát pro PCR.

3.4.6. Multiplex PCR na detekci typu serologické skupiny profágů

Na základě strukturních genů byla navržena PCR rozdělující profágy do 4 sérologických skupin. Čtyři páry primerů (SGA1, SGA2; SGB1, SGB2; SGF3, SGF4; SGF5, SGF6) byly odvozeny ze sekvencí, jež kódují strukturní kapsidové proteiny a proteiny bičíkových vláken, poslední pár (SAU1, SAU2) je odvozen z konzervativní sekvence specifické pro druh *S. aureus* a má tedy funkci pozitivní kontroly. Do sérologické skupiny A patří fágy podobné fágu φ3A, do sérologické skupiny B fágy podobné fágu φ11, sérologická skupina F, rozdělena na podskupiny Fa a Fb, zahrnuje fágy příbuzné s fágem φ77 (Pantůček *a kol.*, 2004).

Tabulka 2: Složení multiplex PCR na detekci typu serologické skupiny profágů.

Složení	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem [µl]
deionizovaná sterilní H_2O			14,36
PCR pufr	10×	1×	2,50
$MgCl_2$	50 mM	2 mM	1,00
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,50
primery SGA1 + SGA2	100 µM	100 µM	0,15 + 0,15
primery SGB1 + SGB2	100 µM	100 µM	0,12 + 0,12
primery SGF3 + SGF4	100 µM	100 µM	0,20 + 0,20
primery SGF5 + SGF6	100 µM	100 µM	0,10 + 0,10
primery SAU1 + SAU2	100 µM	100 µM	0,10 + 0,10
Taq DNA polymeráza	5 U/µl	1 U	0,30
templátová DNA	100× ředěná, nebo neředěný hrubý lyzát	50 ng	3,00

Tabulka 3: Podmínky multiplex PCR na detekci typu serologické skupiny profágů.

Počáteční denaturace	94 °C	5 min	1x
Denaturace	94 °C	1 min	30x
Připojení primerů	58 °C	1 min 30 s	
Prodlužování primerů	70 °C	1 min 30 s	
Záverečné prodlužování primerů	70 °C	5 min	1x
Podmínky elektroforézy	1,5% gel		

3.4.7. Multiplex PCR na detekci genů pro fágové amidázy

Na základě homologie kyseliny aminové a organizace její domény byly vyvinuty 4 páry primerů detekující 4 typy endolyzinů. Pár ami 1 obsahující CHAP doménu, amidázovou 2 doménu (s N –acetylmuramoyl-L-alaninamidázovou aktivitou) a SH3b doménu. Dále ami 2 s CHAP doménou, amidázovou 3 doménou (s N –acetylmuramoyl-L-alaninamidázovou aktivitou) a SH3b doménou. Pár ami 3 jež obsahuje pouze CHAP doménu a pár ami 4 s CHAP doménou, amidázovou 3 doménou (Kahánková a kol., 2010).

Tabulka 4: Složení multiplex PCR směsi na detekci genů pro fágové amidázy.

Složení	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem [µl]
deionizovaná sterilní H_2O			14,5
PCR pufr	10×	1×	2,5
$MgCl_2$	25 mM	2,8 mM	1,3
dNTP	2 mM	0,216 mM	2,7
primery AMI 12F + AMI 12R	100 µM	10 µM	1,2 + 1,2
primery AMI 11F + AMI 11R	100 µM	10 µM	1,1 + 1,1
primery AMI 13F + AMI 13R	100 µM	10 µM	1 + 1
primery ETA F + ETA R	100 µM	10 µM	0,75 + 0,75
primery SAU1282 + SAU 1733	100 µM	10 µM	0,5 + 0,5
Taq DNA polymeráza	5 U/µl	1 U	0,30
templátová DNA	100× ředěná, nebo neředěný hrubý lyzát	50 ng	3,00

Tabulka 5: Podmínky multiplex PCR na detekci genů pro fágové amidázy.

Počáteční denaturace	95 °C	7 min	1x
Denaturace	94 °C	45s	23x
Připojení primerů	53 °C	30 s	
Prodlužování primerů	72 °C	1 min 30 s	
Záverečné prodlužování primerů	72 °C	5 min	1x
Podmínky elektroforézy	1,8% gel		

3.4.8. Multiplex PCR na detekci genů pro fágové dUTPázy

Tato PCR amplifikuje sekvence DNA, které korespondují s 4 hlavními typy dUTPáz. DUTPázy jsou rozděleny do těchto skupin na základě jejich podobnosti. Mezi skupinami se pohybuje od 42% do 72%, zatímco uvnitř skupin je podobnost mezi 76% - 100%. Dut1 patří k dUTPázám, které se běžně vyskytují u většiny organismů, zbývající typy dUTPáz jsou členy superrodiny dUTPáz_2 (Kahánková a kol., 2010).

Tabulka 6: Složení multiplex PCR směsi na detekci genů pro fágové dUTPázy.

Složení	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem [µl]
deionizovaná sterilní H_2O			9,1
FastStart PCR Master	2x	1x	12,5
primery dut1 F+ dut1 R	100 µM	0,2 µM	0,05 + 0,05
primer dut2 F	100 µM	0,2 µM	0,05
primer dut3 F	100 µM	0,2 µM	0,05
primer dut4 F	100 µM	0,2 µM	0,05
primery dut2 -3 -4 R	100 µM	0,2 µM	0,05
primery SAU1 + SAU 2	100 µM	0,2 µM	0,05 + 0,05
templátová DNA	50× ředěná, nebo neředěný hrubý lyzát	50 ng	3,00

Tabulka 7: Podmínky multiplex PCR na detekci genů pro fágové dUTPázy.

Počáteční denaturace	95 °C	15 min	1x
Denaturace	94 °C	30 s	24x
Připojení primerů	57 °C	1 min 30 s	
Prodlužování primerů	72 °C	1 min	
Záverečné prodlužování primerů	72 °C	10 min	1x
Podmínky elektroforézy	1,5% gel		

3.4.9. PCR na detekci genu pro fágový antirepresor

Fágové antirepresory jsou rozděleny do 5 základních typů s několika dalšími podtypy (Kahánková a kol., 2010). V této práci byla použita zjednodušená PCR zahrnující nejčastěji se vyskytující typy a to ant1a, ant1d, ant1e, ant2, ant4a a ant 4b.

Tabulka 8: složení multiplex PCR směsi na detekci genu pro fágový antirepresor.

Složení	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem [µl]
deionizovaná sterilní H_2O			14,36
PCR pufr	10×	1×	2,50
$MgCl_2$	50 mM	2 mM	1,00
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,50
primer 53upAR	10 µM	10 µM	0,5
primer 53lowAR	10 µM	10 µM	0,25
primer 47upAR	10 µM	10 µM	0,5
primer ETA2upAR	10 µM	10 µM	0,25
primer X2lowAR	10 µM	10 µM	0,25
primer 80lowAR	10 µM	10 µM	0,25
primer PV83lowAR	10 µM	10 µM	0,5
primer MR11upAR	10 µM	10 µM	0,25
primer MR11lowAR	10 µM	10 µM	0,25
primer 13upAR	10 µM	10 µM	0,25
primer 13lowAR	10 µM	10 µM	0,5
primer 29upAR	10 µM	10 µM	0,25
primer 88upAR	10 µM	10 µM	0,25
primer 88lowAR	10 µM	10 µM	0,25
primer SAU 1282	10 µM	10 µM	0,1
primer SAU 1733	10 µM	10 µM	0,1
Taq DNA polymeráza	5 U/µl	1 U	0,30
templátová DNA	50× ředěná, nebo neředěný hrubý lyzát	50 ng	3,00

Tabulka 9: Podmínky multiplex PCR na detekci genu pro fágový antirepresor.

Počáteční denaturace	95 °C	5 min	1x
Denaturace	94 °C	45 s	26x
Připojení primerů	49 °C	45 s	
Prodlužování primerů	72 °C	45 s	
Záverečné prodlužování primerů	72 °C	5 min	1x
Podmínky elektroforézy	3,5% gel FLUKA		

3.4.10. Návrh a optimalizace simplex PCR na detekci genu pro neznámý protein

Pomocí softwaru Oligosearch 6.44 byl navržen pár primerů k sekvenci 53ORF016 a následně vyroben firmou Invitrogen.

Tabulka 10: Primery pro 53ORF16

Primer	Sekvence	délka	Tm°	délka produktu
TP-F	TATCGTATTATGCTGCAACGG	21bp	62,3	291 bp
TP-R	TTATAAATTCGGTATTGGTGACT	23bp	58,1	

Tabulka 11: Složení simplex PCR směsi pro 53ORF016

Složení	**Zásobní koncentrace**	**Výsledná koncentrace**	**Objem [µl]**
deionizovaná sterilní H_2O			15,3
PCR pufr	10×	1×	2,5
$MgCl_2$	100 mM	2,5 mM	1
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,5
primer TP F	100 µM	100 µM	0,2
primer TP R	100 µM	100 µM	0,2
Taq DNA polymeráza	5 U/µl	1 U	0,30
templátová DNA	50× ředěná, nebo neředěný hrubý lyzát	50 ng	3,00

Tabulka 12: Podmínky simplex PCR na detekci 53ORF016

Počáteční denaturace	95 °C	8 min	1x
Denaturace	95 °C	30 s	30x
Připojení primerů	53 °C	30 s	
Prodlužování primerů	72 °C	30 s	
Záverečné prodlužování primerů	72 °C	5 min	1x
Podmínky elektroforézy	1,2% gel		

3.4.11. Elektroforéza v agarózovém gelu

Elektroforéza byla prováděna v 1× koncentrovaném TAE pufru, který byl získán naředěním 50× koncentrovaného zásobního roztoku (242 g Tris-base; 51,7 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA s pH 8,0; H_2O doplněna do 1 000 ml; výsledná hodnota pH 8,2). DNA byla separována v agarózovém gelu dle podmínek PCR, velikost napětí byla standardně nastavena na hodnotu 5 V/cm.Po proběhnutí elektroforézy byl agarózový gel barven v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1 μ g/ml po dobu 30 min., poté byl opláchnut destilovanou vodou a fotografován pod UV světlem při 302 nm

3.4.12. Indukce profágů UV zářením

1. 10 μl bakteriální kultury (donorový kmen) bylo naočkováno do 10 ml MPB a kultivováno 18 hodin při 37 °C.

2. Kompletní objem kultury byl přenesen do 50 ml MPB v 200ml Erlenmeyerově baňce a byl provzdušňován 2 hodiny při 37 °C za třepání o rychlosti 120 rpm.

3. Poté bylo 45 ml kultury přeneseno do 50 ml kónické zkumavky a centrifugováno 20 minut při 3 000 rpm.

4. Pelet byl resuspendován ve fyziologickém roztoku do hodnoty optické hustoty 0,15 (při vlnové délce 600 nm).

5. 10 ml takto naředěné buněčné suspenze bylo pipetováno do sterilní Petriho misky a ozářeno v indukční skříni (odkryté víčko na Petriho misce). Vzdálenost misky od UV lampy a dobu

ozařování lze měnit tak, aby byl po indukci dosažen vysoký titr fágových částic. Kulturu je po ozáření potřeba co nejvíce chránit před viditelnou složkou světla.

6. Ozářená suspenze byla přenesena do sterilní Erlenmeyerovy baňky spolu s 30 ml fyziolog. roztoku a 10 ml 10× koncentrovaného profágového bujónu. Obsah baňky byl poté přenesen do 250ml provzdušňovačky a provzdušňován v temnu 2 hodiny při 37 °C do zlyzování buněk.

7. V případě neúplné lyze byl fágový lyzát ponechán přes noc v temnu při laboratorní teplotě.

8. Po projasnění byl lyzát zcentrifugován 10 minut při 5 000 rpm a zfiltrován přes komerčně dodávaný filtr (Millipore Millex, velikost pórů 0,45 μm).

3.4.13. Lyzogenizace

1. 20 μl rozmražené kultury buněk kmene S. aureus 1039 bylo naočkováno do 20 ml MPB a inkubovalo se 18 hod. při 37 °C.

2. Poté byly přidány 2 ml narostlé kultury do 50 ml MPB, 1 ml narostlé kultury do 20 ml MPB a kultury byly provzdušňovány 2 hod. při 37 °C do hustoty OD6oo = 0,3 (cca 2x10 buněk).

3. Do celkového objemu 50 ml byla namíchána lyzogenizační směs 1:1 (fág : buňka), do 20 ml byly namíchány směsi 10:1 (fág : buňka) a 1:10 (buňka : fág), používal se lyzát fága o titru cca 2 x 10^8PFU, do směsí byla přidána 1/10 0,02 M $CaCl_2$.

4. Směsi byly ponechány lyzovat přibližně 2 hod. při 37 °C za provzdušňování, poté byly uloženy do druhého dne v chladu a ve tmě.

5. Byla provedena centrifugace po dobu 15 min. při 4500 ot./min., supernatant byl odlit.

6. Sediment byl 2x promyt v 5 ml sterilního promývacího lyzogenizačního roztoku (0,15 M NaH_2P0_4; 0,15 M Na_2HP0_4; 0,01 M citrát sodný).

7. Následně byl sediment rozsuspendován v 1 ml MPB, naředěn fyziologickým roztokem na $10^0 – 10^{-4}$.

8. Z každého ředění bylo naočkováno 0,1 ml na 3 misky s MPA s 0,01 M citrátem sodným a rozetřeno skleněnou hokejkou.

9. Kultivace 18 hod. při 37 °C.

10. Jednotlivé kolonie byly přečárkovány sterilním párátkem (výběr alespoň 30 kolonií) na MPA s 0,01 M citrátem sodným, kultivace 20 hod. při 37 °C.

11. Kolonie byly 3 x pasážovány na MPA s 0,01 M citrátem sodným, pokaždé byly kultivovány 20 hod. při 37 °C.

12. Byl proveden test na rezistenci k původnímu fágu, kterým byl kmen lyzogenizován. Na misku s MPA (bez citrátu) byly naočkovány kličkou čárky (čárky označit čísly stejnými jako kultury podle matrice). Na ně bylo nakápnuto 10 ul lyzátu původního fága. Kultivace 20 hod. při 37 °C a dle potřeby dále 72 hod. při 25 °C.

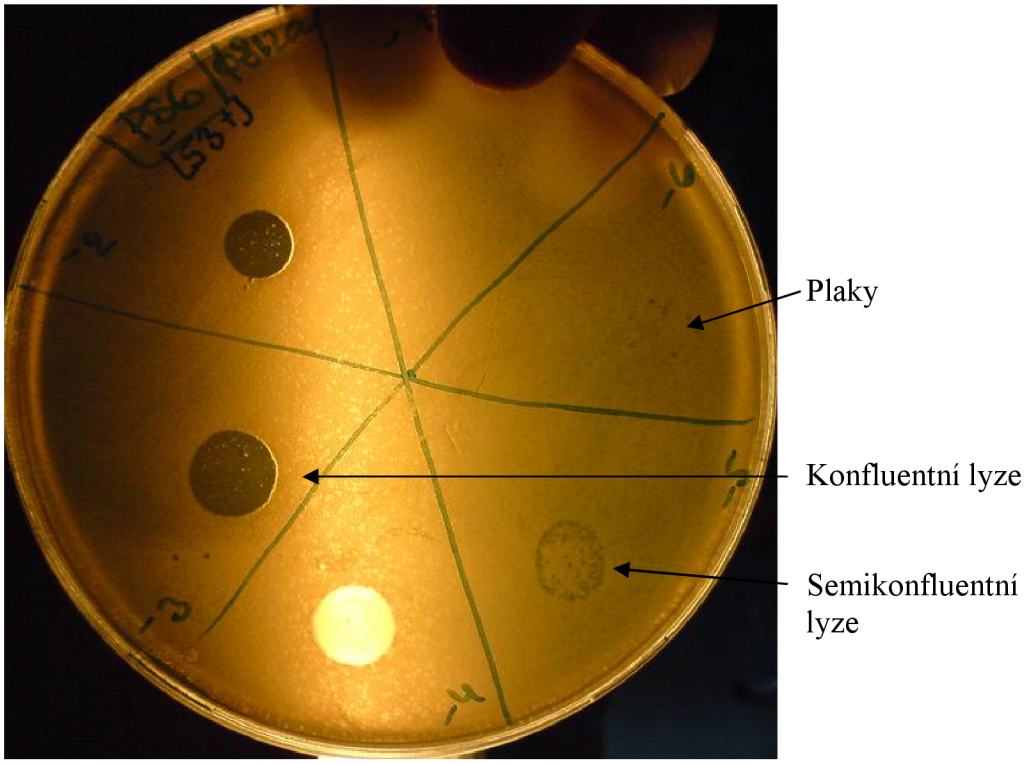
13. U rezistentních kultur byly připraveny hrubé buněčné lyzáty a provedena PCR pro detekci genu amidázy.

4. VÝSLEDKY

4.1. Citlivost vybraných kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům

Prvním krokem bylo otestovat vybrané kmeny k polyvalentnímu fágu 812 a jeho mutantám v rozmezí hostitele. Na základě testů citlivosti byly vybírány kmeny na podrobnější zkoumání. Testování citlivosti bylo provedeno na uměle lyzogenizovaných kmenech, na kmenech s neznámými profágy a na kontrolních kmenech bez profágů. První testování citlivosti uměle lyzogenizovaných kmenů bylo provedeno již dříve v LMDM. Jelikož řada kmenů vykazovala odlišné výsledky, byly tyto testy opakovány a rozšířeny (tab. 13). Dále bylo provedeno testování citlivosti na propagačních kmenech mezinárodní řady mírných fágů (PS kmeny, tab. 14).

Obrázek 13 : Test citlivosti kmene PS6(53+) k fágu 812a. Citlivý kmen vůči tomuto fágu.



Tabulka 13: Citlivost vybraných kmenů k polyvalentnímu fágu 812 a jeho mutantám. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

Bakteriální kmen		Citlivost k fágům					
		812	812a	812b	812i	K1	F1
PS kmeny a lyzogeny	PS6	++	++	++	++	++	++
	PS6 (53+)	m	++	m	++	++	++
	PS47	m	++	m	++	++	++
	PS47 (53+)	m	++	m	++	++	++
	PS47 (77+)	-	++	-	++	++	++
	PS54	++	++	++	++	++	++
	PS54 (53+)	-	++	-	++	++	++
	PS83A	-	++	-	++	++	++
	PS83A (53+)	-	++	-	++	++	++
8511 a lyzogeny	8511	++	++	++	++	++	++
	8511 (53+)	-	M	-	m	m	m
	8511 (77+)	++	++	++	+	++	++
	8511 (85+)	++/m	++/+	++/m	+/+	+/+	+/m
	8511 (84+)	++	++	++	++	++	++
S 26	S 26	-	++	m	++	+	++
ISP8 a lyzogeny	ISP8	++	++	++	++	++	++
	ISP8 (53+)	-	++	-	++	++	++
	ISP8 (53+,77,M+)	-	++	-	++	++	++
	ISP8 (53+,77+)	-	++	-	++	++	++
	ISP8 (53+,M+)	-	++	-	++	++	++
	ISP8 (53-)	-?	+	-	?/+	++	++
	ISP8 (77+)	++	++	++	++	++	++
	ISP8 (47+, 11+)	-	+	-	+	+	+
	ISP8 (47+)	-	++	m	++	++	++
	ISP8 (85+)	++	++	++	++	++	++

Tabulka 14: Citlivost PS kmenů k polyvalentnímu fágu 812 a jeho mutantám. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

PS kmeny	Citlivost k fágům				PS kmeny	Citlivost k fágům			
	812	812a	K1	F1		812	812a	K1	F1
3A	++	++	++	++	55	++	++	++	++
3C	++	++	++	++	71	++	++	++	++
6	++	++	++	++	75	++	++	++	++
29	++	-	-	-	80	++	++	++	++
42D	++	++	++	++	83A	-	++	-	++
42E	++	++	++	++	84	-	-	-	-
52	++	++	++	++	85	-	-	-	-
52A	++	++	++	++	95	-	-	-	-
53	++	++	++	++	96	++	++	++	++
54	++	++	++	++	187	++	++	++	++

Při pohledu na výslednou tabulku je patrné, že se některé kmeny staly po lyzogenizaci necitlivé k polyvalentním fágům. Prvním profágem, jež u svých hostitelů navozuje rezistenci je fág 53 (Rosypal a Horáková, 1968). Tento fág způsobil necitlivost původně citlivých

kmenů 8511, ISP8 či PS6. Obdobnou rezistenci navozuje i fág 47. U dalších profágů nebylo navození rezistence zaznamenáno. Fágy 53 a 47 tak zřejmě nesou neznámý mechanismus pro navození rezistence. Mnoho kmenů, jež jsou rezistentní, obsahují přirozeně ve svém genomu řadu neznámých profágů (např. PS47, PS83A či některé nemocniční kmeny). Proto bylo třeba blíže určit tyto profágy za pomocí několika PCR na detekci genů charakterizujících jednotlivé fágové moduly – viz další část této páce.

4.2. Stanovení schopnosti adsorpce polyvalentních fágů 812 a 812a na buňky *S. aureus*

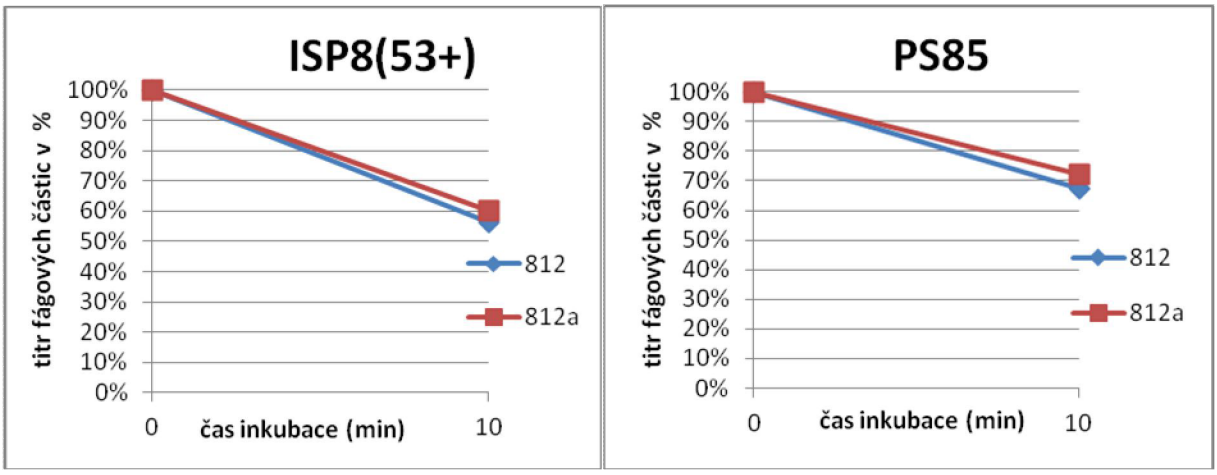
V rámci bližšího určení mechanismu rezistence byla testována schopnost lytických fágů adsorbovat se na hostitelskou buňku v závislosti na citlivosti nebo rezistenci hostitelského kmene. Jako zástupce polyvalentního fága byl vybrán fág 812, jež je schopen tvořit plaky na řadě kmenů, ale má menší hostitelské spektrum než jeho mutanta 812a. Ta je schopna překonat rezistenci většiny kmenů. Pro pozitivní kontrolu (kmen citlivý vůči oběma kmenům) byl zvolen kmen ISP8. Dále lyzogenní kmen ISP8 (53+), který je citlivý pouze vůči fágu 812a a kmen PS85, jenž je rezistentní vůči oběma fágům. Po stanovení počátečního titru probíhala inkubace s bakteriální kulturou 10 min, následně byla provedena centrifugace a fágový titr na citlivém kmenu *S. aureus* ISP8.

V tab. 15 jsou zaznamenány výsledné titry fágů po inkubaci, jejich původní titr a procentuální vyjádření zůstatku vůči původnímu titru. Pokaždé došlo ke snížení titru po inkubaci, a tedy k adsorpci fágů na hostitelské buňky. Z grafů 1 a 2 je patrné, že jsou rozdíly mezi různými kmeny, není však výrazný rozdíl mezi adsorpcí obou fágů na daném kmeni.

Tabulka 15: Adsorpce fágů na kmenech ISP8, ISP8 (53+) a PS85.

	fág 812		**fág 812a**	
Původní titry fágů*:	$2{,}3 \times 10^9$		$24{,}3 \times 10^8$	
Bakteriální kmen	**Výsledné titry fágů**			
ISP8	$3{,}3 \times 10^7$	1,4%	$8{,}8 \times 10^7$	3,6%
ISP8 (53+)	$1{,}3 \times 10^9$	56,5%	$1{,}4 \times 10^9$	60%
PS85	$1{,}5 \times 10^9$	67,4%	$1{,}7 \times 10^9$	72,1%

Grafy 1 a 2: Adsorpce fágů 812 a 812a na kmenech ISP8 (53+) a PS85



Pro ověření byly provedeny pokusy s dalším rezistentními i citlivými kmeny. Inkubace fágů probíhala v intervalech 5, 10 a 20 minut. Výsledek však opět potvrdil předchozí experimenty a žádný výrazný rozdíl adsorpce mezi fágy nebyl zaznamenán.

Tabulka 16: Adsorpce fágů 812 a 812a na kmenech ISP8 (47+) a ISP8 (85+)

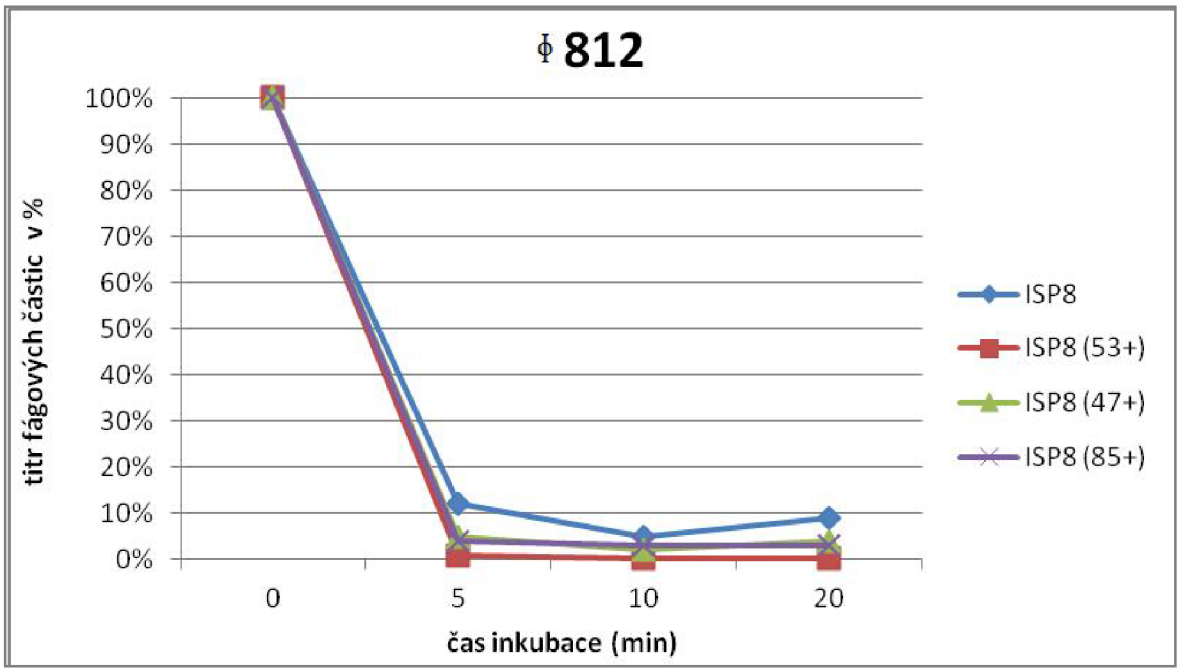
ISP8 (47+) - necitlivý k 812, citl. k 812a; ISP8 (85+) – citl. k 812, 812a

Původní titry	**812**		**812a**	
	$4x10^9$		$3,9x10^9$	
Kmen	Výsledné titry; čas inkubace: 5 min			
ISP8	$4,6x10^8$	12%	$6,5x10^8$	16,55%
ISP8 (47+)	$1,7x10^8$	5%	$3,5x10^8$	9,00%
ISP8 (85+)	$1,6x10^8$	4%	$1,4x10^8$	3,50%
čas inkubace: 10 min				
ISP8	$2,2x10^8$	5%	$2,5x10^8$	6%
ISP8 (47+)	$6x10^7$	2%	$7,5x10^7$	2%
ISP8 (85+)	$1,4x10^8$	3%	$7,5x10^7$	2%
čas inkubace 20 min				
ISP8	$3,7x10^8$	9%	$2,1x10^8$	5%
ISP8 (47+)	$1,5x10^8$	4%	$7,2x10^7$	2%
ISP8 (85+)	$1x10^8$	3%	$7,1x10^7$	2%

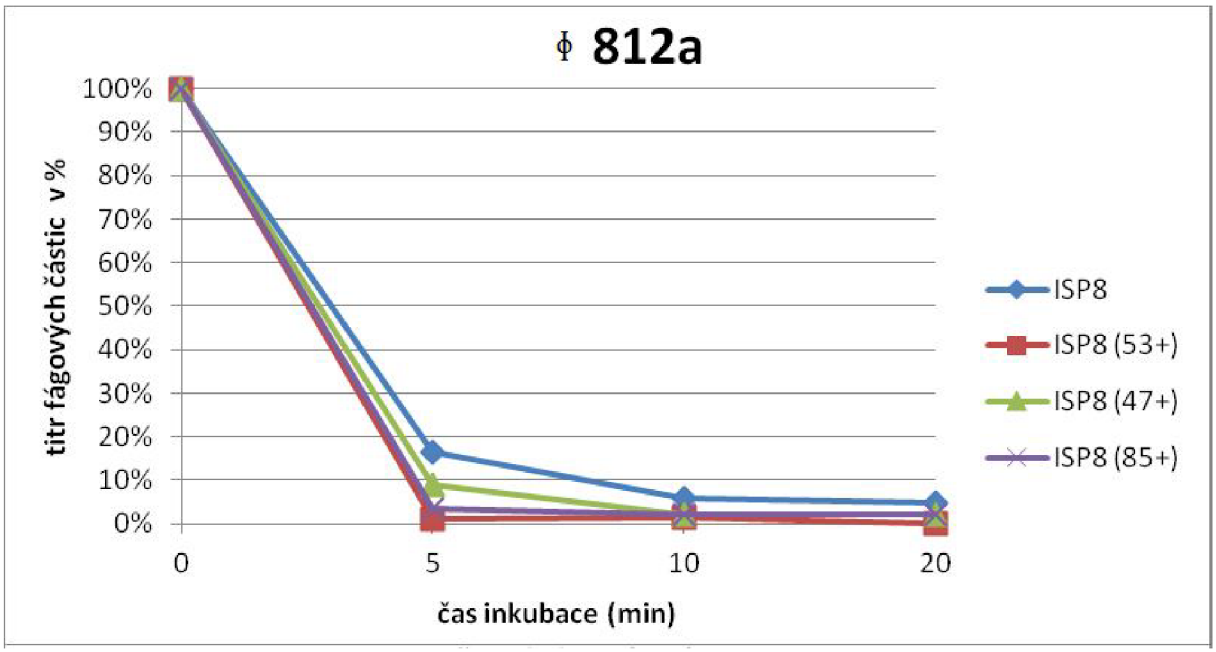
Tabulka 17: Adsorpce fágů 812 a 812a na kmenu IPS8 (53+), citlivém pouze k fágu 812a. Φ

Bakteriofág	812		812a	
Původní titry	$3,5x10^9$		$4,3x10^9$	
Kmen	Výsledné titry - čas inkubace: 5 min			
ISP8	$3,3\ x10^8$	9,40%	$3,7x10^8$	8%
ISP8 (53+)	$2,5x10^7$	0,70%	$5x10^7$	1,20%
čas inkubace: 10 min				
ISP8	$1,5x10^8$	4,30%	$1,9x10^8$	4,50%
ISP8 (53+)	$1x10^7$	0,30%	$6x10^7$	1,30%
čas inkubace 20 min				
ISP8	$8\ x10^7$	2,30%	$5,5x10^7$	1,30%
ISP8 (53+)	$1x10^7$	0,30%	$5x10^6$	0,10%

Graf 3: Adsorpce fága 812 na kmenech ISP8, ISP8 (47+), ISP8 (85+) a ISP8 (53+).



Graf č. 4. Adsorpce fága 812a na kmenech ISP8, ISP8 (47+), ISP8 (85+) a ISP8 (53+).



4.3. Profágový profil u vybraných kmenů

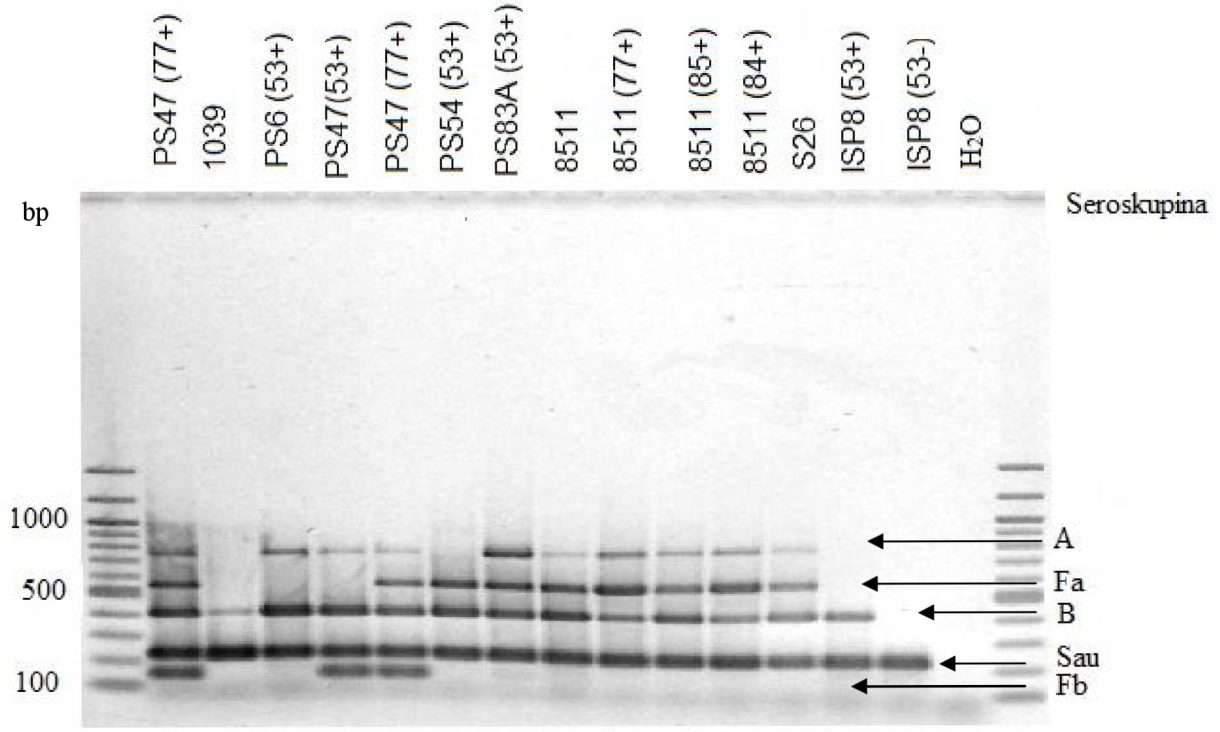
Necitlivé kmeny vůči polyvalentním fágům spolu s několika citlivými kmeny byly dále charakterizovány z hlediska obsahu profágů. Profágy obsažené v těchto kmenech byly klasifikovány pomocí čtyř PCR zaměřených na jednotlivé fágové moduly a to na morfologický modul, lytický modul, modul regulace transkripce a modul kontroly lyzogenního stavu.

4.3.1. Morfologický modul profágů

Nejdříve byla provedena PCR na detekci profágů spadajících do 4 různých serologických skupin - A, B, Fa a Fb. Dosavadní studie dávaly předpoklad, že většina rezistentních kmenů bude obsahovat ve svém genomu profága patřícího do sérologické skupiny B, tento předpoklad se však nepotvrdil. Nejdříve byly otestovány některé uměle lyzogenizované kmeny (tab. 18). V genomu kmene 8511 byly detekovány profágy spadající

do 3 různých sérologických skupin, včetně skupiny B, přesto tento kmen nevykazuje sníženou citlivost vůči polyvalentním fágům.

Obrázek 13: PCR na detekci serologických skupin profágů u vybraných kmenů. PS47 (77+) – pozitivní kontrola; 1039 a H_2O – negativní kontrola.



Následně byl otestován soubor nemocničních kmenů, u nichž byla citlivost stanovená již dříve v laboratoři LMDM. (tab. 19). Z výsledků je patrné, že i profág ze skupiny Fa může navodit rezistenci.

Tabulka 18: Výsledky PCR na detekci serologických skupin profágů u lyzogenních kmenů spolu s citlivostí k polyvalentním fágům. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

Bakteriální kmen		Citlivost k fágům						Serologické skupiny
		812	812 a	812 b	812 i	K1	F1	
PS kmeny a jejich lyzogeny	PS6	++	++	++	++	++	++	B
	PS6 (53+)	m	++	m	++	++	++	A, B
	PS47	m	++	m	++	++	++	A,B, Fb
	PS47 (53+)	m	++	m	++	++	++	A,B, Fb
	PS47 (77+)	-	++	-	++	++	++	A,Fa,B, Fb
	PS54	++	++	++	++	++	++	Fa,B
	PS54 (53+)	-	++	-	++	++	++	Fa,B
	PS83A	-	++	-	++	++	++	A,Fa,B
	PS83A (53+)	-	++	-	++	++	++	A,Fa,B
8511 a jeho lyzogeny	8511	++	++	++	++	++	++	A,Fa,B
	8511 (53+)	-	M	-	m	m	m	A,Fa,B
	8511 (77+)	++	++	++	+	++	++	A,Fa,B
	8511 (85+)	++/ m	++/ +	++/ m	+/+	+/+	+/ m	A,Fa,B
	8511 (84+)	++	++	++	++	++	++	A,Fa,B
S 26	S 26	-	++	m	++	+	++	A,Fa,B
ISP8 a jeho lyzogeny	ISP8	++	++	++	++	++	++	-
	ISP8 (53+)	-	++	-	++	++	++	B
	ISP8 (53+,77,M+)	-	++	-	++	++	++	A,Fa,B
	ISP8 (53+,77+)	-	++	-	++	++	++	Fa,B
	ISP8 (53+,M+)	-	++	-	++	++	++	A,B
	ISP8 (53-)	-?	+	-	?/+	++	++	-
	ISP8 (77+)	++	++	++	++	++	++	Fa
	ISP8 (47+, 11+)	-	+	-	+	+	+	A,B
	ISP8 (47+)	-	++	m	++	++	++	A
	ISP8 (85+)	++	++	++	++	++	++	B

Tabulka 19: Výsledky PCR na detekci serologických skupin profágů u nemocničních kmenů spolu s citlivostí k polyvalentním fágům. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

Bakteriální kmen	Serologické skupiny	Citlivost k fágům						
		812	812a	812b	812i	K1	F1	S
420	Fa,B	m	m	m	-	m	++	-
08/3556	Fa	-	-	-	-	-	-	-
E14	Fa	m	m	m	m	m	m	m
HDE288	A,Fa,B	-	-	m	m	++	m	-
FN4	Fa,B	-	-	m	-	m	++	-
06/1298	Fa	-	-	-	-	m	-	-
E19	A,Fa,B	-	++	m	++	++	++	++
E26	A,Fa,B	++	++	++	++	++	++	++
09/2650	A,Fa,B	-	-	-	-	-	++	-

Pro doplnění je přiložena tabulka se serologickými skupinami PS kmenů, které byly testovány dříve v laboratoři LMDM. (tab. 20). Z ní je patrné, že rezistentní kmeny obsahují nejčastěji profágy skupiny B a Fa. Většina kmenů však obsahuje několik profágů a s rezistencí mohou souviset fágy z jakékoliv serologické skupiny

Tabulka 20: Výsledky PCR na detekci serologických skupin profágů u PS kmenů spolu s citlivostí k polyvalentním fágům. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

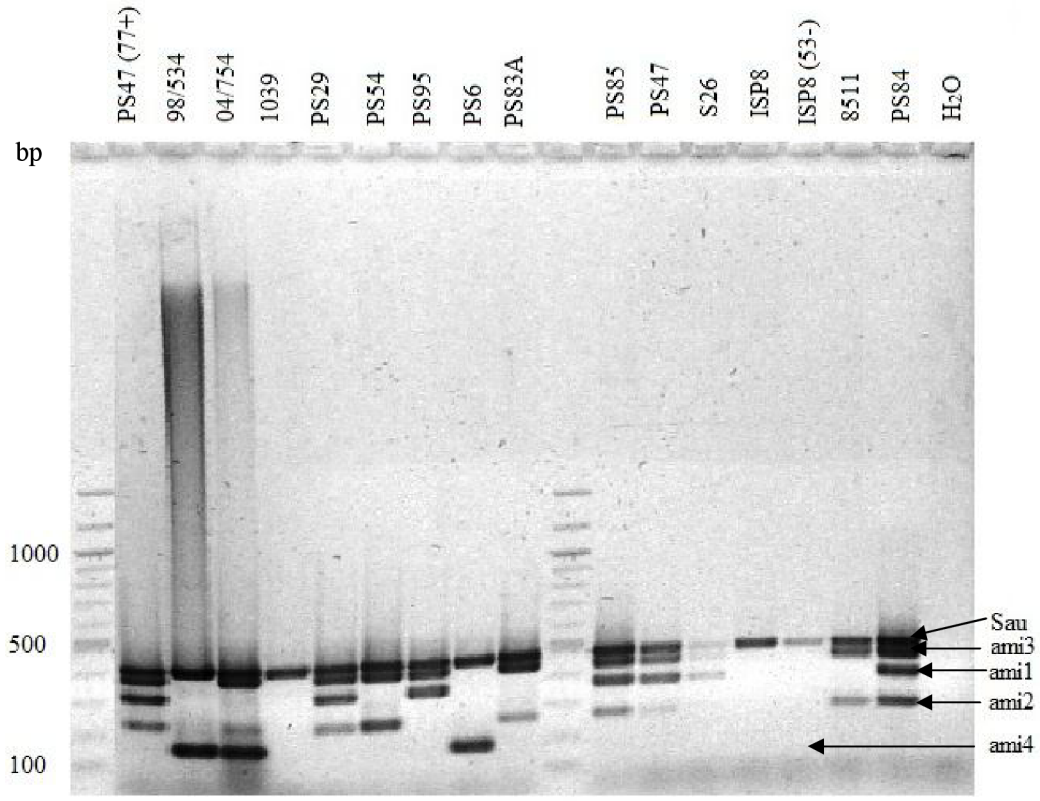
PS kmeny	Serologické skupiny	Citlivost k fágům			
		812	812a	K1	F1
3A	Fa	++	++	++	++
3C		++	++	++	++
6	B	++	++	++	++
29	Fa,Fb, B	++	-	-	-
42D	Fa	++	++	++	++
42E	Fa	++	++	++	++
52	Fa,Fb	++	++	++	++
52A	Fa,Fb	++	++	++	++
53	A,Fa,B	++	++	++	++
54	Fa,B	++	++	++	++
55	Fb	++	++	++	++
71	Fb	++	++	++	++
75	Fa,B	++	++	++	++
80	Fa,Fb	++	++	++	++
83A	A,Fa,B	-	++	-	++
84	Fa,B	-	-	-	-
85	Fa,B	-	-	-	-
95	Fa,B	-	-	-	-
96	Fb	++	++	++	++
187	Fa	++	++	++	++

.

4.3.2. Lytický modul profágů

Vybrané kmeny byly dále testovány na přítomnost genů pro 4 typy fágových amidáz. Amidázy jsou enzymy, které se uplatní na konci lytického cyklu při pronikání nových fágových částic ven z buňky a používají se na typizaci lytického modulu. Účelem této PCR bylo blíže specifikovat profágy, zároveň lze konstatovat, že nebyla nalezena korelace mezi lytickým modulem a citlivosti. Všechny typy amidáz se nacházely u kmenů citlivých i rezistentních (tab. 21).

Obrázek 14: PCR na detekci genů pro fágové amidázy. PS47 (77+), 98/534, 04/754 – pozitivní kontroly, 1039 a H_2O – negativní kontroly



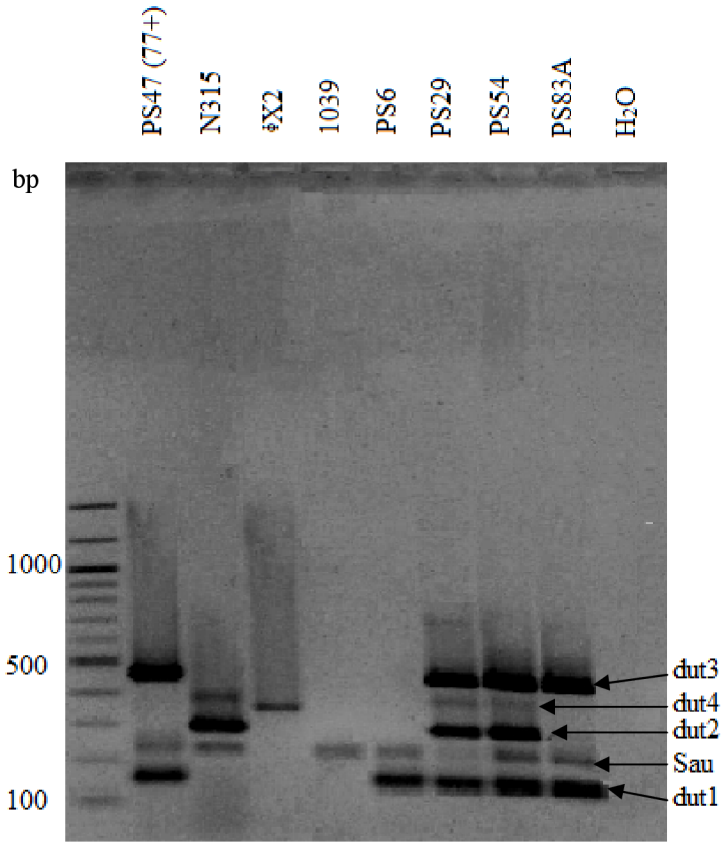
Tab č. 21: Výsledky PCR na detekci genů pro fágové amidázy spolu s citlivostí k polyvalentním fágům. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

Bakteriální kmen	Souhrn	Citlivost k fágům						
		812	812a	812b	812i	K1	F1	Stafal
420	Ami1,ami3	m	m	m	-	m	+++	-
08/3556	Ami3	-	-	-	-	-	-	-
E14	Ami3	m	m	m	m	m	m	m
HDE288	Ami3,ami4	-	-	m	m	+++	m	-
FN4	Ami1	-	-	m	-	m	+++	-
06/1298	Ami2,ami3	-	-	-	-	m	-	-
E19	Ami2,ami3	-	+++	m	+++	+++	+++	+++
E26	Ami1,ami2,ami3,ami4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
09/2650	Ami1,ami2,ami3	-	-	-	-	-	+	-
PS6	Ami4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PS29	Ami1,ami2,ami3	+	-	+++	+++	-	-	n
PS 47	Ami1,ami2,ami3	m	+++	m	+++	+++	+++	n
PS 54	Ami2,ami3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	n
PS 83A	Ami2,ami3	-	+++	-	+++	+++	+++	n
PS 84	Ami1,ami2,ami3	-	-	-	-	-	-	-
PS 85	Ami1,ami2,ami3	-	-	-	-	-	-	-
PS 95	Ami1,ami3	-	-	-	-	-	-	-
8511	Ami2,ami3	++	+++	++	+++	+++	+++	n
S26	Ami1,ami2,ami3	-	++	-m	++	+	++	n
ISP8	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
ISP8 (53-)	-	+	+	+	+	+	+	+

4.3.3. Modul regulace transkripce

Další PCR byla zaměřena na modul regulace transkripce a to na gen pro dUTPázu, který má 4 varianty. Zastoupení více typů dUTPáz v jednom kmeni bylo již vzácnější oproti amidázám a většina kmenů obsahuje pouze jeden typ dUTPázy. Zajímavé je např. porovnání kmenů PS29 a PS54. Oba obsahují stejné profágové dUTPázy, liší se však v citlivosti k polyvalentním fágům. Dále je zde časté spojení dUTPázy 3 s amidázou 3 a serologickou skupinou Fa, tyto kmeny jsou současně i rezistentní k fágům, může se tedy jednat o stejného profága.

Obr.č. 15: PCR na detekci genů pro fágové dUTPázy. PS47 (77+), N315, fág X2 – pozitivní kontroly, 1039 a H_2O – negativní kontroly



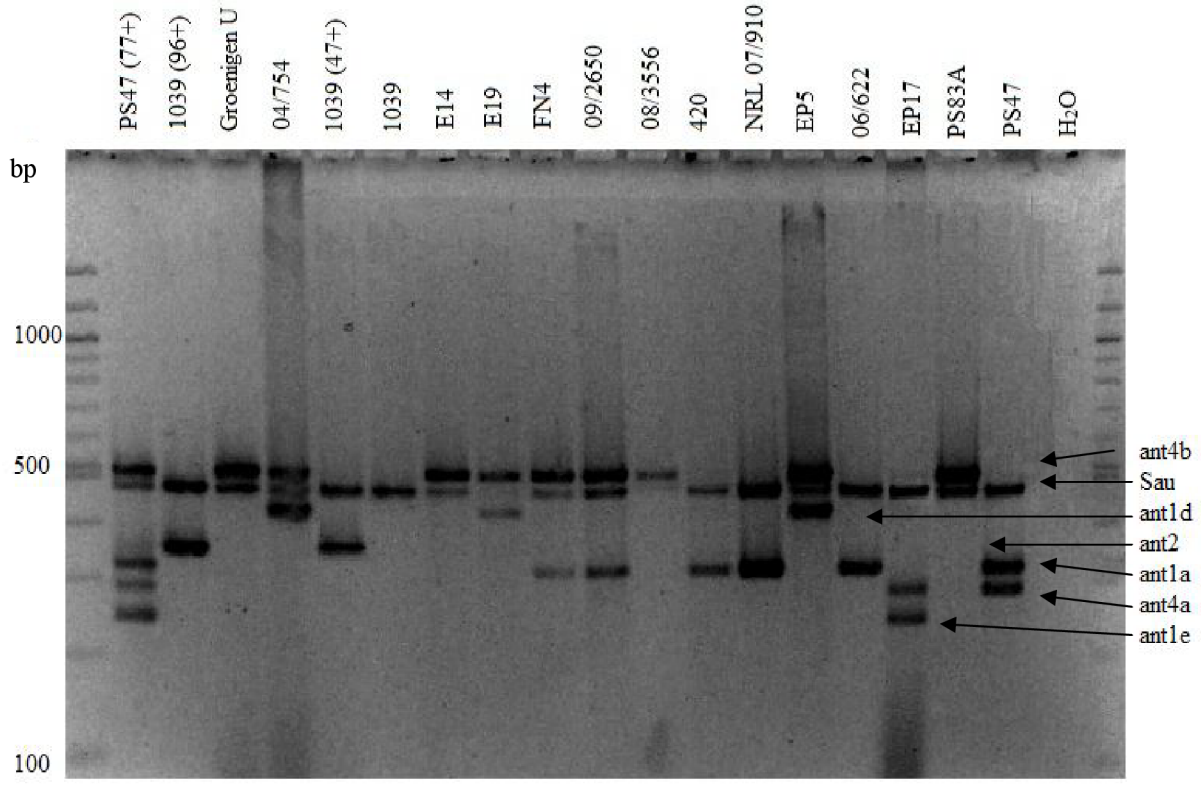
Tab č. 22: Výsledky PCR na detekci genů pro fágové dUTPázy, v souhrnu s dalšími testovanými moduly a s citlivostí k polyvalentním fágům. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

Bakteriální kmen	Citlivost k fágům							Fágové moduly		
	812	812 a	812 b	812 i	K1	F1	S	ser. sk.	amidázy	dUTPázy
420	m	m	M	-	M	++	-	Fa,B	Ami1,ami3	dUTP2
08/3556	-	-	-	-	-	-	-	Fa	Ami3	dUTP3
E14	m	m	M	m	M	m	m	Fa	Ami3	dUTP3
HDE288	-	-	M	m	++	m	-	A,Fa,B	Ami3,ami4	dUTP3
FN4	-	-	M	-	M	++	-	Fa,B	Ami1	dUTP1
06/1298	-	-	-	-	M	-	-	Fa	Ami2,ami3	dUTP3
E19	-	++	M	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami2,ami3	dUTP1
E26	++	++	++	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami1,ami2, ami3,ami4	dUTP1,dUTP2
09/2650	-	-	-	-	-	++	-	A,Fa,B	Ami1,ami2, ami3	dUTP2
PS6	++	++	++	++	++	++	++	B	Ami4	dUTP3
PS29	+	-	++	++	-	-	++	Fa,Fb, B	Ami1,ami2, ami3	dUTP1, dUTP2, dUTP3, dUTP4
PS 47	m	++	M	++	++	++	++	A, B, Fb	Ami1,ami2, ami3	dUTP1, dUTP 3
PS 54	++	++	++	++	++	++	++	A,Fa, B	Ami2,ami3	dUTP1, dUTP2, dUTP 3, dUTP 4
PS 83A	-	++	-	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami2,ami3	dUTP1,dUTP 3
PS 84	-	-	-	-	-	-	-	Fa,B	Ami1,ami2, ami3	dUTP3
PS 85	-	-	-	-	-	-	-	Fa,B	Ami1,ami2, ami3	dUTP1,dUTP 3
PS 95	-	-	-	-	-	-	-	Fa, B	Ami1,ami3	dUTP3
8511	++	++	++	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami2,ami3	dUTP1, dUTP2, dUTP3
S26	-	++	M	++	+	++	++	A,Fa,B	Ami1,ami2, ami3	dUTP1
ISP8	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
ISP8(53-)	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-

4.3.4. Modul kontroly lyzogenního stavu

Jako poslední PCR byla vybrána PCR na detekci genu pro antirepresor. Jednotlivé typy antirepresorů korelují s modulem kontroly lyzogenního stavu. Byla provedena pouze zjednodušená varianta PCR, jež byla pro účely specifikace profágů postačující (tab. 23). Potvrdila se souvislost určitých modulů a patrně se tak jedná o stejného profága, který je obsažen v genomu E14, 08/3556, 06/1298, PS85 a PS95. Tento fág navozuje necitlivost svého hostitele vůči polyvalentnímu fágu 812 a všem jeho mutantám. Tuto myšlenku bylo třeba potvrdit indukcí tohoto profága a následnou lyzogenizací bezprofágového citlivého kmene (viz dále). Dodatečně byly charakterizovány některé kmeny s již známou citlivostí a některými fágovmi moduly (Štreitová, 2013; tab. 24).

Obrázek 16: PCR na detekci genů pro fágové antirepresory. PS47 (77+), 1039 (96+), Groeningen U, 04/754, 1039(47+) – pozitivní kontroly, 1039 a voda – negativní kontroly



Tab č. 23: Výsledky PCR na detekci genů pro fágové antirperesory, v souhrnu s dalšími testovanými moduly a s citlivostí k polyvalentním fágům. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; -, m rezistentní kmen

Bakteriální kmen	Citlivost k fágům							Fágové moduly			
	812	812a	812b	812i	K1	F1	S	serologické skupiny	amidázy	dUTPázy	antirepresory
420	m	m	m	-	m	++	-	Fa,B	Ami1,ami3	dUTP2	ant1a
09/2650	-	-	-	-	-	++	-	A,Fa,B	Ami1,ami2,ami3	dUTP2	ant1a, ant4b
FN4	-	-	m	-	m	++	-	Fa,B	Ami1	dUTP1	ant1a, ant4b
08/3556	-	-	-	-	-	-	-	Fa	Ami3	dUTP3	ant4b
E14	m	m	m	m	m	m	M	Fa	Ami3	dUTP3	ant4b
06/1298	-	-	-	-	m	-	-	Fa	Ami2,ami3	dUTP3	ant1e, ant4b
PS 85	-	-	-	-	-	-	-	Fa,B	Ami1,ami2,ami3	dUTP1,dUTP3	ant4a, ant4b
PS 95	-	-	-	-	-	-	-	Fa, B	Ami1,ami3	dUTP3	ant 4b
PS 84	-	-	-	-	-	-	-	Fa,B	Ami1,ami2,ami3	dUTP3	ant4a
HDE288	-	-	m	m	++	m	-	A,Fa,B	Ami3,ami 4	dUTP3	-
PS29	+	-	++	++	-	-	++	Fa,Fb, B	Ami1,ami2,ami3	dUTP1,dUTP2, dUTP3, dUTP4	ant1a, ant 4b
E19	-	++	m	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami2,ami3	dUTP1	ant1d, ant 4b
PS 83A	-	++	-	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami2,ami3	dUTP1,dUTP3	ant4b
PS 47	m	++	m	++	++	++	++	A, B, Fb	Ami1,ami2,ami3	dUTP1,dUTP3	ant1a, ant 1a
S26	-	++	m	++	+	++	++	A,Fa,B	Ami1,ami2,ami3	dUTP1	ant 1a, ant 4b
8511	++	++	++	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami2,ami3	dUTP1,dUTP2, dUTP3	-
E26	++	++	++	++	++	++	++	A,Fa,B	Ami1,ami2,ami3,ami4	dUTP1,dUTP2	ant1d, ant 4a, ant 4b
PS 54	++	++	++	++	++	++	++	A,Fa, B	Ami2,ami3	dUTP1,dUTP2, dUTP3, dUTP4	ant4a, ant 4b
PS6	++	++	++	++	++	++	++	B	Ami4	dUTP3	ant4b
ISP8	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-

Tab č. 24: Klasifikace kmenů převzatých od Markéty Štreitové.* mnou testované moduly, N netestováno
++ ,+ lyze, citlivý kmen; - (m) rezistentní kmen. ** kmen testovaný dříve v LMDM.

	Charakteristika kmenů			Testované fágy						Fágové moduly			
kmen	CC	spa typ	SCCmec	**812**	**812a**	**812b**	**812i**	**F1/812**	**K1/812**	**int**	**ser. sk.**	**antirep.***	**amidázy***
E14	8	t030	IIIA	-	-	-	-	-	-	Sa3	Fa	ant4b	ami3
EP17	8	t030	IIIA	-	-	-	-	-	-	Sa3 Sa7	Fa, Fb	ant1e,ant4a	ami3
06/622	80	t044	IV	-	-	-	-	-	-	Sa2 Sa3	Fb	ant1a	ami3
****NRL 07/910**	80	t044	IV	-	-	m/107	m/107	m/107	m/107	Sa2 Sa3	A, B, Fb	ant1a	ami1, ami2, ami3
EP5	45	t026	IV	-	++	-	++	++	++	Sa2 Sa3 Sa5 Sa6 Sa7	A, B, Fa	ant1b,ant4b	ami3,ami2
E48	8	t024	IV	-	+/++m	-	++	++	++	Sa2 Sa3	A,Fa	N	ami3
E43	8	t211	IA	++	-	+m	++	-	-	Sa3, Sa6, Sa7	B, Fa	N	ami1,ami3
E53	8	t211	IA	++	-	+m	++	-	-	Sa3, Sa6, Sa7	B, Fa	N	ami1,ami3
E29	1	t127	IV	++m	-	-	+m	-	-	Sa2, Sa3	A, Fa	N	ami3

4.4. Indukce profágů z necitlivých kmenů a lyzogenizace kmene *S. aureus* 1039

Některé kmeny obsahovaly shodné profágy, které se zdály být zopdovědné za navození rezistence. Proto byly tyto profágy indukovány a následně použity k lyzogenizaci bezprofágového kmene. Pro indukci byly vybrány kmeny E14 a 08/3556 jelikož obsahují na základě profágového profilu pouze jednoho profága. Indukce byla úspěšná u obou kmenů, oba fágové lyzáty měly přibližný titr 10^4. Po indukci následovala lyzogenizace bezprofágového kmene 1039. Poté byly jednotlivé kolonie pasážovány přes citrát sodný, aby se zamezilo falešným výsledkům při detekci PCR (fágy vně buňky byly eliminovány). Byla provedena PCR na profágové amidázy a testy citlivosti vůči polyvalentním fágům (tab. 25). Potvrdila se přítomnost profága v původně bezprofágovém kmeni 1039 i necitlivost původně citlivého kmene.

Tabulka 25: Přehled citlivosti lyzogenizovaných kmenů 1039 společně s výsledky PCR na detekci genu pro amidázy. – rezistentní kmen

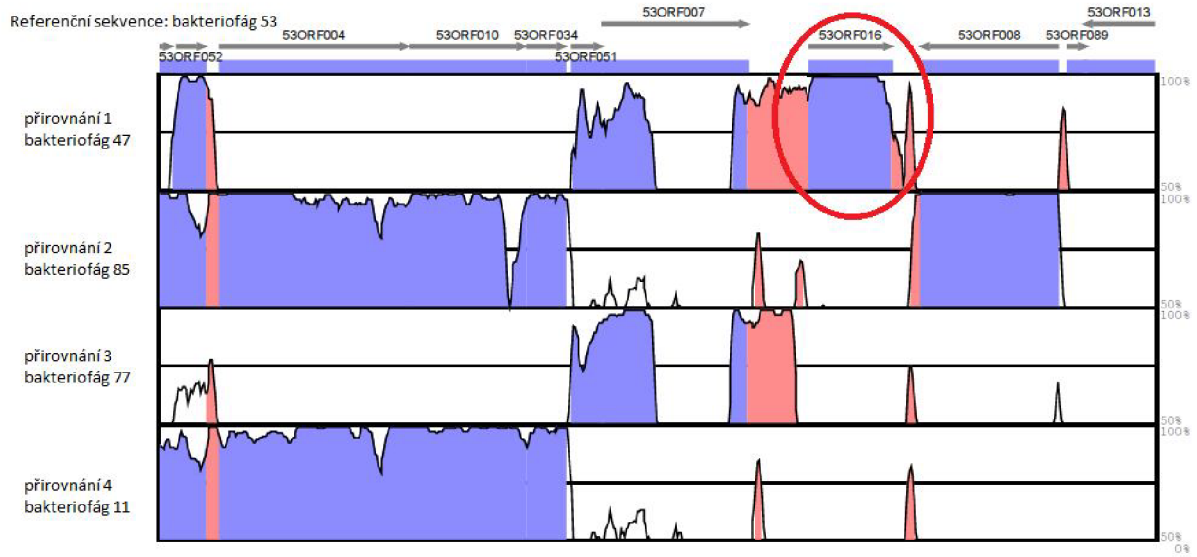
Lyzogenní kmen	přítomnost amidáz	citlivost vůči polyvalentním fágům					
		812	**812a**	**812b**	**812i**	**K1**	**F1**
1039 (ϕ z E14)[1]	ami3	-	-	-	-	-	-
1039 (ϕ z E14)[2]	ami3	-	-	-	-	-	-
1039 (ϕ z E14)[3]	ami3	-	-	-	-	-	-
1039 (ϕ z 08/3556)[1]	ami3	-	-	-	-	-	-
1039 (ϕ z 08/3556)[2]	ami3	-	-	-	-	-	-
1039 (ϕ z 08/3556)[3]	ami3	-	-	-	-	-	-

4.5. Analýza *in silico*

Díky dostupným sekvencím některých profágů (NCBI) mohlo být provedeno celogenomové srovnání fágů, jež citlivost ovlivňují (47 a 53) s fágy, jež tuto schopnost nevykazovaly (85,77,11). Fág 47 a fág 53 jsou evolučně značně vzdálené, přesto navozují stejnou rezistenci u svých hostitelů. Oproti tomu fág 85 je blízce příbuzný fágu 53 a rezistenci nenavozuje. Postupným srovnáním pomocí programu Blast a mVista bylo identifikováno několik genů, které byly alespoň částečně totožné u fágů 53 a 47, zároveň se více či méně lišili u ostatních bakteriofágů. Jako nejvýznamnější se jevil ORF016 fága 53 (obr. 18). Kóduje

protein neznámé funkce. Sekvence tohoto genu se zcela shodovala u obou profágů, úplně chyběla u ostatních srovnávaných fágů. Pomocí programu Blast bylo zjištěno, že se tato sekvence vyskytuje pouze u několika kmenů a bakteriofágů, a je vysoce specifická. Byla nalezena u kmene PS47 a to na genomu profága 12. Rezistence tohoto kmene je shodná s rezistencí způsobenou fágy 47 a 53. Dále byla nalezena u bakteriofága 80alfa, jenž je zřejmě odvozený od fága 53 (Christie a kol., 2010) a u několika dalších kmenů. Protein kódovaný tímto genem obsahuje transmembránovou doménu (S.W.O.T Analysis). Několik dalších kmenů vykazovalo stejný profil citlivosti, a proto byla navržena PCR na detekci genu pro tento protein.

Obrázek 18: Srovnání profágových genomů.

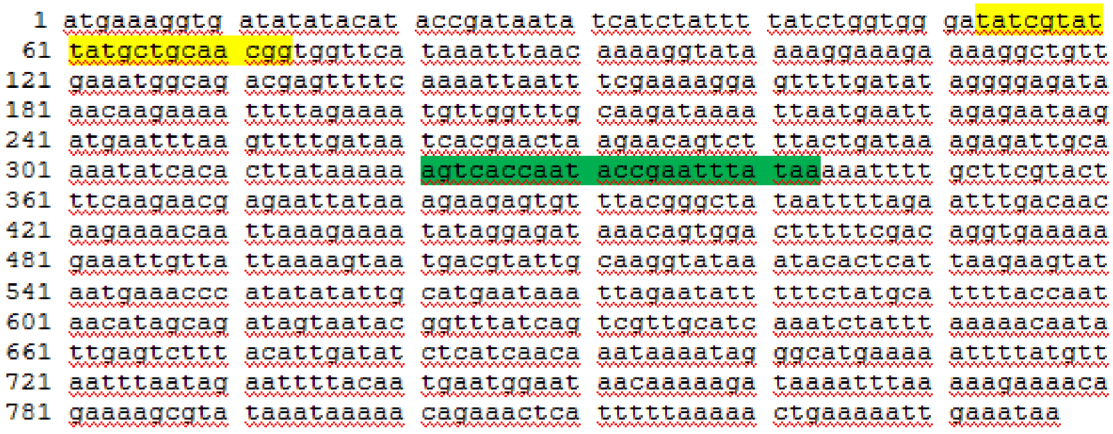


4.5.1. Návrh PCR na 53ORF016

Pomocí programu Oligosearch 6.44 byla navržena PCR na detekci genu pro neznámý protein (dále TP). Pomocí teplotního gradientu byly určeny ideální podmínky reakce, jež jsou uvedeny v metodách. Na obr. 19 jsou vyznačené pozice obou primerů, délka amplikonu je 291 bp.

Následně byl otestován soubor kmenů s různou citlivostí na přítomnost tohoto genu. Zahrnuty byly kmeny se shodnou citlivostí jako ISP8 (53+), u kterých byl TP očekáván. Dále byly otestovány rezistentní i zcela citlivé kmeny (tab. 26).

Obrázek 19: Navržené primery pro 53ORF016. Žlutou barvou je vyznačen TP-F, zelenou TP-R.



Tabulka 26: Výsledky PCR na detekci genu pro TP spolu s citlivostí testovaných kmenů vůči polyvalentním fágům. ++ ,+ lyze, citlivý kmen; - (m) rezistentní kmen.

Kmen	přítomnost TP	citlivost k fágům					
		812	812a	812b	812i	K1	F1
420	-	m	m	m	-	m	++
PS85	-	-	-	-	-	-	-
E14	-	m	m	m	m	m	m
HDE288	-	-	-	m	m	++	m
FN4	-	-	-	m	-	m	++
06/1298	-	-	-	-	-	m	-
PS85	-	-	-	-	-	-	-
EP17	-	-	-	-	-	-	-
NRL 07/910	-	-	-	-	-	-	-
PS84	-	-	-	-	-	-	-
PS29	-	+	-	++	++	-	-
8511	-	++	++	++	++	++	++
E26	-	++	++	++	++	++	++
PS54	-	++	++	++	++	++	++
ISP8 (53+)	+	-	++	-	++	++	++
ISP8 (47+)	+	-	++	-	++	++	++
PS47	+	m	++	m	++	++	++
PS83A	+	-	++	-	++	++	++
EP5	+	-	++	-	++	++	++
E19	+	-	++	m	++	++	++
E48	+	-	++	-	++	++	++
CCM 5757	+	-	++	-	++	++	++
FN32	+	-	++	-	++	++	++
1039 (42E+)	+	-	++	-	++	++	++

5.1. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit a popsat vliv přítomnosti profágů na citlivost kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům a dále charakterizovat tyto profágy z hlediska jejich struktury a vlastností. K experimentu byly vybrány uměle lyzogenizované kmeny, připravené v laboratoři LMDM, kmeny mezinárodní řady a kmeny izolované z českých nemocnic.

S. aureus je významným patogenem a původcem řady onemocnění (např. syndrom toxického šoku, závažné epidermolýzy či pneumonie). Díky stoupajícímu výskytu kmenů s rezistencí k antibiotikům (MRSA a VRSA kmeny) se dostává do popředí fágová terapie, jako alternativní léčba k antibiotikům. V současné době se fágové terapii věnuje řada studií. Část z nich pojednává o problematice rezistence vůči užívaným polyvalentním fágům. Bylo prozkoumáno mnoho mechanismů rezistence vůči fágům, pouze málo studií se však věnuje vlivu profágů na rezistenci, a u druhu *S. aureus* prozatím není znám mechanismus, který je za tuto profágem vyvolanou rezistenci zodpovědný. V této práci je popsáno několik fágů, u nichž se přímo prokázalo, že zprostředkovávají rezistenci svého hostitele. Dále byl nalezen protein, který se vyskytuje u některých z těchto fágů a který může mít přímý vliv na citlivost. Pro gen kódující tento protein byla navržena PCR a byl detekován u dalších kmenů se shodným profilem rezistence, který navozují fágy, u nichž byl tento gen identifikován.

5.1. Citlivost vybraných kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům

Na základě výsledků citlivosti uměle lyogenizovaných kmenů lze konstatovat, že lyzogenie hraje značnou roli v rezistenci bakterií vůči polyvalentním fágům. Fágy 53 a 47 vyvolávají u svých hostitelů rezistenci vůči polyvalentnímu fágu 812 a jeho mutantě 812b. Tato lyzogenní konverze byla zaznamenána u všech lyzogenizovaných kmenů (ISP8, 8511, PS6 a PS54). U kmenů PS83A a PS47 je tento fenotyp shodný s fenotypem nelyzogenizovaných kmenů a tak nemohla být konverze zaznamenána. Ostatní mutanty, odvozené od fága 812, jsou schopny tyto kmeny infikovat. Tato rezistence tak bude patrně vyvolána stejným mechanismem, neseným v genomu těchto fágů. Stejný profil citlivosti se vykytuje i u kmene PS47, PS83A a dále u kmenů EP5 a E48. Následnou typizací profágového profilu těchto kmenů bylo zjištěno, že neobsahují shodné fágové moduly jako fágy 53 a 47 a patrně se tak jedná o odlišného profága se stejným mechanismem navození rezistence.

Mutanta 812a byla získána na kmeni S26, který je zároveň hostitelským kmenem fága 53, a z této mutanty byly dále odvozeny zbývající mutanty, jež jsou na tyto kmeny účinné (Rosypal a kol., 1986). Oproti tomu mutanta 812b byla získána inkubací na kmeni SA 66, který fága 53 ani 47 neobsahuje.

U dalších testovaných fágů nebyla změna citlivosti hostitele zaznamenána. Většina PS kmenů byla vůči testovaným polyvalentním fágům citlivá, přesto se však vyskytlo několik více či méně rezistentních kmenů. Na základě citlivosti vůči fágům pak byly vybrány vhodné kmeny a následně podrobeny čtyřem PCR na fágové moduly.

5.2. Schopnost adsorpce polyvalentních fágů na buňky *S. aureus*

Fág 812 a jeho mutanta 812a byly vybrány k testování schopnosti adsorpce na hostitelskou buňku. Zatímco wildtype 812 vykazuje poměrně nízké spektrum hostitelů, jeho mutanta 812a je schopna infikovat většinu testovaných kmenů. Z grafů 1 – 5 je patrné, že není rozdíl mezi adsorpcí obou fágů na stejném kmeni. Liší se pouze adsorpce mezi jednotlivými kmeny, nikoliv však mezi fágy, ačkoliv kmeny ISP8 (53+) a ISP8 (47+) je schopen infikovat pouze fág 812a. Pravděpodobně tak adsorpce fágů probíhá bez ohledu na citlivost kmene vůči fágu a mechanismus rezistence bude v jiném kroku lytického cyklu. Toto tvrzení však nelze považovat za obecně platné. U studie účinnosti polyvalentního fága K a jeho mutant vykazovaly některé kmeny rezistenci právě v důsledku znemožnění adsorpce fága (Kelly a kol., 2012). Tuto schopnost vykazovaly pouze 3 kmeny z testovaných 43 a pravděpodobně se tedy jedná o méně častý typ rezistence u druhu *S. aureus*. Mnou testované lyzogenní kmeny vykazují rezistenci díky svým profágům, mechanismus rezistence vyvolaný lyzogenií tak zřejmě nesouvisí se zabráněním adsorpce fágů.

5.3. Profágový profil u vybraných kmenů

PCR na detekci profágů 4 různých serologických skupin (A, B, Fa, Fb) mělo dvojí účel. Jednak blíže specifikovat neznámé profágy v některých kmenech (a ověřit serologické skupiny u uměle lyzogenizovaných kmenů), jednak ověřit předpoklad souvislosti rezistence s profágy serologické skupiny B. Celkově byly testovány lyzogeny, PS kmeny a soubor nemocničních kmenů.

Lyzogenní kmeny obsahovaly serologické skupiny profágů, jimiž byly lyzogenizovány. U kmenů mezinárodní řady i nemocničních kmenů byly detekovány 1 – 4 profágy, což je v souladu s dřívějšími studiemi, podle kterých jsou bezprofágové kmeny u *S. aureus* vzácné (Goerke a kol., 2009; Pantůček a kol., 2004). Zastoupení profágů jednotlivých serologických skupin bylo značně rozmanité. Kmeny s profágy ze stejných serologických skupin mohou mít naprosto odlišnou citlivost, jako například kmeny PS54 a 09/2650. Oba kmeny mají profágy serologických skupin A, Fa a B, jeden je citlivý a druhý rezistentní ke všem mutantám kromě 812/F1. U většiny kmenů se nacházejí současně nejméně 2 profágy a nelze tedy jasně určit souvislost mezi citlivostí a serologickými skupinami profágů. Profágy všech serologických skupin včetně skupiny B byly nalezeny u řady citlivých kmenů. Necitlivé kmeny obsahovaly většinou několik fágů současně. Některé rezistentní kmeny však obsahovaly jednoho profága, a to skupiny Fa (např. kmen E14), B (kmen S26) a A (ISP8 47+). Později byl podrobněji charakterizován rezistentní kmen 06/622, který obsahuje jediného profága skupiny Fb. Na základě těchto výsledků nebyl předpoklad souvislosti serologické skupiny B s rezistencí hostitele potvrzen. U profágů skupiny A (ϕ47) i B (ϕ53) byla schopnost navodit rezistenci přímo prokázána lyzogenizací. Později byla tato schopnost prokázána i u fága skupiny Fa. Rezistenci svého hostitele tedy může navodit fág ze serologické skupiny A, Fa i B. Tato schopnost nebyla prozatím prokázána u fága skupiny Fb, byl však nalezen rezistentní kmen 06/622, který tohoto fága obsahuje.

PCR na detekci genu pro profágové amidázy a dUTPázy potvrdila předchozí závěry o rozmanitosti profágů u druhu *S. aureus*. Začaly se ukazovat shodné profágové profily s citlivostí vůči polyvalentním fágům. Po doplnění výsledků PCR na gen pro fágové antirepresory se souvislost ještě zvýšila. Dále byla provedena PCR na fágové amidázy a antirepresory u některých kmenů, které byly převzaty z práce Markéty Štreitové. Nemocniční kmeny 08/3556 a E14 obsahují na základě profágových profilů shodné nebo téměř shodné profágy serologické skupiny Fa, s amidázou 3, dUTPázou 4 a antirepresorem 4b. Oba tyto kmeny jsou zcela rezistentní vůči všem testovaným polyvalentním fágům, tak jako některé další kmeny a to HDE288, 06/1298, PS85 a PS95 , u kterých se tento profágový profil objevbuje v kombinaci s dalšími moduly a nelze u nich s jistotou říct, zda se jedná o totožného fága. Při srovnání s již charakterizovanými fágy čeledi *Sipohoviridae* nebyl nalezen shodný fágový profil (Kahánková a kol., 2010). Patrně se tedy jedná o nového fága. Později byla provedena indukce tohoto fága z kmene E14 a 08/3556.

Další shodný profil byl nalezen u nemocničních kmenů 420 a 09/2650. Oba jsou citlivé pouze k mutantě F1. Ta byla připravena na kmeni FN4, který má stejný profágový profil kromě dUTPázy. Je pravděpodobné, že se jedná o stejný mechanismus rezistence, který může být vyvolán fágem. Jelikož však jde o nemocniční kmeny, může jít o vzájemnou příbuznost, nikoliv o vliv profága. Předpoklad, že tento fág ovlivňuje citlivost svých hostitelů, by bylo potřeba potvrdit jeho indukcí a lyzogenizací bezprofágového kmene. Při srovnání s charakterizovanými fágy nebyla opět nalezena shoda. Čeleď *Siphoviridae* je tedy velmi rozsáhlá a zřejmě zahrnuje mnoho fágů, které si jsou blízce příbuzné a liší se pouze v několika genech.

Dále bych zmínila kmen PS29 a nemocniční kmeny E43 a E53. Tyto kmeny jsou necitlivé vůči mutantám 812a, 812b, 812F a 812K a citlivé k 812 a mutantě 812i. Tento jev je zajímavý, neboť u většiny kmenů vykazuje nejnižší lytickou účinnost právě 812. Všechny tyto kmeny obsahují profágy shodných serologických skupin (Fa a B) a amidáz (1 a 3). Kmen PS29 pak obsahuje nejméně 2 další profágy.

U kmene EP5, PS83A a E19 se na základě jejich profilů předpokládá přítomnost fága 47. Tento fág specificky ovlivňuje citlivost svého hostitele, tak jako fág 53. Kmeny PS84 a nemocniční kmen EP17 jsou necitlivé vůči všem testovaným polyvalentním fágům a shodují se v serologické skupině Fa, amidáze 3 a antirepresoru 4a. Při srovnání s již charakterizovanými fágy jde opět o nový profil. Bylo by tedy potřeba indukcí a lyzogenizací ověřit, zda tento fág doopravdy navozuje takto rozsáhlou rezistenci.

Celkově bylo zaznamenáno několik profágových profilů korelujících s profily citlivosti. Profágy tedy hrají významnou roli v navození rezistence u kmenů *S. aureus*. Ze serologických skupin se nejméně vyskytovala skupina Fb, u amidázy převažoval typ 3, z dUTPáz téměř chyběl typ 4 a u antirepresoru převažoval typ 4b.

5.4. Indukce neznámých profágů a následná lyzogenizace citlivého kmene

Na základě dosavadních výsledků byly pro indukci vybrány kmeny E14 a 08/3556. Ty obsahují ve svém genomu pouze jednoho profága, který je zodpovědný za navození rezistence. Tato domněnka byla potvrzena následnou lyzogenizací citlivého kmene. Z obou kmenů byly úspěšně indukovány lyzáty, které byly následně použity k lyzogenizaci bezprofágového kmene 1039. Po úspěšné lyzogenizaci byla přítomnost fágů potvrzena u obou

dvou kmenů pomocí PCR na detekci genu pro amidázu. Pomocí rezistence vůči původnímu fágu byly na analýzu vybrány 3 kolonie s fágem izolovaným z kmene E14 a 3 kolonie s fágem izolovaným z kmene 08/3556. U všech těchto kolonií byla provedena PCR a testy citlivosti k polyvalentním fágům (812, 812a, 812b, 812i, 812/K1 a 812/F1). Všechny lyzogeny obsahovaly gen pro amidázu 3 a byly rezistentní ke všem testovaným fágům. Byla tedy prokázána lyzogenní konverze a schopnost indukovaných profágů vyvolat kompletní rezistenci svého hostitele.

5.5. Analýza genu pro neznámý protein

Kmeny, které obsahovaly fágy 53 a 47 a dále kmeny PS47, PS83A ,E19 , EP5 a E48 vykazovaly shodnou rezistenci vůči fágu 812 a jeho mutantě 812b a citlivost vůči ostatním fágům. Na základě srovnání genomů fágů 47,53,85,77 a 11, jejichž celogenomová sekvence je přístupná na NCBI, byl vytipován gen pro protein neznámé funkce. Tento gen byl nalezen v genomech fágů 53, 47 a 80α, dále v kmeni PS47 a u několika dalších kmenů. Část sekvence byla nalezena u fága 12, který byl izolován z kmene PS47. Dodatečně se ukázalo, že tento fág obsahuje celou sekvenci tohoto genu, šlo pouze o chybné uložení sekvence v NCBI. Pomocí programu Oligosearch 6.44 byly navrženy vhodné primery, poté byla optimalizována PCR s pomocí pozitivních kontrol PS47, (ISP8 53+) a fága 53. Následně byl otestován široký soubor kmenů s různou citlivostí vůči polyvalentním fágům. Gen pro tento protein byl detekován pouze v kmenech, které vykazovaly stejnou citlivost jako kmeny s fágy 47 a 53. V ostatních kmenech nebyl tento gen zachycen. Bioinformatickou analýzou byla v tomto proteinu identifikována transmembránová doména (S.W.O.T Analysis). Díky testování schopnosti adsorpce polyvalentních fágů na kmeni ISP8 (53+) lze předpokládat, že TP neovlivňuje adsorpci fágů. Patrně se tedy TP nachází v membránovém prostoru a zabraňuje vstupu DNA do buňky. Tím zapřičiňuje rezistenci vůči infekci fágem. Pro ověření těchto tvrzení by bylo vhodné provést řadu dalších experimentů a to například naklonování genu pro TP do vhodného vektoru, transformace citlivých buněk a sledování případných změn citlivosti.

6. ZÁVĚR

V současné době roste počet kmenů *S. aureus*, jež jsou rezistentní k antibiotikům a léčba stafylokokových infekcí se tak stává velkým problémem v nemocnicích po celém světě. Jako alternativní léčba se dostala do popředí fágová terapie. I ta se však potýká s několika problémy a jedním z nich je i rezistence kmenů k užívaným polyvalentním fágům. V této diplomové práci byla provedena rozsáhlá analýza lyzogenních kmenů a popsán vliv lyzogenie na citlivost vůči polyvalentním fágům.

Na základě testů citlivosti lyzogenních kmenů byl ověřen vliv některých profágů na rezistenci hostitele vůči polyvalentním fágům. Dále byly analyzovány profágy pomocí charakterizace jednotlivých fágových modulů a to morfogenetického modulu, lytického modulu, modulu regulace transkripce a oblasti kontroly lyzogenního stavu. Byla nalezena shoda mezi profágovými profily testovaných kmenů a citlivostí těchto kmenů k fágu 812 a jeho mutantám 812a, 812b, 812i, 812/K1 a 812/F1.

Byla provedena indukce profágů u rezistentních kmenů k polyvalentním fágům a následná lyzogenizace citlivého bezprofágového kmene SA1039. Na základě ověření lyzogenní konverze byla potvrzena schopnost těchto fágů vyvolávat rezistenci k polyvalentním fágům u svého hostitele.

Pomocí bioinformatické analýzy byl identifikován protein, který se vyskytuje u některých fágů, jež způsobují rezistenci svých hostitelů vůči některým polyvalentním fágům. Byla navržena PCR na detekci genu, který kóduje tento protein a následně byl tento gen detekován u několika dalších kmenů se shodnou citlivostí. Na základě těchto výsledků je možné, že právě tento protein zodpovídá za navození rezistence u těchto kmenů. Tento předpoklad je však potřeba ověřit dalšími analýzami.

Celkově byl ověřen a prokázán vliv lyzogenie na citlivost kmenů *S. aureus* k polyvalentním fágům. Výsledky této práce jasně ukazují, že tento vliv může být daleko rozsáhlejší, než se doposud myslelo.

7. SEZNAM LITERATURY

Ackermann H.W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. Res. Microbiol. 154: 245-251.

Bair CL, Rifat D, Black LW. Exclusion of glucosyl-hydroxymethylcytosine DNA containing bacteriophages is overcome by the injected protein inhibitor IPI*. J Mol Biol. 2007;366:779–789.

Barondess, J.J., Beckwith, J., 1995. bor gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. J. Bacteriol. 177, 1247–1253.

Capparelli R, Nocerino N, Lanzetta R, Silipo A, Amoresano A, Giangrande C, Becker K, Blaiotta G, Evidente A, Cimmino A, Iannaccone M, Parlato M, Medaglia C, Roperto S, Roperto F, Ramunno L, Iannelli D. Bacteriophage-resistant Staphylococcus aureus mutant confers broad immunity against staphylococcal infection in mice. PLoS One. 2010 Jul 22;5(7):e11720.

DeLeo FR, Chambers HF. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7:629–641.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H & Spratt BG (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA 99: 7687–7692.

Feng, Y., Chen, C.-J., Su, L.-H., Hu, S., Yu, J. and Chiu, C.-H. (2008), Evolution and pathogenesis of Staphylococcus aureus: lessons learned from genotyping and comparative genomics. FEMS Microbiology Reviews, 32: 23–37.

Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, Broker BM, Doskar J, Wolz C. 2009. Diversity of Prophages in Dominant Staphylococcus aureus Clonal Lineages. J Bacteriol 191: 3462-3468.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M & Ito T (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol 9: 486–493.

Holden M.T.G., Lindsay J.A. (2008) Whole Genomes: Sequence, Microarray and Systems Biology. In: Lindsay J.A. (ed.), Staphylococcus Molecular Genetics, 1-28, Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, *et al.*: Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:9786-9791.

Hu DL, Omoe H, Sasaki S, Sashinami H, Sakuraba H, et al. Vaccination with non-toxic mutant toxic shock syndrome toxin I protects against *Staphylococcus aureus* infection. J Infect Dis. 2003;188:743–752.

Chang S, Sievert DM, Hageman JC et al. (2003) Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. N Engl J Med 348: 1342–1347.

Chen J.,Novick R. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. Science, 323 (2009), pp. 139–141.

Christie G.E., A.M. Matthews, D.G. King, K.D. Lane, N.P. Olivarez, S.M. Tallent, S.R. Gill, R.P. Novick. The complete genomes of Staphylococcus aureus bacteriophages 80 and 80α–implications for the specificity of SaPI mobilization. Virology. 2010; 407(2): 381–390.

Iandolo JJ, Worrell V, Groicher KH, Qian Y, Tian R, Kenton S, Dorman A, Ji H, Lin S, Loh P, Qi S, Zhu H, Roe BA. Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of Staphylococcus aureus 8325. Gene. 2002 May 1;289(1-2):109-18.

Iyer LM, Koonin EV, Aravind L. Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors. Genome Biol. 2002;3(3): RESEARCH0012.

Kahankova J, Pantucek R, Goerke C, Ruzickova V, Holochova P, Doskar J. 2010. Multilocus PCR typing strategy for differentiation of Staphylococcus aureus siphoviruses reflecting their modular genome structure. Environ Microbiol 12: 2527-2538.

Kedzierska, S., Wawrzynow, A., Taylor, A., 1996. The Rz1 gene product of bacteriophage lambda is a lipoprotein localized in the outer membrane of Escherichia coli. Gene 168, 1–8.

Kelly D, McAuliffe O, Ross RP, Coffey A. Prevention of Staphylococcus aureus biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. Lett Appl Microbiol. 2012 Apr;54(4):286-91.

Krüger DH, Barcak GJ, Smith HO. Abolition of DNA recognition site resistence to the restriction endonuclease EcoRII. Biomed Biochim Acta. 1988;47(1):K1-5.

Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. The complete genomes and proteomes of 27 Staphylococcus aureus bacteriophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 5;102(14):5174-9.

Kwiatek M, Parasion S, Mizak L, Gryko R, Bartoszcze M, Kocik J. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against Staphylococcus aureus strains. Arch Virol. 2012 Feb;157(2):225-34.

Lindsay J.A., Ruzin A., Ross H.F., Kurepina N., Novick R.P. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol., 29 (1998), pp. 527–543.

Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N & Novick RP (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in Staphylococcus aureus. Mol Microbiol 29: 527–543.

Mahony J, McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. Appl Environ Microbiol. 2008 Oct;74(20):6206-15.

Maiques E., Ubeda C., Tormo M.A., Ferrer M.D., Lasa I., Novick R.P. *et al.* Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. J. Bacteriol., 189 (2007), pp. 5608–5616.

Mark R Tock, David TF Dryden, The biology of restriction and anti-restriction, Current Opinion in Microbiology, Volume 8, Issue 4, August 2005, Pages 466-472.

Markéta Štreitová, Vliv restrikčně-modifikačních systémů na rezistenci kmenů Staphylococcus aureus k polyvalentním bakteriofágům. 2013.

McGrath, S., G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. 2002. Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. Mol. Microbiol.43:509–520.

Mehndiratta P L, Gur Renu, Saini Sanjeev, Bhalla P; *Staphylococcus aureus* phage types and their correlation to antibiotic resistance 2010 Volume: 53 Issue Number:4 Page: 738-741.

Middelboc M, Hamstrong A, Blackburn N, Sinn R, Fischer U, et al. Effect of bacteriophage on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. Microb Ecol. 2001;42:395–406.

Neve, H., Zenz, K.I., Desiere, F., Koch, A., Heller, K.J., Brüssow, H., 1998. Comparison of the lysogeny modules from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages TP-J34 and Sfi21: implication for the modularntheory of phage evolution. Virology 241, 61–72.

Nilsson IM, Patti JM, Bremell T, Hook TM, Tarkowski A. Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesion provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. J Clin Invest. 1998;101:2640–2649.

Novick R. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. Virology, 33 (1967), pp. 155–166.

O'Flaherty S, Coffey A, Edwards R, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting gram-positive bacteria with a low G+C content. J Bacteriol. 2004 May;186(9):2862-71.

Pantucek R, Doskar J, Ruzickova V, Kasparek P, Oracova E, Kvardova V, Rosypal S. 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in Staphylococcus aureus. Archives of Virology 149: 1689-1703.

Pantůček Roman, Alena Rosypalová, Jiří Doškař, Jana Kailerová, Vladislava Růžičková, Pavla Borecká, Šárka Snopková, Radek Horváth, Friedrich Götz, Stanislav Rosypal, The Polyvalent Staphylococcal Phage φ812:Its Host-Range Mutants and Related Phages, Virology, Volume 246, Issue 2, 5 July 1998, Pages 241-252.

Rosypal, S., and Horáková, D. 1968. The loss of sensitivity of Staphylococcus aureus NCTC 8511 to the polyvalent and virulent phage 812 following lysogenization with the phage 53. Publ. Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyně 496: 313-326.

Rosypal S., Rosypalová A., Doškař J., Pakrová E., Genovová, S. (1986). The use of the polyvalent phage 812 and its hostrange mutants to the differentiation of Staphylococcus aureus from other staphylococci. Scripta Fac. Sei. Natl. Univ. Purk. Brun. 16: 317-336.

Rountree P. M. (1949) The serological differentiation of staphylococcal bacteriophages. J. Gen. Microbiol. 3: 164-173.

Ruzin A, Lindsay J & Novick RP (2001) Molecular genetics of SaPI1 – a mobile pathogenicity island in Staphylococcus aureus. Mol Microbiol 41: 365–377.

Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Carrillo CL, Radzum KA, et al. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. PLOS Pathogens. 2007;3:1142–1151.

Tallent S.M., Langston T.B., Moran R.G., Christie G.E. Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. J. Bacteriol., 189 (2007), pp. 7520–7524.

Tormo M.Á., Ferrer M.D., Maiques E., Ubeda C., Selva L., Lasa Í. *et al. Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. J. Bacteriol., 190 (2008), pp. 2434–2440.

Ubeda C., Maiques E., Barry P., Matthews A., Tormo M.A., Lasa I. *et al.* SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage Mol. Microbiol., 67 (2008), pp. 493–503.

von Heijne, G., 1989. The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. Protein Eng. 2, 531–534.

Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Nakasone, K., Ohnishi, M., Nakayama, K., Yamada, S., Komatsuzawa, H. and Sugai, M. 2000. Phage conversion of exfoliative toxin A production in Staphylococcus aureus. Mol. Microbiol. 38: 694-705.

Young R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiol Rev 56: 430-481.

Internetové zdroje

www.ncbi.nlm.nih.gov/ - NCBI - National Center for Biotechnology Information
http://rebase.neb.com - REBASE - The Restriction Enzyme Database