

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**Identifikace lyzujících bakteriofágů v přírodních
populacích *Ixodes ricinus***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

David Horák

Biologie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

Plzeň 2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

Plzeň, 26. Dubna 2019

.....
vlastnoruční podpis

Chtěl bych poděkovat vedoucímu práce Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům za podporu. Také děkuji Simoně Koudelové za provedenou jazykovou korekturu.

Obsah

1	Úvod	1
2	Bakteriofágy	2
2.1	Historie fágové terapie	2
2.2	Dělení bakteriofágů	4
2.2.1	Caudovirales	5
2.2.2	Microviridae	5
2.2.3	Corticoviridae	6
2.2.4	Tectiviridae	6
2.2.5	Leviviridae	6
2.2.6	Cystoviridae	6
2.2.7	Inoviridae	7
2.2.8	Lipothrixviridae	7
2.2.9	Rudiviridae	7
2.2.10	Plasmaviridae	7
2.2.11	Fuselloviridae	7
2.3	Zdroje bakteriofágů a jejich potenciální hostitelé	8
2.3.1	<i>Ixodes ricinus</i>	8
2.4	Životní cyklus bakteriofágů	11
2.5	Lytické mechanismy	12
2.6	Bakteriofágy a imunitní systém	14
2.7	Současnost fágové terapie, její potenciál a rizika	16
2.8	Technologie fágového displeje	18
3	Metody	19
3.1	Charakteristika PCR	19
3.1.1	Long PCR	19
3.2	Metoda podle Qi a Scholthof	19
3.2.1	Plazmidy a primery	19
3.2.2	PCR mutageneze	20
3.2.3	Design primerů	22
4	Výsledky	24
4.1	Proteiny borelií	24
4.1.1	Struktura proteinu OspA (outer surface protein A)	24
4.1.2	Nukleotidová sekvence OspA (outer surface protein A)	24

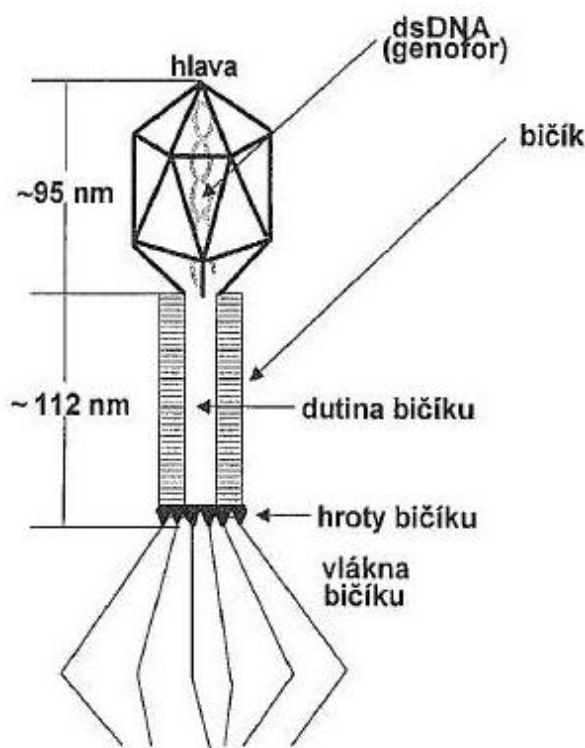
4.2	Design primerů OspA	25
4.3	Výběr bakteriofágů.....	25
4.4	Metody mutagenese fágů	26
4.4.1	PCR mutagenese.....	26
4.4.1.1	PCR mutagenese fága s cirkulární DNA	26
4.4.1.2	PCR mutagenese cirkularizovaného fága a následná možná linearizace	26
4.4.1.3	PCR mutagenese lineárního fága	27
4.4.2	Enzymatická mutagenese.....	27
4.5	Kultivace modifikovaných fágů	27
4.6	Cíle metodiky.....	27
4.6.1	Modifikace kapsidových proteinů	27
4.6.2	Modifikace vazebných proteinů bičků	28
4.6.2.1	Bičků s oběma receptory	28
4.6.2.2	Receptorově specifické bičky	28
5	Diskuze	29
5.1	Srovnání antibiotik a bakteriofágů	29
5.2	Problematika imunitního systému ve vztahu k fágům	30
5.3	Problematika léčby pacientů s imunodeficitem.....	31
5.4	Problematika laické veřejnosti	31
5.5	Problematika metod.....	31
6	Závěr.....	33
7	Literatura.....	34
7.1	Internetové zdroje.....	37
8	Resumé.....	38
9	Seznam obrázků	39
10	Seznam tabulek	39

1 Úvod

Cílem mé práce je vytvořit metodiku pro identifikaci a editaci sekvencí „vazebných proteinů“ (binding proteins) u lyzujících bakteriofágů, za účelem infikace bakterií běžně se vyskytujících v populacích *Ixodes ricinus*. V práci se zaměřuji na obecnou charakteristiku bakteriofágů - jejich vlastnosti, historii a současnost fágové terapie. Dále pak charakteristiku bakterií z rodů *Borrelia* a *Anaplasma* a jejich současnou léčbu, stejně tak i na jejich přenašeče – klíště obecné (*Ixodes ricinus*) – a problematiku jeho parazitismu. Dále, mimo již zmíněnou metodiku, se zaměřuji na potenciální využití tzv. fágové terapie (a přidružených léčebných alternativ) jako alternativy k léčbě pomocí antibiotik a jejich následné využití při léčbě onemocnění způsobených bakteriemi, které jsou rezistentní vůči antibiotikům.

2 Bakteriofágy

Bakteriofág (fág) je virus, který napadá bakterie a využívá je ke svému množení (Vokurka et al. 2005, 95s). Bakteriofágy se hojně vyskytují v mořské vodě. Počet 10^7 virionů v cm^3 mořské vody z nich tak činí nejhojnější entitu, která převyšuje počty bakterií 5-25krát (Sharp 2001) V rámci celé biosféry může jejich celková početnost až dosáhnout až 10^{31} jedinců. Z toho lze snadno vyvodit, že jsou nejhojnějším biologickým činitelem na Zemi. Hrubá struktura a životní cykly dsDNA (double strand DNA – dvouvláknová DNA) bakteriofágů jsou poměrně dobře známé (Morgan a Pitts 2008). Bakteriofágy jsou velmi variabilní i z hlediska struktury jejich nukleové kyseliny, ta totiž může být jak lineární tak i cirkulární. Genom se může vyskytovat ve formě dvouřetězcové DNA (ds DNA) nebo jednořetězcové DNA (ss DNA), dále tak ve formě dvouřetězcové RNA (dsRNA) nebo jednořetězcové RNA (ss RNA) (Alberts 1998; Rosypal 2000).



Obr. 1. Základní schéma bakteriofága. Převzato z Rosypala (2000).

2.1 Historie fágové terapie

Historie objevu bakteriofágů je předmětem dlouhých debat. Ernest Hankin, britský bakteriolog, publikoval v roce 1896 práci o přítomnosti antibakteriální aktivity (proti

Vibrio cholerae), kterou pozoroval ve vodách řek Gangy a Jumny v Indii. Ve své práci uváděl, že neidentifikovaná látka, která prošla jemnými porcelánovými filtry a byla tepelně labilní, byla zodpovědná za tento jev a za omezení šíření epidemií cholery. O dva roky později pozoroval ruský bakteriolog Gamaleya podobný jev při práci s *Bacillus subtilis*. Nicméně, žádný z těchto výzkumníků dále nezkoumal tyto nálezy, dokud se touto problematikou nezačal zabývat Frederick Twort (Sulakvelidze et al. 2001).

Můžeme tedy tvrdit, že bakteriofágy byly objeveny britským bakteriologem Frederickem Twortem v roce 1915. Avšak „fenomén bakteriofága“ začal až v roce 1917 po vydání publikace francouzsko-kanadským mikrobiologem Felixem d'Herellem. Během vyšetřování pozoroval „neviditelné mikroby“ ve filtrátech ze stolice pacientů trpících úplavicí, které byly antagonistické vůči bakteriím. Domníval se, že tento filtrovatelný virus byl kofaktorem bakteriální infekce. Nicméně, prokázal, že titry fágů vzrostly při progresi onemocnění a dosáhly vrcholu během zotavení. Po těchto úspěších se d'Herelle zaměřil se svým výzkumem na lidi. Nejprve testoval bezpečnost fágů na sobě, svých spolupracovnících a svojí rodině, poté na pacientech trpící bakteriální dysentérií (úplavicí) a cholerou. Poté byly jako terapie aplikovány fágy na zotavení ran. V dalším experimentu se zaměřil na léčivé hodnoty fágů, kdy zkoumal bakterii *Salmonella gallinara* jako infekční agens tyfu ptáků (publikováno v roce 1926). Tento test také potvrdil profylaktickou schopnost fágů i proti jiným druhům, jako je *Pasteurella multocida* (hemoragická septikémie skotu). Nicméně první publikace o fágové terapii byla publikována Richardem Bruynoghem a Joséphem Maisinem v roce 1921 (Cisek et al. 2017).

I přesto, že mnoho prvních pokusů fágové terapie s sebou neslo pozitivní výsledky, byla zde i nějaká zklamání. V roce 1934 byla publikována zpráva, ve které byla dříve zveřejněná data ostře kritizována. Týkalo se to toho, že autorovi nebyla dostatečně známa biologická povaha bakteriofága, stejně tak jeho silné i slabé stránky. Navíc tato zpráva poukazovala na chyby, jako byla chybějící standardizace fágové přípravy, stejně tak i chybějící kritéria pro srovnání výsledků výzkumu (Cisek et al. 2017).

Druhá světová válka, konkrétně objev antibiotik, ve své podstatě zastavil výzkum bakteriofágů, především ve Spojených státech amerických. Jednoduchost výroby, široké spektrum a stabilita výrobního procesu byla jedna z výhod antibiotik. Naopak v Evropě dvě vojenské velmoci, Sovětský svaz a Německo, používaly fágy jako léčbu zranění. V Sovětském svazu byl výzkum fágů řízen především nákladově efektivními a idealistickými motivy („Převaha“ sovětské vědy nad kapitalistickou, Západem). Kromě

toho, Státní sérologický a vakcinologický Institut v Tbilisi, v Gruzii, založený mimo jiné d'Herellem, bylo jedním z hlavních center fágové terapie v té době (Summers 2012; Cisek et al. 2017).

Zajímavostí je ten fakt, že Pasterův ústav, mateřská instituce d'Herellea, kde pracoval na výzkumu bakteriofágů, nejčastěji obdržela fágy především z Ruska či Gruzie (Abedon et al. 2011).

Další důvod upuštění fágové terapie v poválečné době byl problém bakterií rezistentních vůči fágům, to bylo dáno neznalostí patogenních mechanismů u bakterií a povahy interakcí mezi fágem a jejich hostitelem (Cisek et al. 2017).

V 70. letech minulého století bylo v Pákistánu provedeno několik experimentů za využití bakteriofágů (připravených v SSSR) při léčbě cholery. Tyto experimenty byly sponzorovány WHO (Světová zdravotnická organizace). Výsledky poukázaly na to, že léčba cholery s použitím bakteriofágů není tak účinná jako léčba pomocí antibiotik (tetracyklin), fág však na rozdíl od antibiotik může selektivně redukovat většinu vibrií bez toho aniž by poškozoval jiné střevní mikroorganismy a to bez jakéhokoliv znatelného toxického účinku na pacienta. Proto se bakteriofágy jeví jako jedna z perspektivních cest k dalšímu výzkumu (Cisek et al. 2017).

Další soubor článků o fágové terapii, kdy byla aplikována jako léčba průjmových onemocnění u modelů myši a hospodářských zvířat nakažených *Escherichia coli*, dospěl k závěru, že bakteriofágy mohou být použity jak při léčbě, tak i jako profylaxe, ochrana před určitou nemocí, která by mohla nastat, léčebnými prostředky (léky, očkováním), (Vokurka et al 2005, 737s). Tyto práce byly začátkem renesance výzkumu fágů, která byla bohatě podpořena dřívější sovětskou a polskou prací. Výzkum v Polsku bývá zmiňován hlavně v souvislosti s Hirszfeldovým institutem imunologie a experimentální terapie ve Vratislavi a zahrnuje tisíce pacientů. Tyto studie jsou navíc považovány za jedny z nejpodrobnějších dokumentací (Summers 2012; Cisek et al. 2017).

2.2 Dělení bakteriofágů

ICTV (mezinárodní výbor pro klasifikaci virů) v současnosti rozděluje viry do 3 řádů, 61 čeledí a 241 rodů, z toho konkrétně bakteriofágy zastupují 1 řád, 13 čeledí a 30 rodů. Fágy mohou rozlišovat na bičíkaté, polyedrické, vláknité a pleomorfní. Většina fágů nese svoji genetickou informaci ve formě dsDNA, ale méně často mohou obsahovat i ssDNA, ssRNA, dsRNA. Do roku 2003 bylo známo na 4950 bičíkatých fágů, které jsou řazeny do řádu *Caudovirales*. Polyedrických, vláknitých a pleomorfních bylo známo pouze

okolo 190 druhů. Stejně jako v jiných systémech jsou viry definovány podle typu a povahy nukleové kyseliny a také dle morfologie virových částic, avšak neexistují žádná univerzální kritéria pro rody a druhy. Neexistuje však žádné vysvětlení pro zvláštní rozdělení virů v izolovaných rodech odlišných kmenů bez jakýchkoliv mezičlánků mezi nimi. Vztahy mezi bakteriofágy a eukaryotickými viry tedy zůstávají velmi slabé a ponechávají tak prostor dalším dohadům (Ackermann 2003).

2.2.1 Caudovirales

Viriony jsou tvořeny kubicky symetrickou hlavičkou a helikálním bičíkem, který je binárně symetrický a ve většině případů disponuje strukturami k terminální fixaci virů - bazální ploténka, hroty a vlákna. Nedisponují žádnými obaly, jsou tedy tvořeny pouze bílkovinami a genetickou informací nesenou ve formě DNA. Struktura jejich virionu, z hlavičky a bičíku, je mezi viry unikátní. Tato struktura se objevuje i u jiných virů, avšak nikdy nedosahuje takové stability jako struktura Caudovirales. U většiny bičíkatých fágů má hlavička tvar icosaedru (dvacetistěn) a u všech z nich si zachovává izometrickou souměrnost. V současnosti *Caudovirales* zahrnují 96% všech zkoumaných bakteriofágů, z toho čeleď *Siphoviridae* 61,7%, čeleď *Myoviridae* 24,5% a čeleď *Podoviridae* 13,9% (Sharp 2001; Ackermann 2003).

Jejich nukleová kyselina je ve formě jednoduchého vlákna dsDNA. DNA některých bičíkatých virů mohou obsahovat neobvyklé báze, jako je například 5 – hydroxymethylcytosine. Délka jejich DNA je velmi variabilní, stejně tak i jejich morfologie a fyziologie, což z nich činí nejvíce diversifikovanou skupinu ze všech virů. Bičíkaté fágy se dělí na tři čeledi (Ackermann 2003).

Do čeledi *Myoviridae* spadají bakteriofágy s kontraktilem bičíkem, tvořeným z pochvy a z centrální dutiny. Patří sem například bakteriofágy T4, P1, P2, Mu, Mu, SPO1, φH (Ackermann 2003).

Bakteriofágy z čeledi *Siphoviridae* disponují dlouhým nestažitelným bičíkem. Do této čeledi se řadí fágy λ, T1, T5, L5, c2, ψM (Ackermann 2003).

V čeledi *Podoviridae* jsou bakteriofágy charakteristické krátkým bičíkem a spadají sem bakteriofágy T7, P22, φ29 (Ackermann 2003).

2.2.2 Microviridae

Viry jsou malé, neobalené a jednu kruhovou molekulu ssDNA. Tyto bakteriofágy se specializují a infikují odlišné druhy bakterií, například čeleď *Enterobacteriaceae* nebo

rody *Chlamydia*, *Spiroplasma* a *Bdellovibrio*. *Microviridae* se diferencuje na čtyři různé rody (Ackermann 2003).

2.2.3 Corticoviridae

Tuto skupinu zastupuje pouze jeden známý druh - PM2 bakteriofág. Jeho kapsida tvořena dvěma proteinovými vrstvami a lipidovou dvojvrstvou sevřenou mezi nimi. Genom je ve formě dsDNA. Z mořské vody byly izolovány další podobné fágy, ale stále ještě nebyly podrobně prozkoumány (Ackermann 2003).

2.2.4 Tectiviridae

Fágy jsou tvořené tuhou bílkovinnou kapsidou, která je obklopena tlustým a flexibilním lipoproteinovým obalem. Po navázání viru na hostitelskou buňku dojde k přeměně tohoto obalu na bičík o velikosti přibližně 60 nm, který injektuje nukleovou kyselinu do bakteriální buňky. Genom je ve formě dsDNA. I když mají bakteriofágy z čeledi *Tectiviridae* poměrně omezený výskyt, disponují velmi širokým spektrem hostitelů - *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Thermus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Alicyclobacillus* (Ackermann 2003).

2.2.5 Leviviridae

Fágy z čeledi *Leviviridae* disponují ssRNA (jednořetězcová ribonukleová kyselina). Viriony strukturálně odpovídají spíše polovirionům, jelikož jim schází nutné morfologické náležitosti. Proteinový obal *Leviviru* MS2 postrádá jakoukoliv strukturní podobnost proteinového obalu s jinými zatím známými RNA viry. Většina známých virů z čeledi *Leviviridae* jsou plasmidově specifické colifágy. Dělí se sérologicky i na základě dalších kritérií do dvou rodů (Ackermann 2003).

2.2.6 Cystoviridae

Oficiálně má tato čeleď jednoho zástupce, avšak v poslední době byly objeveny další dva viry pravděpodobně příbuzné s touto čeledí. Tyto fágy jsou mezi ostatními bakteriofágy unikátní, neboť disponují třemi molekulami dsRNA a RNA polymerázou. Kapsidu obaluje lipidový obalem, obsahující dodekahedrální RNA polymerasový komplex. Při infekci hostitelské buňky opadá lipidový obal bakteriofágům z čeledi *Cystoviridae* a jejich kapsida se dostává mezi buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu. Hostitelskou buňkou může být pouze *Pseudomonas syringae* (Ackermann 2003).

2.2.7 Inoviridae

Čeď se dělí na dva rody, *Inovirus* a *Plectrovirus*, které napadají odlišné hostitelské buňky. Bakteriofágy z rodu *Inovirus* se specializují na enterobakterie. Jejich příbuzné druhy se mohou vyskytovat například v rodu *Clostridium*. Genom těchto fágů je tvořen ssDNA a je z hostitelské buňky vytlačován, proto může syntéza nových fágů probíhat pouze po omezenou dobu. Fágy se vyznačují citlivostí na chloroform a velkou tepelnou odolností. Rod *Inovirus* zahrnuje 42 fágů, které byly dále klasifikovány do 29 druhů. Viriony charakterizují dlouhá flexibilní nebo tuhá vlákna. Rod *Plectrovirus* tvoří bakteriofágy s krátkými rovnými bičíky. Jejich výskyt se omezuje pouze na mykoplazmata (Ackermann 2003).

2.2.8 Lipothrixviridae

Tato čeď zahrnuje čtyři viry napadající archaebakterie z rodu *Thermoproteus*. Viriony charakterizuje kombinace lipoproteinového obalu a tyčinkovitého tvaru. Genom je nesen ve formě dsDNA. Nově vzniklé viriony těchto bakteriofágů jsou z hostitelské buňky uvolněny lyzí buňky (Ackermann 2003).

2.2.9 Rudiviridae

Tato čeď je zastoupena dvěma bakteriofágy, které byly izolovány z extrémně termofilních archaebakterií. Viry jsou neobalené tuhého tyčkovitého tvaru s genomem ve formě dsDNA. Podobají se viru tabákové mozaiky (Ackermann 2003).

2.2.10 Plasmaviridae

Doposud je z této čeledi znám pouze jeden virus, konkrétně je to Acholeplasma virus MVL2 nebo L2. Viry jsou obalené a charakterizuje je absence kapsidy. Bylo již objeveno pět dalších podobných bakteriofágů, avšak zatím nebyly podrobně analyzovány a nelze je tak zatím zařadit do této čeledi. Plasmaviry infikují hostitele tak, že dojde k fúzi virového obalu s mykoplazmatickou cytoplazmatickou membránou. Nukleová kyselina je nesená ve formě dsDNA (Ackermann 2003).

2.2.11 Fuselloviridae

Genom bakteriofágů je tvořen dsDNA. V čeledi Fuselloviridae je zatím znám pouze jeden bakteriofág - SSV1. Výskyt bakteriofága je vázán na archaebakterii *Sulfolobus shibatae* ve formě plazmidu a integrovaného profága. Produkci bakteriofága SSV1 je

možno indukovať, ale pretože neexistuje jeho prirodzený hostiteľ, není možné ho bežne pestovať v laboratorných podmienkach. Stavba bakteriofága se podobá tvaru citrónu, na jednej strane s krátkymi hroty. Obal je odbourateľný chloroformem a je tvorený dvoma hydrofónimi proteiny a lipidy hostiteľa (Ackermann 2003).

2.3 Zdroje bakteriofágů a jejich potenciální hostitelé

Bakteriofágy mohou být izolovány z většiny prostředí, ve kterých se nacházejí jejich prirodzení hostitelé – bakterie. Odpadní vody obvykle obsahují velká množství colifágů, zatím co čisté řeky obsahují o několik řádů nižší množství (Sharp 2001). Důležité je při izolaci bakteriofágů znát ekologii populací bakterií, ve kterých se prirodzene vyskytují. Téměř jakýkoliv zdroj prostředí obsahující bakterie by měl obsahovat i příslušné druhy bakteriofágů, případně by se bakteriofágy měly vyskytovat v bakteriích ve formě profágů. Zdroje mohou být různé například půda, voda, odřezky rostlin, fekální materiál či odpadní vody (Gill a Hyman 2010).

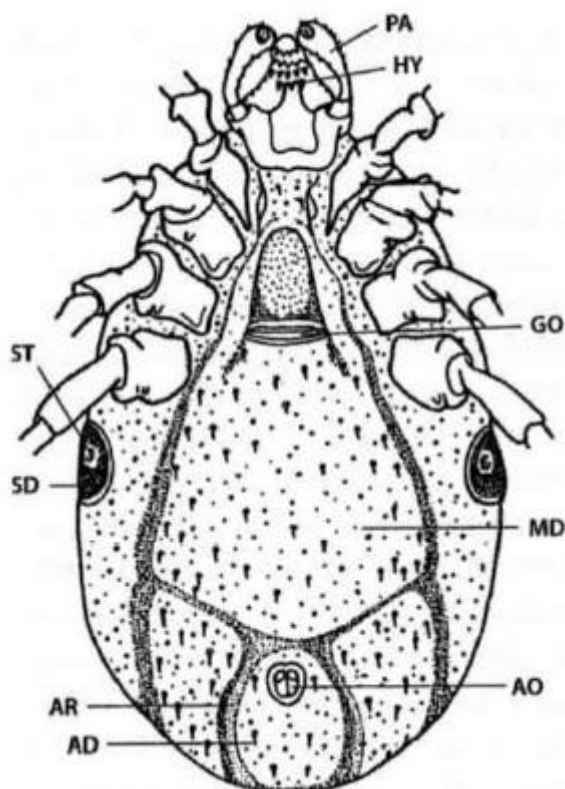
Výběr bakterií, ze kterých budeme získávat bakteriofágy, můžeme specifikovat podle různých kritérií, například snadnosti manipulace s bakteriálními kulturami nebo jejich patogenity. Například mykobakteriální fág D29 je schopný infikovat jak *Mycobacterium tuberculosis*, tak i příbuznou nepatogenní půdní bakterii *Mycobacterium smegmatis*. Práce s kulturami *M. smegmatis* je mnohem bezpečnější a navíc *M. smegmatis* je na rozdíl od *M. tuberculosis* v laboratorných podmienkach snáze kultivovatelné. Podobně, fág P100 infikující *Listeria monocytogenes* může být úspěšně kultivován za využití nepatogenní bakterie *Listeria innocua*. Tento princip kultivace bakteriofágů tak výrazně eliminuje některá rizika spjatá s kultivací na patogenních bakteriích (Gill a Hyman 2010).

V rámci této kapitoly se dále zaměřím na *Ixodes ricinus* a bakterie, které může přenášet, jako potenciální zdroj bakteriofágů.

2.3.1 *Ixodes ricinus*

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je ektoparazit a významný přenašeč z čeledi klíšťovitých (*Ixodidae*). U dospělců se na hřbetní straně nachází chitinózní štítek (scutum), který u samců zakrývá téměř celé tělo a u samic v nenasátém stavu zakrývá tělo přibližně z jedné třetiny až z jedné poloviny. Tělo klíštěte je rozlišitelné na idiosoma a gnathosoma. Dospělci mají čtyři páry kráčivých končetin, larvy pouze tři. Na tarzálních člácích předního páru se nachází Hallerův orgán, jamka s citlivými smyslovými brvami, které umožňují klíštěti vnímat teplo, CO₂ a další chemické sloučeniny (Volf a Horák 2007).

Gnathosoma je vybaveno charakteristickým ústním ústrojím. To se skládá z hypostomu, klepítek (chelicera) a makadel (pedipalp). Hypostom je dlátovitý útvar, opatřený zpětnými háčky či zoubky, které umožňují klíštěti udržet se na hostiteli během sání. Nejsou nijak spirálovitě orientovány, proto nehraje roli směr vytáčení při extrakci klíštěte. Po přísátí klíště parazituje na hostiteli po řadu dní, a proto některá klíšťata vylučují tzv. cement, bílkovinnou hmotu, která posiluje ukotvení hypostomu ve tkáni hostitele (Volf a Horák 2007).



Obr. 2. Morfologie *Ixodes ricinus*. Převzato z Volfa a Horáka (2007).

PA - palpy, HY - hypostom, GO - genitální otvor, MD - mediální destička, AO - anální otvor, AD - anální destička, AR - anální rýha, SD - stigmatální destička, ST – stigma (Volf a Horák 2007).

Ixodes ricinus má tzv. tříhostitelský životní cyklus, to znamená, že k úspěšnému vývoji potřebuje tři hostitele. Životní cyklus klíštěte obecného tvořen třemi vývojovými stádii: larva, nymfa a dospělec. Každé stádium (instar) potřebuje ke svému vývoji jeden rok. Proto vývoj klíštěte obecného do dospělosti u nás trvá zpravidla tři roky. Larvy většinou parazitují na drobných obratlovcích, jako jsou hlodavci, ptáci či ještěrky. Podobně je tomu i u nymf, které mohou vyhledávat i větší obratlovce. Dospělé samičky napadají především větší obratlovce – lesní zvěř, hospodářská zvířata, psy a podobně. Hladové

klíště hostitele vyhledá pomocí Hallerova orgánu, který je uzpůsoben k jeho detekci (viz. Obecná charakteristika). Když se klíště dostane na hostitele, nepřisaje se ihned, ale nejprve vyhledá vhodné místo pomocí sensorických orgánů na palpách. Po úspěšném nasátí krve klíště odpadne z hostitele a po natrávení krve dojde k přeměně na vyšší instar (metamorfóza). Tedy larva se přemění na nymfu a nymfa na dospělce. V případě samice už k další metamorfóze nedochází, místo toho dojde k početné produkci vajíček, která se uskuteční pouze jedenkrát za život. Samci krev nesají, přesto se s nimi můžeme na hostitelích setkat. Tělo hostitele je totiž nejpravděpodobnější místo, kde se samec může se samicí setkat. Dochází zde ke kopulaci. Ta probíhá tak, že sameček nasaje své pohlavní buňky do hypostomu a tím penetruje pohlavní otvor samičky, který je umístěn mezi zadním párem končetin (Volf a Horák 2007).

Klíště obecné se nejčastěji vyskytuje v nižších polohách a pahorkatinách, ve vyšších nadmořských výškách je jeho výskyt ojedinělý. V rámci sezóny jsou aktivní od března do listopadu. Největší výskyt klíšťat u nás je ve smíšených a listnatých lesích s křovinným podrostem. Nebezpečí, které je s nimi spojováno spočívá zejména v jejich schopnosti přenášet onemocnění - klíšťovou encefalitidu (Volf a Horák 2007). Jedná se o virové onemocnění, jehož původce (arbovirus, Flavivirus) je na člověka přenášen nejčastěji kousnutím klíštěte. Onemocnění má několik forem a zanechává odolnost. Příznaky se objevují zhruba za 1 až 2 týdny a mají nejprve charakter jako chřipka. U části postižených se po přechodném zlepšení objevuje za několik dnů nervové poškození. To se projevuje jako zánět mozkových blan (meningitida) s bolestmi hlavy, světloplachostí, horečkou nebo jako zánět mozku (encefalitida) spojený se zánětem mozkových blan (meningoencefalitida) nebo v nejtěžších případech i míchy (encefalomyelitida) (Vokurka et al. 2005, 462s). Proti klíšťové encefalitidě lze očkovat (Volf a Horák 2007).

Další riziková onemocnění s sebou nesou bakterie z rodu *Borrelia*, způsobující lymeskou boreliózu. Infekce se většinou projevuje skvrnou na kůži v místě sání, která je ve svém středu světlá a při okraji červená (erythema migrans). Objevuje se přibližně dva až tři týdny po nakažení (Volf a Horák 2007). *Borrelie* jsou pojmenovány po francouzském bakteriologovi, který se jmenoval Borrel Amédé. *Borrelie* jsou rod bakterií z čeledi spirochet. Jedná se o velmi pohyblivé bakterie dobře barvitelné methylenovou modří (podle Giemskyho). Také je lze znázornit stříbřením. Kultivace je u nich obtížná a vyžadují speciální půdy. Parazitují na teplokrevných organismech včetně člověka. K přenosu dochází pomocí vektoru, kterým je obvykle členovec (viz životní cyklus *Ixodes ricinus*). K jejich léčbě se v raných stádiích onemocnění může podávat penicilin, avšak jsou citlivé

hlavně na tetracykliny (ceftriaxon, cefotaxim, doxycyklin)(Vokurka et al. 2005). I proti boreliím lze očkovat. Vakcína je vyvinutá pro Severní Ameriku, kde se vyskytuje pouze jeden genus borelií a to *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, a proto není dostatečně účinná pro evropský komplex druhů *Borrelia burgdorferi sensu lato*, zahrnující - *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garini* (Volf a Horák 2007). K diagnóze se používá průkaz protilátek (IgM a IgG) metodami ELISA, IFA a k potvrzení se používá imunoblot (Vokurka et al. 2005).

Klíšťata také mohou přenášet bakterii *Anaplasma phagophytophila* (dříve označována jako *Ehrlichia*). Ta napadá granulocyty a způsobuje tak onemocnění granulomatozní anaplazmózu (HGA). Projevy jsou bolesti hlavy, únavnost, svalové bolesti, horečky, dyspepsie, kašel, nauzea a také může postihovat plíce, játra či centrální nervovou soustavu (Ismail et al. 2010). U imunodeficitních pacientů, pacientů po transplantaci či po odebrání sleziny může být toto onemocnění smrtelné. Léčba probíhá podáním antibiotik (konkrétně Doxycyklin a při chronickém průběhu Chloramfenikol)[1].

V přírodě se běžně tyto viry a bakterie vyskytují v drobných hlodavcích, larvy či nymfy klíšťat parazitující na těchto hlodavcích se pak stávají přenašeči těchto nemocí (Papáček et al. 2000).

2.4 Životní cyklus bakteriofágů

Bakteriofágy samy o sobě postrádají jakoukoliv schopnost samostatného metabolismu a reprodukce. I přes druhově specifické odlišnosti v životních cyklech bakteriofágů zůstávají základní kroky infekce buněk shodné. V roztoku bakterií se bakteriofágy volně pohybují, dokud nedojde k zachycení proteinů na jejich bičíkových vlákních specifickým bakteriálním membránovým receptorem. Připojovací fáze začíná přilnutím bičíkových vláken k povrchovým receptorům bakteriálních buněk. Tím dojde k propojení bakteriofága s buněčnou stěnou hostitelské buňky. Hroty bičíku jsou často opatřeny enzymy (endolyziny), které dokáží hydrolyzovat buněčnou stěnu a tím umožňují proniknutí genomu viru do hostitelské buňky. Do buňky proniká pouze virová nukleová kyselina. Zbylé části bakteriofága (proteinová hlavička, bičík, bičíková vlákna a bičíkové hroty) zůstávají vně buňky, připojené k její buněčné stěně. Dále pak záleží, o jaký životní cyklus bakteriofága se jedná (Morgan a Pitts 2008).

Lytické (virulentní) bakteriofágy jsou charakteristické tím, že po infekci tyto fágy exprimují geny, které jim umožňují ovládnout (přeprogramovat) proteosyntetický aparát hostitelské buňky. Tyto časně exprimované geny jsou také zodpovědné za kódování

proteinů, které dále přebírají kontrolu nad hostitelskou buňkou. Později exprimované geny kódují replikaci fágového genomu, kapsidových proteinů a následné skládání nové generace virionů. Po uplynutí určitého časového intervalu dojde k lýzi hostitelské buňky a uvolněné viry tak mohou infikovat další bakterie. Lýze je obecně považována za jeden z klíčových faktorů účinnosti fágové terapie (Gill a Hyman 2010).

Mírné, lytické, bakteriofágy mohou vstupovat do dvou různých životních cyklů, lytického, který jsem byl popsán výše, nebo do lyzogenního. Fágový genom lyzogenních bakteriofágů po infekci začíná expresi genů schopných, u většiny mírných fágů, integrovat kopii genomu fága do genomu hostitele a pak potlačovat expresi většiny fágových genů kromě těch nezbytných k udržení lyzogenního stavu. Vzácně se mohou vyskytovat fágy i ve formě neintegrovaného plasmidu (Gill a Hyman 2010).

Fágový genom ve formě profágu je replikován spolu s replikací hostitelské buňky. Profág může zůstat stabilně integrován v genomu bakterie po stovky generací, dokud nedojde k indukci opětovného vstupu do lytického cyklu. Spouští této indukce obvykle bývá změna metabolismu hostitelské buňky a to třeba v důsledku nezvratného poškození DNA (Gill a Hyman 2010).

Mechanismy odpovědné za lýzu hostitelské buňky (tzv. lytické mechanismy) jsou podrobněji popsány další podkapitole.

2.5 Lytické mechanismy

Průběh replikačního cyklu u bakteriofágů je kritériem, podle kterého lze rozdělit bakteriofágy na lytické a lysogenní, Některé viry hostitelskou buňku zničí (lytická infekce), zatímco jiné mají schopnost svou dědičnou informaci vnést do jádra buňky a takto v buňce dlouho přežívat ve formě proviru (lyzogenie)(Vokurka et al. 2005). Uvolnění fágového potomstva z infikovaných buněk však vyžaduje lýzu bakteriální buňky. Vědecké studie zaměřené na fágové lytické mechanismy tak přispívají k vývoji fágové terapie. Některé lytické bakteriofágy používají jednotlivé proteiny, amuriny, k inhibici syntézy peptidoglykanu. Většina z nich však používá dvě skupiny proteinů k usmrcení hostitelské bakteriální buňky. První z nich, holiny, synergizují s endolyziny, a dohromady způsobují lýzi. Společně tak utvářejí dvousložkový systém zahrnující holin a lyzin (Cisek et al. 2017).

Holiny ve své podstatě spouštějí lýzu hostitelských buněk. Během lyzogenního cyklu virové infekce v geneticky programovaném čase dojde k aktivaci holinů, které vede k letálnímu poškození cytoplasmatické membrány bakteriální buňky. Jejich role je

perforování cytoplasmatické membrány hostitelské buňky a spolupracují tak s endolysin, neboť perforací cytoplasmatické membrány endolysinům umožní přístup do periplasmy a k peptidoglykanu buněčné stěny bakteriální buňky. Proto holiny determinují dobu bakteriální léze. V konkrétním časovém bodě umožňují fágovým endolysinům přístup k bakteriálnímu mureinu. Tímto principem synchronizují holin-lysin systém a pozdní fázi fágového replikačního cyklu (Savva a Dewey 2013; Cisek et al. 2017).

Primární struktura holinu se v průběhu evoluce příliš nezachovala. Avšak rozdíly v sekvencích jejich aminokyselin se nijak negativně neodráží na jejich funkčnosti. Každý holin nese alespoň jednu hydrofobní transmembránovou doménu (TMD) stejně jako C-terminální hydrofilní doménu, která má vysoký elektrický náboj. Holiny se dělí do tří tříd. Třída I. zahrnuje proteiny s délkou přesahující 95 aminokyselinových zbytků. Tyto holiny disponují třemi TMD. Holiny patřící do I. třídy jsou reprezentovány *Staphylococcus aureus* bakteriofágem p68, proteinem hol15 a *Escherichia coli* fágem λ , S105 proteinem. Holiny patřící do třídy II. Mají 65 – 95 aminokyselinových zbytků a disponují dvěma TMD. Lambdoidní fág s proteinem 21S a bakteriofág *Clostridium perfringens* A3626 s proteinem hol3626 spadají do této třídy. Holiny III. třídy tvoří pouze jednu TMD a jsou reprezentovány fágem ϕ s proteinem ACP26F holin (Cisek et al. 2017).

Holiny se dále mohou rozdělovat do dvou v zásadě odlišných typů. První z nich, tzv. kanonické holiny, tvoří léze, které umožňují únik plně aktivních endolysinů z cytoplazmy buňky do periplazmatického prostoru. Naopak pinohliny, utvářejí v cytoplasmatické membráně otvory o velikosti 2nm, které jsou příliš malé k uvolnění endolysinů. Místo toho slouží k depolarizaci membrány. Pinholiny vyžadují specifické endolysiny označované jako SAR (signal anchor release) endolysins (Savva a Dewey 2013).

Kanonický holin S105, produkt exprese genu fága λ , je nejvíce studovaný holin. S105 lokalizuje plasmatickou membránu a ve správném časovém okamžiku tvoří smrtící léze (díry) v dvouvrstvě lipidů. Průměrná velikost otvorů v membráně přesahuje 340 nm (Cisek et al. 2017).

Fágové endolysiny jsou enzymatické proteiny způsobující degradaci buněčné stěny. Bakteriofágy je využívají k hydrolýze peptidoglykenu v buněčné stěně infikovaných bakterií. Endolysiny fungují jako endopeptidázy, amidázy, glykosidázy nebo lytické transglykosylázy za účelem usmrcení bakteriální buňky destrukcí mureinu tvořícím bakteriální buněčnou stěnu. Na konci fágového replikačního cyklu endolysiny podporují uvolňování potomstva, nových virionů. Endolysiny používané proti gram-negativním

bakteriím mají odlišné struktury na rozdíl od těch, které jsou užívány proti gram-positivním, to určuje rozdíly mezi enzymy. Gram-negativní bakterie obklopuje vnější membrána, proto je přístup endolysinů uzpůsoben zvenčí, a proto jsou endolyziny, zacílené na gramnegativní bakterie malé globulární proteiny složené pouze z jedné domény, tzv. enzymaticky aktivní domény (EAD), zatímco endolyziny proti gram-positivním mikroorganismům disponují navíc vazebnou doménou buněčné stěny (CBD). Enzym cílící na gram-positivní bakterie se váže na buněčnou stěnu přes jeho CBD a tak zůstává imobilizován na povrchu peptidoglykanu. CBD také přispívá k hydrolytickým účinkům endolyzinu synergií s EAD, který zodpovídá za akatalytickou funkci enzymatického proteinu. Během tohoto procesu endolysin zůstává pevně navázán na jedno místo peptidoglykanové struktury (Cisek et al. 2017).

2.6 Bakteriofágy a imunitní systém

Fágová terapie s sebou může nést riziko negativních reakcí imunitního systému pacienta, proto jsou nezbytné studie zabývající se interakcemi mezi fágy a imunitním systémem. To je velmi důležitá pro její potenciální využití při léčbě. Imunitní odpověď vůči bakteriofágům je závislá na lokalizaci bakteriální infekce a místě injektování fágů do organismu. Za přirozených fyziologických podmínek se mohou bakteriofágy vyskytovat ve střevech a být i součástí požití potravy. Vysoká frekvence přirozeného kontaktu zvířat či lidí s rozličnými druhy bakteriofágů je doložena přítomností anti-fágových protilátek v séru rozličných druhů (včetně člověka). Dále i orální podání fágů během fágové terapie při léčbě bakteriální infekce způsobené bakteriemi -*Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* a *Pseudomonas* - také indukuje produkci protilátek. Neexistují však žádné důkazy o imunologických komplikacích po použití velkého množství bakteriofágů během terapie. Navíc ani lokální aplikace fágů nevykazovala žádné vedlejší účinky (Cisek et al. 2017).

Odlišná situace je pozorována v jiných vnitřních orgánech a v krevním oběhu, neboť nejsou přirozeným prostředím pro fágy tak jako například trávicí trakt. Intravenózní podávání bakteriofágů tedy silně stimuluje jak vrozenou tak i adaptivní imunitu. Dále studie ukazují, že se fágy mohou dostat do krevního oběhu neohledně na způsob podání. Pokud se v organismu nenachází žádná hostitelská bakterie pro specifické fágy, jsou velmi rychle odstraněny z orgánů a krve fagocytujícími buňkami imunitního systému. Navíc jsou tyto bakteriální predátoři internalizováni a eliminováni buňkami retikuloendoteliálního systému (RES) - soustava fagocytujících buněk roztroušená v řadě orgánů (zejména ve slezině, játrech, lymfatické tkáni). Podílí se tak na imunitě organismu (Vokurka et al. 2005,

784s). Je zajímavé, že Kupfferovy buňky (specializované makrofágy nacházející se v játrech) mohou fagocytovat fágy čtyřikrát rychleji než makrofágy sleziny, to naznačuje, že zastavené fágy ve slezině mohou stimulovat lymfocyty k produkci protilátek. Vrozená imunita - první linie obrany - je často více než dostačující k eliminaci patogenů před aktivací adaptivní imunitní odpovědi. Studie ukázaly, že pacienti, kteří podstoupili fágovou terapii, byli charakterizováni klesající počtem zralých neutrofilů a rostoucím počtem prekurzorů neutrofilů v periferním krevním řečišti. Tyto výsledky ukázaly, že fágové přípravky mohou aktivovat vrozenou imunitní reakci, což může být nápomocné při odstraňování bakteriální infekce. Na druhé straně bakteriofágy také mohou ovlivnit metabolické aktivity imunitních buněk. Například některé studie ukázaly, že bakteriofágy významně inhibují produkci ROS (reaktivní sloučeniny kyslíku) v reakci na patogenní bakterie a naznačují, že fágy snižují vrozenou antibakteriální imunitu. Nicméně význam těchto zjištění ve vztahu ke klinickým situacím je diskutován (Cisek et al. 2017).

Během fágové terapie mohou fágy indukovat specifické protilátky (neutralizující protilátky), které obvykle inhibují fágovou účinnost lýzy cílené bakteriální buňky. V pravdě, tyto neutralizující protilátky jsou definovány jako protilátky vázající epitopy, (antigenní determinanty), v těch částech virionu, které jsou klíčové pro infekci hostitelské buňky. Není však stále jasné, jak dlouho potrvá, než vymizí z organismu tento typ protilátek. Koncentrace protilátek v organismu navíc závisí na velkém množství různých aspektů. Konkrétně to může záviset na způsobu podání (orální a perorální způsobí pouze malý nárůst protilátek) a také na způsobu dávkování. Existují studie, které popisují anti-fágové neutralizační protilátky jako jeden z kardinálních faktorů zodpovědných za omezení účinnosti fágové terapie. Sulakvelidze a kol. (2001) publikovali práce, ve kterých se zabývají touto problematikou. Vychází z toho principu, že fágy disponují mnohem větší reprodukční kinetikou než je produkce anti-fágových neutralizačních protilátek, proto by v počátečním stádiu fágové terapie neměly být protilátky problémem (Sulakvelidze et al. 2001).

Nicméně anti-fágové neutralizační protilátky se stávají překážkou, pokud jsou stále přítomny v organismu během podávání dalšího cyklu fágové terapie. Existují tedy alespoň tři alternativy, jak tento problém řešit. První z nich je opakování terapie stejným způsobem jako první cyklus i přesto, že dojde k výraznému snížení účinnosti. Další alternativou je zvýšení koncentrace bakteriofágů v druhém kole terapie. Třetí variantou je použití různých fágů, protože protilátky jsou druhově specifické. I přes skutečnost, že anti-fágové protilátky se objevují v průběhu fágové terapie, dochází také ke zvyšování úrovně ne-

neutralizujících protilátek (IgM a IgG) v organismu, a posilování imunitní odpovědi na některé injekce bakteriofágů (Cisek et al. 2017).

Mimo humorální imunitní reakce, hraje důležitou roli proti fágům také buněčná imunita. Existují publikace, které na jednu stranu přikládají buněčné imunitě malý význam, avšak na druhou stranu tu jsou i publikace které popisují pravý opak. Vzhledem k protichůdným výsledkům je zřejmě nezbytné další studium. Zajímavé je však to, že některé studie poukazují na imunosupresivní vlastnosti některých bakteriofágů. Ve studii o roli bakteriofágů při rozvoji transplantační tolerance, byla pozorována inhibice aktivace T – lymfocytů (Górski 2006), dále také byl indikován pokles humorální imunity po podání fágů (Cisek et al. 2017).

Celkově tedy výsledky poukazují na důležitost testování imunologické odpovědi u každého jednotlivého druhu bakteriofágů, především pokud je plánované jeho použití při intravenózní aplikaci. Nicméně žádné z klinických studií a pokusů na laboratorních zvířatech nevedly k jakékoliv závažné imunitní reakci během fágové terapie (Cisek et al. 2017).

Jako alternativa k aplikaci celých fágů se jeví využití jednotlivých lytických enzymů izolovaných z bakteriofágů. Především endolyziny, které hydrolyzují peptidoglykanovou buněčnou stěnu bakterií se projevovaly jako okamžitá silná bakteriolytická činidla už při nízkém dávkování. Stejně jako bakteriofágy vykazují endolyziny velkou cílovou specifitu (v případě gram-positivních bakterií), tedy ve srovnání s antibiotiky lze očekávat menší množství vedlejších účinků. Bylo identifikováno několik endolyzinů s vysokým baktericidní účinností vůči kmenům *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*, včetně těch s rezistencí na vancomycin. Dokonce jeden endolyzin projevoval širokou lytickou aktivitu vůči streptokokům ze skupin A, B a C. Další studie prokázaly účinnost stafylokokových endolyzinů MV-L a LysK a chimérického endolyzinu ClyS vůči infekcím způsobených *Staphylococcus aureus* a to včetně MRSA (meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) a vancomycin – rezistentního *S. aureus* (Viertel et al. 2014).

2.7 Současnost fágové terapie, její potenciál a rizika

Rostoucí počet bakterií rezistentních vůči antibiotikům představuje závažný problém současné medicíny. Důležitý je však ten fakt, že rezistence těchto bakterií se neimplikuje vůči lyzujícímu mechanismu bakteriofágů. Fágy jsou tedy schopny zabít bakterie rezistentní na antibiotika na konci fágové infekce. Většina z nich využívá dvoukomponentní systém lýzy k rozbití bakteriální stěny u jejich hostitele, aby uvolnili

další generaci fágů. Tedy další vývoj bakteriofágové terapie je jedna z cest s velkým potenciálem jak léčit bakteriální infekce (Cisek et al. 2017).

Bakteriofágy jsou studovány téměř století a to především v Polsku, Gruzii a v Rusku. V současnosti se k výzkumu připojují další země například Francie, Belgie, Švýcarsko i Spojené státy americké. Centrum fágové terapie Hirszfeldova institutu imunologie a experimentální terapie ve Vratislavi nabízí svým pacientům fágové terapie proti řadě bakteriálních onemocnění. Konkrétně se jedná o onemocnění způsobovaná *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* a *Stenotrophomonas*. S pozitivním výsledkem zde bylo léčeno až 50% pacientů. Centrum zatím neposkytuje léčbu infekce způsobené *Streptococcus* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Propionibacterium acnes*, *Borrelia* spp., *Helicobacter pylori* a *Haemophilus influenza*, ani *Chlamydia* spp.. Za účelem zvýšení účinku fágové terapie a snížení rizika vzniku fágové rezistence, je každý cyklus fágové terapie tvořen koktejlem, který obsahuje několik bakteriofágových kmenů. Stále však přetrvává riziko uvolnění nebezpečných bakteriálních endotoxinů na konci lytického virového cyklu (Cisek et al. 2017).

Zvažuje se i využití lyzogenních fágů v rámci fágové terapie, avšak Gill a Hyman ve své práci popisují tři rizika, která s sebou využití těchto fágů nese (Gill a Hyman 2010).

V první řadě genom mírných fágů může obsahovat geny měnící fenotyp hostitelské buňky (tzv. lyzogenní konverze). Například ve *Vibrio cholerae* geny *ctxAB* kódující toxin cholery jsou umístěny uvnitř integrovaného genomu fága CTX ϕ . Podobně většina kmenů *Staphylococcus* obsahuje jednoho nebo více profágů, kódující exotoxiny nebo jiné virulentní faktory. Stručně řečeno, některé lytické bakteriofágy kódují geny, které proměňují patogenní bakterie, na ještě účinnější choroboplodné činitele (Gill a Hyman 2010).

Další riziko se týká integrace genomu bakteriofága do genomu hostitelské buňky. To může vést až k imunitě bakterie vůči superinfekci stejným nebo příbuzným fágem. Toto riziko se dá obejít použitím koktejlů obsahující více nesouvisejících typů fágů. Avšak stále je nežádoucí rozvoj bakteriální imunity vůči potenciálně využitelným bakteriofágům (Gill a Hyman 2010).

Třetí riziko se týká toho, že některé mírné bakteriofágy jsou schopny generalizované transdukce. Ta může iniciovat výměnu velkého množství bakteriální DNA mezi jednotlivými bakteriemi a v návaznosti na to zvýšit potenciál patogenních bakterií.

Tento problém se však neomezuje pouze na lyzogenní bakteriofágy ale i na lytické. Jedna z nejúčinnějších cest, jak minimalizovat tato rizika je zamezení používání mírných bakteriofágů jako součásti fágové terapie (Gill a Hyman 2010).

2.8 Technologie fágového displeje

Využití bakteriofágů má potenciál i mimo léčbu bakteriálních onemocnění. Uplatnění lze nalézt i v jiných oborech, jako je monitorování bezpečnosti jídla, kontrola prostředí či klinická diagnostika. Na to se konkrétně zaměřuje technologie fágového displeje, která se projevuje jako užitečný a potenciální nástroj molekulární biologie, a to především díky své svým vlastnostem v oblastech exprese genů a cílově specifického výběru ligandů. V současnosti je to rozšířená a efektivní metoda používaná ke screeningu peptidů, proteinů a protilátek. Je známo, že různé cíle, včetně iontů, malých molekul, anorganických materiálů, přírodních a biologických polymerů, nanostruktur, buněk, bakterií a dokonce tkání, vytvářejí specifické vazebné ligandy ve spojení s fágy, které jsou používány v rámci technologie fágového displeje. Fágový displej tak umožňuje tvorbu biosenzorů na bázi fágů či odvozených struktur. V rámci této technologie se využívají, z molekulárního hlediska, dobře známé bakteriofágy např. fág λ , fág T4, fágT7, fág M13 (Tan et al. 2016).

3 Metody

3.1 Charakteristika PCR

Jedním z důležitých cílů v molekulární biologii je porozumět vztahu mezi strukturou proteinů a jejich funkcí. Nejpoužívanější strategií za tímto účelem je indukce mutací v různých místech otevřeného čtecího rámce (ORF) cílových genů a hodnotit tak jejich vliv na funkci proteinů (Qi a Scholthof 2008). Stejně jako anorganická katalýza v ropném a chemickém průmyslu způsobila technologickou revoluci, objev polymerázové řetězové reakce (PCR) způsobil revoluci na poli molekulární biologie. PCR poskytuje rychlý a levný způsob izolace genů a vytvoření přesných rekombinačních genetických mutací (Reikofski a Tao 1996).

PCR zahrnuje tvorbu krátkých komplementárních sekvencí DNA, primerů, které jsou na základě komplementarity schopny navázání se na DNA, tzv. templátovou DNA, kterou chceme replikovat. Po nasednutí primerů, Taq polymeráza umožňuje navazování nukleotidů ve směru k 3'-konci. Po extenzi je duplikovaná DNA zahřátím separována a dojde k opětovnému navázání primerů. Duplikovaná DNA slouží také jako templát v dalším kole replikace což vede k exponenciálnímu nárůstu DNA produktů PCR. Navíc dochází k replikaci pouze toho úseku DNA, který se nachází mezi dvěma primery. PCR tedy umožňuje jak amplifikaci DNA, tak i izolaci specifických sekvencí (Reikofski a Tao 1996).

3.1.1 Long PCR

Modifikace klasické PCR metody, umožňující amplifikaci DNA do délky přesahující 40 kbp. Od klasické PCR se odlišuje tato metoda ve složení DNA polymeráz, čímž se zamezuje chybovosti během na dlouhých řetězcích DNA (Tellier et al. 2003).

3.2 Metoda podle Qi a Scholthof

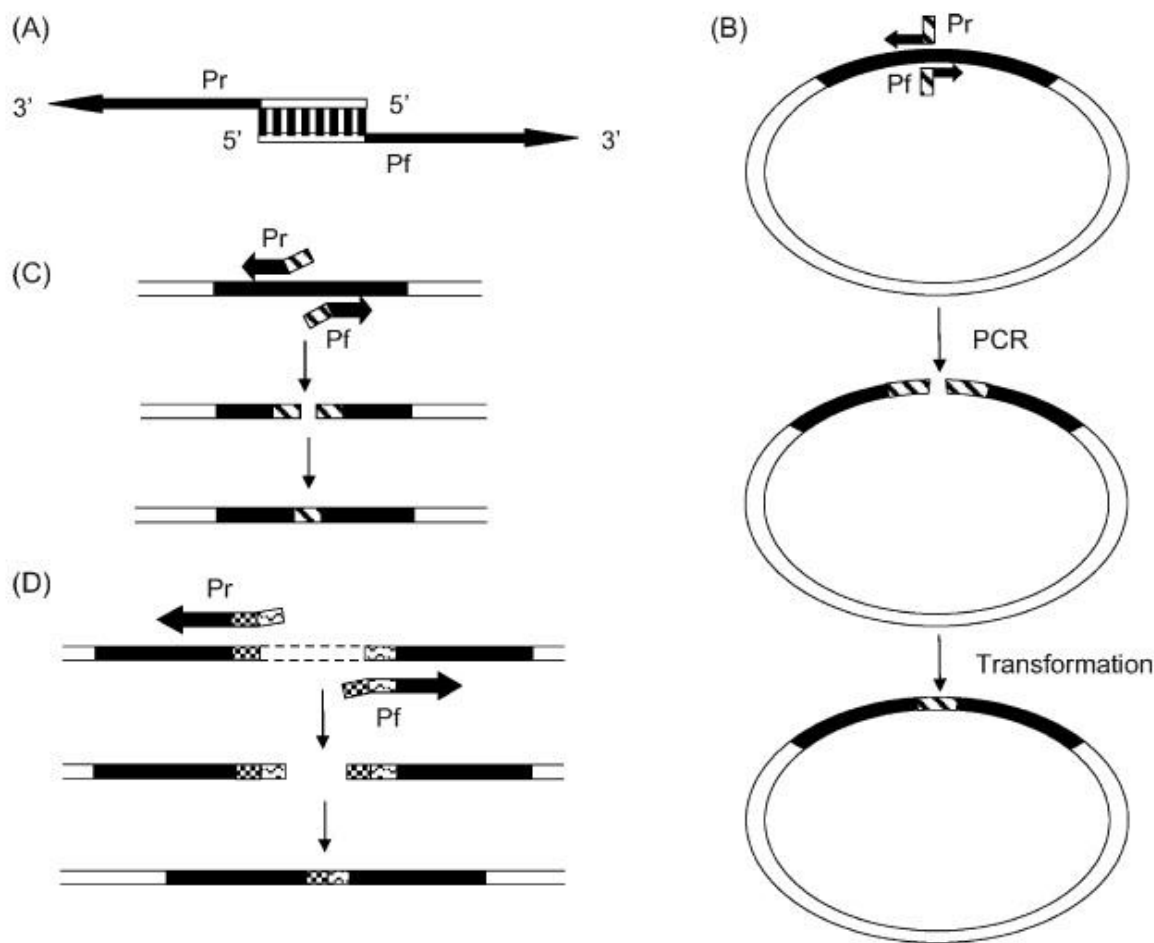
3.2.1 Plazmidy a primery

Plazmid pUC119-SPMV (4 kbp) představuje cyklickou DNA (cDNA) plné délky (824 nt - nukleotidů) viru SPMV (*satellite panicum mosaic virus*), která je klonována bezprostředně za promotor RNA polymerázy fága T7. Tento plazmid byl použit pro vložení mutagenese. Plazmid pDEST17-SPCP (5 kbp) obsahuje cyklickou DNA sekvence SPMV CP (kapsidové proteiny) ORF (open fading frame - otevřený čtecí rámeček) vloženého do plazmidu pDEST17 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Tento konstrukt byl

původně navržený tak, aby nadměrně exprimoval kapsidové proteiny SPMV v *E. coli*. V této metodě byl pDEST17-SPCP použit jako templát pro inzerční, substituční a deleční mutagenézi. Všechny plazmidové templáty byly připraveny za použití soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Primery byly zakoupeny od firmy Invitrogen a čištěny pomocí odsolování bez 5' - modifikace, je to metoda, která je komerčně dostupná, nejméně purifikovaná a nejlevnější (Qi a Scholthof 2008).

3.2.2 PCR mutagenéze

PCR amplifikace plazmidové cDNA byla provedena Qi a Scholthof (2008) za využití opravného Pfu Turbo systému (Stratagene). PCR reakce o objemu 50 μ l se skládala z 1 μ l templátu (~200ng), 1 μ l každého primeru (~20pM každý), 1 μ l dNTP směsi, 5 μ l 10 \times bufferu, 1 μ l Pfu Turbo DNA polymerasy (2.5 U) a 40 μ l dH₂O. Reakce začala pre-denaturací templátů při teplotě 95°C po dobu 2 minut. To bylo následováno 18 cykly sestávajících se z 1 minuty na teplotě 95°C, 1 minuty na teplotě 55°C a 1 minuty/kbp na teplotě 68°C. Po skončení průběhu PCR reakce byl 1 μ l *DpnI* (20 U) (NEB, Ipswich, MA) přidán do směsi a ta byla 1 hodinu inkubována při teplotě 37°C, aby došlo k degradaci originálních nemodifikovaných plazmidových templátů. Po štěpení *DpnI* se použije 5 μ l směsi k transfekci DNA do kompetentních buněk XL1-Blue tepelným šokem. Po hodině regenerace v 300 μ l LB media bez antibiotik je transformovaná XL1-Blue *E. coli* přenesena na Petriho misky s LB mediem obsahující 50 μ g/ml ampicilinu a inkubována při teplotě 37°C přes noc. Kolonie byly vybrány a pěstovány přes noc v 3ml LB media s 50 μ g/ml ampicilinu. Plazmidová DNA byla izolována za pomoci QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) a následně sekvencována (Qi a Scholthof 2008).



Obr. 3. Strategii tvorby primerů a jejich využití pro inserci, substituci a deleční mutagenezi. Převzato z Qi a Scholthof (2008).

Na obr. 3 se nachází dva částečně se překrývající primery (A). Pf je přední primer a Pr je reverzní. Černé šipky reprezentují sekvence nasedající na úseky lemující cílové místo. Prázdné rámečky představují komplementární sekvenci tvořenou 18 nukleotidy, která se mění pro každý experiment mutagenese. Pro inserční nebo substituční mutagenezi (B, C), komplementární oblast představuje cizí sekvence, které mají být začleněny (pruhovaný rámeček). Pro deleční mutagenezi (D) se 5'-komplementární sekvence skládá z 9 nukleotidů lemujících fragment, který má být vymazán na 5'-konci (kostkovaný rámeček) a 3'-konci (vlnitý rámeček). (B) Vložená mutagenese (inzerce). Kromě templátu o plné délce, lineární PCR produkt obsahuje inzertovanou sekvenci na svém 5'- a 3'- konci s 18 překrývajícími se nukleotidy. V *E. coli* jsou tyto překrývající se oblasti vyřešeny in vivo rekombinací, což vede ke vzniku kruhového plazmidu s vloženou sekvencí v požadovaném místě. Pro zjednodušení jsou zobrazeny pouze oblasti iniciující navázání primeru a konečné mutované sekvence jsou zobrazeny jak pro substituční (C) tak i deleční (D)

mutagenezi. (C) Substituční mutageneze. Probíhá podobně jako inzerční mutageneze s výjimkou toho, že nedojde ke změně cílového fragmentu tím způsobem, že by po rekombinaci cizí sekvence nahradila cílový fragment. (D) Deleční mutageneze. Odstraněná oblast je značena čárkovaně. Připomíná substituční mutagenezi, ale fragment, který má být deletován, není amplifikován. Primery obsahují 9 nukleotidových sekvencí (označených kostkovaně a čárkovaně) lemujících fragment, který má být odstraněn na druhé straně, takže lineární PCR produkt má 18 nukleotidů překrývající oblast endogenní sekvence plazmidu na obou koncích. V důsledku toho odstraněn z produktu PCR, který je použit pro rekombinaci Qi a Scholthof (2008).

3.2.3 Design primerů

Strategie designu primerů je znázorněna na obr. 3A. Primery se skládají ze dvou hlavních částí: 5'-komplementární úsek o délce 18 nukleotidů a 3'-komplementární úsek o délce 25 nukleotidů. Primery byly navrženy tak, aby nasedaly na templátové sekvence, které lemují předem stanovené sekvence. Ty poté mohou být deletovány, substituovány nebo zde mohou být začleněny inzerce. 18 nukleotidů dlouhý 5'-komplementární sekvence se upravovala podle potřeb. Pro vložení sekvence (obr. 3B) nebo substituci (obr. 3C), 5'-komplementární sekvence zahrnovaly i cizí sekvence, které mají být integrovány. Pokud byly cizí sekvence delší než 18 nukleotidů, přebývajících nukleotidy mohou být začleněny mezi 5'-komplementární sekvenci a 3'-komplementární sekvenci přisedající na templátovou DNA. V případě delece, 18 nukleotidů dlouhá 5'-komplementární sekvence byla složena z 9 nukleotidů bezprostředně proti směru 5'-konce fragmentu, který má být vymazán a 9 nukleotidů za 3'-koncem (obr. 3D). Lineární PCR produkty tedy obsahovaly překrývající se sekvenci o délce 18 nukleotidů na 5'- a 3'- konci. To umožnilo jejich cirkularizaci do životaschopných plastidů po *in vivo* rekombinaci v transferovaných XL1-Blue *E. Coli*. Pokud byly 5'-komplementární sekvence primerů, cizí sekvence, úspěšně navázány plazmid se úspěšně cirkularizoval a došlo k amplifikaci jeho délky, můžeme pak hovořit o inzerci (obr. 3B). Naopak pokud po navázání 5'-komplementárních cizích sekvencí nedošlo k amplifikaci celého plazmidu, byla provedena substituce sekvence (obr. 3C). V případě, že cílová sekvence nebyla amplifikována a lemující sekvence byly součástí komplementárních sekvencí, přestává být cílová sekvence přítomna v dané PCR reakci a došlo tedy k deleci dané sekvence (obr. 3D). Na základě těchto principů byla vytvořena série primerů pro různé typy manipulace se sekvencemi. Podrobné informace o primerech

jsou uvedeny v tab 1. Mutagenezní PCR, transfekce a izolace DNA byla provedena podle postupu uvedeného v podkapitole PCR mutageneze (Qi a Scholthof 2008).

Tab. 1. Primery použité pro mutagenezní PCR. *Převzato z Qi a Scholthof (2008).*

Primer	Mutace	Sekvence (5' – 3') ^a
32HAr 32HAr	Inzerce	<u>TATGATGTGCCAGATTATGCC</u> Cacggagcgagatactgatactacctc ATAATCTGGCACATCATAAGGGTAcaaggtgacgtagcacgtatcgtac
43HAr 43HAr	Inzerce	<u>TATGATGTGCCAGATTATGCC</u> Cagttcccgactctcaaggggatgg ATAATCTGGCACATCATAAGGGTActgcctctgaaaagaggtagtac
82HAr 82HAr	Inzerce	<u>TATGATGTGCCAGATTATGCC</u> Cacagactctgtccatgccaccggggtac ATAATCTGGCACATCATAAGGGTAgtcggccgggtatacagggcgcgcg
116HAr 116HAr	Inzerce	<u>TATGATGTGCCAGATTATGCC</u> actgaagaagccgagaccattttggcc ATAATCTGGCACATCATAAGGGTAgttaccaaagaaccagttgttctgg
SPCP-82Ff SPCP-82Ff	Inzerce	<u>GACTACAAGGACGATGAC</u> acagactctgtccatgccaccggggtac GTCATCGTCCTTGTAGTcgtcggccgggtatacagggcgcgcg
SPCP-NHAf SPCP-NHAf	Substituce	<u>TATGATGTGCCAGATTATGCC</u> gcgggctcccgggctactgccacatc ATAATCTGGCACATCATAAGGGTAaggagccatgtatattctccttc
SPCP-Bf SPCP-Bf	Delece	<u>AATCGTCGG</u> actctcaaggggatggggga <u>CTTGAGAGT</u> ccgacgattagatcgctgg
SPCP-Cf SPCP-Cf	Delece	<u>AGTTTCCCG</u> acacagactctgtccatgc <u>GTCTGTGTC</u> cgggaaactctgcctctgaa
SPCP-Df SPCP-Df	Delece	<u>AACCCGGGC</u> gaagaagccgagaccatttt <u>GGCTTCTTC</u> ggccgggtatacagggcgcgcg
SPCP-Ef SPCP-Er	Delece	<u>GGTAACACT</u> gggggttctcatcatca <u>AGAACCCC</u> agtgtaccaaagaaccagt

^a znázorňuje sekvence nasedající na templátovou DNA. Ty jsou označeny malými písmeny, cizí sekvence pro inzerce nebo substituci jsou označeny tučným písmem a komplementární oblasti jsou podtržené. Pro deleční mutagenezi jsou sekvence primeru kurzívou a velkými písmeny, označují 9 nukleotidů lemujících fragment, který má být vyříznut, jak je znázorněno na obr. 3D (Qi a Scholthof 2008).

V originální publikované tabulce (Qi a Scholthof 2008) došlo zřejmě k záměně mezi primery SPCP-82Ff a SPCP-NHAf, protože primer kódující substituci je označen jako inzerční a naopak.

4 Výsledky

4.1 Proteiny borelií

Protože se fágy váží na povrchové proteiny bakterií, bylo nutno stanovit konkrétní sekvenci proteinu. Sekvence byla získána z online databáze sekvencí NCBI (národní centrum pro biotechnologické informace), která je součástí národní lékařské knihovny ve Spojených státech amerických [2].

4.1.1 Struktura proteinu OspA (outer surface protein A)

```
MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLI
ATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQTTLEVFKEGKTLV
SKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYV
LEGLTAEKTTLVVKEGTVTLKSNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTST
LTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK
```

Struktura je získána z NCBI [3].

4.1.2 Nukleotidová sekvence OspA (outer surface protein A)

Sekvence je zpětně přepsána z proteinové struktury OspA, to znamená, že se pořadí nukleotidů této sekvence nemusí shodovat s pořadím nukleotidů kódující sekvence v genomu *Borrelia burgdorferi*, ale stále budou kódovat stejný protein.

```
ATGAAAAAATATTTATTGGGAATAGGTCTAATATTAGCCTTAATAGCATGTAA
GCAAAATGTTAGCAGCCTTGACGAGAAAAACAGCGTTTCAGTAGATTTGCCTG
GTGAAATGAAAGTTCTTGTAAGCAAAGAAAAAACAAGACGGCAAGTACGA
TCTAATTGCAACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTCTGATAAAAAACA
ATGGATCTGGAGTACTTGAAGGCGTAAAAGCTGACAAAAGTAAAGTAAAATT
AACAAATTTCTGACGATCTAGGTCAAACCACACTTGAAGTTTTCAAAGAAGATG
GCAAAACACTAGTATCAAAAAAAGTAACTTCCAAAGACAAGTCATCAACAGA
AGAAAAATTCAATGAAAAAGGTGAAGTATCTGAAAAAATAATAACAAGAGCA
GACGGAACCAGACTTGAATACACAGGAATTAAGCGATGGATCTGGAAAAG
CTAAAGAGGTTTTAAAGGCTATGTTCTTGAAGGAACTCTAACTGCTGAAAAA
ACAACATTGGTGGTTAAAGAAGGAACTGTTACTTTAAGCAAAAATATTTCAAA
ATCTGGGGAAGTTTCAGTTGAACTTAATGACACTGACAGTAGTGCTGCTACTA
AAAAAACTGCAGCTTGAATTCAGGCACTTCAACTTTAACAATTACTGTAAAC
```

AGTAAAAAACTAAAGACCTTGTGTTTACAAAAGAAAACACAATTACAGTACA
ACAATACGACTCAAATGGCACCAAATTAGAGGGGGTCAGCAGTTGAAATTACAA
AACTTGATGAAATTA AAAACGCTTTAAAATAA

Převedené aminokyseliny na nukleotidové sekvence jsou získané z NCBI [4].

4.2 Design primerů OspA

Design primerů provedu podobným způsobem jako Qi a Scholthof v jejich metodě (viz podkapitola Design primerů). Budu vycházet ze znalosti nukleotidové sekvence OspA a z jeho prostorové orientace. Vyberu ty sekvence, které kódují povrchové aminokyseliny proteinu. Na základě těchto sekvencí vytvořím několik sad po dvou primerech s přesahem, které budou navzájem komplementární v úseku přesahu. Tímto způsobem nadefinuji pouze přesahovou část primeru, kódující aminokyseliny cílící na OspA. Tento úsek bude zároveň zodpovědný za inzerci a substituci původních úseků genomu bakteriofága.

Annealingová (dosedající) část primeru by měla být nadefinována dle znalosti genomu *E.coli* bakteriofágů. Jelikož jsou tyto bakteriofágy předmětem studií po řadu let, je jejich genom dobře zmapován a rozdělen na jednotlivé sekvence (geny). Na základě znalostí těchto genů a jejich funkce specifikuji ty geny, které chci nahradit (substituovat, inzerovat), a podle lemujících sekvencí nadefinuji druhou část primerů. Sekvence se bude lišit podle vybraného fága a také podle vybraných sekvencí v rámci genomu fága.

Pro zvýšení afinity k OspA bude pravděpodobně nezbytné nahradit více sekvencí genomu bakteriofága. V tomto případě se naváže, na již zmíněných metody stejné substituce (či inzerci) bude do genomu vložena vícekrát.

Analogicky lze takto nadefinovat primery i na OspB a další povrchové proteiny nejen u *Borrelia burgorferi sensu lato*, ale třeba i u *Anaplasma phagocytophilum* a další bakterií.

Primery lze udělat na zakázku na míru u společnosti GENERI BIOTECH [5].

4.3 Výběr bakteriofágů

Výběr fágů je poměrně omezen. Vybírám pouze z bakteriofágů, které se projevují lytickým či alespoň částečně lytickým cyklem, jinak by jejich přítomnost v kultuře bakterií nebyla snadno zjistitelná. Další specifika tohoto výběru spočívají na podrobné znalosti jejich genomu. Je nezbytné znát úseky odpovědné za syntézu povrchových proteinů. Další faktory jsou snadnost pěstování daného bakteriofága na kulturách *E. coli*, délka a struktura DNA fága do 40 kbp (aby bylo možné provést PCR amplifikaci genomu), rozměry virionu

dostupnost dostání. Budu tedy vybírat z fágů běžně používaných v biotechnologiích: fág λ , fág T4, fágT7, fág M13 (fág M13 má cDNA)(Tan et al. 2016).

4.4 Metody mutagenese fágů

Protože budu replikovat genom fágů a to až do délky 40 kbp, musím použít modifikaci klasické PCR reakce, Long PCR. Ta umožňuje totiž replikace DNA až do délky přesahující 40 kbp. V rámci této metody použiji LongAmp™ Taq PCR Kit (New England Biolabs, New England, USA).

Všechny tyto metody jsou pouze teoretické a vycházejí z již zmíněných ověřených metod. Jejich funkčnost je tedy nejprve nutné ověřit v laboratorních podmínkách.

4.4.1 PCR mutagenese

Všechny metody PCR mutagenese, které jsou zde popsány, vycházejí z metody podle Qi a Scholthof. Některé kroky z této metody byly přizpůsobeny typu DNA, se kterou se pracuje. Všechny metody také využívají Long PCR.

4.4.1.1 PCR mutagenese fága s cirkulární DNA

Pro tuto PCR mutagenesi lze využít fága M13, protože disponuje cDNA. Qi a Scholthof (2008) ve své metodě popisují mutagenesi fága, který je součástí plazmidu, tedy se jedná o cDNA (Qi a Scholthof 2008). Při mutagenesi fága s cDNA by tedy došlo k zachování postupu jejich metody.

4.4.1.2 PCR mutagenese cirkularizovaného fága a následná možná linearizace

Při výběru fága s lineární DNA by bylo nejprve třeba pomocí ligázy „slepit“ jeho konce a cirkularizovat tak jeho genom. Další průběh by pokračoval dle metody podle Qi a Scholthof (2008), ve které pracovali s plazmidovou cDNA. V tomto typu PCR modifikace by tedy došlo před PCR reakcí k úpravě lineární DNA fága na cirkulární DNA, aby mohl být zachován postup metody podle Qi a Scholthof. Před transfekcí genomu fága do buňky by byl genom fága „přestřížen“ v místě prvotní ligace pomocí restriktázy a tak opět linearizován.

Je také možné, že u cirkularizovaného fága by si jeho genom zachoval funkčnost, tedy by krok finální linearizace jeho DNA odpadal.

4.4.1.3 PCR mutagenese lineárního fága

Tato metoda na rozdíl od již zmíněných pracuje s lineární DNA. Nedochozí k žádné pre-PCR úpravě. Vychází z metody podle Qi a Scholthof (2008). V rámci této metody by bylo nezbytné použít i dodatečné primery k amplifikaci zbytku řetězce DNA, neboť by nedošlo k jeho plné amplifikaci jako u mutagenetické PCR cirkulární DNA.

4.4.2 Enzymatická mutagenese

Při této metodě by se použily specifické restriktázy (restrikční endonukleázy) na „vyříznutí“ nahrazovaného úseku a ligázy pak na „napojení“ požadované sekvence na jeho místo. Následovala by Long PCR reakce k amplifikaci modifikovaného fágového genomu s nahrazeným úsekem za využití specifických primerů nezbytných k replikaci fágové dna.

4.5 Kultivace modifikovaných fágů

Transfekcí tepelným šokem, nebo za pomoci T7Select[®] Packaging Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) bych dostal do bakteriálních buněk tuto fágovou DNA a po úspěšném začlenění by buňka sama produkovala fungující modifikované bakteriofágy. Kultivace by probíhala na kulturách *Borrelia burgdorferi* v případě, že by byly nahrazeny všechny receptory povrchových proteinů. Pro bezpečnější manipulaci by mohly zůstat zachovány i některé receptory vázající se na *Escherichia coli*.

4.6 Cíle metodiky

4.6.1 Modifikace kapsidových proteinů

Jedna z možností jak zaměřit fága na OspA *Borrelia burgdorferi* je modifikovat jeho kapsidové proteiny tak aby se vázaly na OspA. Na to bych využil T7Select[®] Biopanig Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), obsahující vše potřebné k vytvoření virionu, na jehož povrchu se objeví proteiny exprimované vloženou DNA a to až do velikosti 50 aminokyselin. Sestavení fágů probíhá v cytoplazmě *Escherichia coli* a fág se uvolňuje buněčnou lýzou. Vzniklé fágy by měly být schopné se navázat kapsidou na OspA *Borrelia burgdorferi*.

Problémem je však to že bude fág dosedat na bakterii kapsidou a tedy nebude v poloze vhodná pro infekci buňky. Je tu však šance následné autoinfekce bakterie, kvůli jejímu dlouhému spirálovitému tvaru a kroutivému pohybu, proto zahrnuji do metodiky i tuto možnost.

4.6.2 Modifikace vazebných proteinů bičků

Ideální by bylo modifikovat vazebné proteiny na bičkách bakteriofágů. To by šlo uskutečnit dvěma způsoby.

4.6.2.1 Biček s oběma receptory

Ponechat úsek kódující receptor fága na *Escherichia coli* a přidat za něj úsek kódující vazebné proteiny na OspA *Borrelia burgdorferi* tak aby následně byla indukována syntéza bičků disponujících oběma receptory.

4.6.2.2 Receptorově specifické bičky

Při neúčinnosti „obojetných“ bičků by byl úsek kódující vazebné proteiny na OspA u *Borrelia burgdorferi* vložen do genomu fága tak, aby byla indukována syntéza jak bičků se specificitou na *Escherichia coli*, tak i se specificitou na *Borrelia burgdorferi* u další generace fágů.

5 Diskuze

5.1 Srovnání antibiotik a bakteriofágů

Ve své práci *Bacteriophage Therapy* Sulakvelidze et al. (2001) popisují výhody a nevýhody fágů ve srovnání s antibiotiky. Výhodou bakteriofágů je jejich vysoká specifita, tedy to, že cílí pouze na konkrétní patogenní bakterie a nenapadají přirozenou mikroflóru pacienta. Naopak antibiotika napadají i tuto mikroflóru. Její poškození pak může vést i k druhotným infekcím. Ve výsledku vysoká specifita bakteriofágů se může stát i jejich nevýhodou, neboť je nejprve nezbytné zjistit, jaké konkrétní patogeny způsobují onemocnění (Sulakvelidze et al. 2001).

Zmíněné výhody patnáct let po vydání publikace od Sulakvelidze et al. dále rozvíjí Cisek et al. (2017) ve své práci také vyvrací tvrzení o nevýhodách fágové specifity možností použití „fágového koktejlu“, který by zahrnoval větší množství druhově odlišných fágů v průběhu terapie (Cisek et al. 2017).

Osobně si myslím, že tímto způsobem by bylo zřejmě možné bakteriofágům ponechat jistou specifitu a zároveň tak cílit na větší spektrum patogenních bakterií bez jakýchkoliv zásahů do přirozené mikroflóry organismu. K úspěšné léčbě by tak stačila pouze přibližná diagnóza.

Další výhodou, kterou popisují Sulakvelidze et al. je to, že se fágy replikují v místě infekce, kde je jich potřeba, na rozdíl od antibiotik, které jsou navíc odbourávány metabolismem pacienta a vylučovány z organismu. V tomto případě je také nezbytné brát úvahu roli imunitního systému pacienta. Užití antibiotik s sebou také nese velké množství vedlejších účinků, jako jsou střevní poruchy, alergické reakce a sekundární infekce (Sulakvelidze et al. 2001).

V současnosti nejzávažnějším problémem antibiotik je také stále narůstající počet rezistentních bakterií. Vývoj nových antibiotik je poměrně časově náročný proces, který se pohybuje v časovém rozsahu v řádu let, obzvláště při vývoji alternativ vůči rezistentním bakteriím. Naopak selekce nových bakteriofágů je poměrně rychlý proces (Sulakvelidze et al. 2001).

K tomuto názoru se přiklání i další autoři - Gill a Hyman (2010), Viertel et al. (2014), Cisek et al. (2017) - zabývající se výzkumem ve spojitosti s bakteriofágy či výzkumem jiných alternativních metod léčby rezistentních bakterií. Podle mého názoru a podle autora předkládané práce, rezistence bakterií je jedním z kardinálních problémů současné medicíny.

5.2 Problematika imunitního systému ve vztahu k fágům

Problematika fágů a imunitního systému nespočívá příliš v rizicích závažných imunitních reakcí, jak je zmíněno výše, jako spíš ve snižování účinku fágové terapie (více viz podkapitola Bakteriofágy a imunitní systém)(Cisek et al. 2017).

Cisek et al. (2017) se ve své práci zaměřují na problematiku vztahu bakteriofága a imunitního systému hostitele. Z jimi publikovaných výsledků lze stručně uvést, že nedošlo k žádné závažné imunitní reakci během klinických studií a studií na zvířatech při použití fágové terapie a to včetně lokální aplikace bakteriofágů (Cisek et al. 2017).

Viertel et al. ve své publikaci dokonce popisují jako jednu z alternativ fágové terapie využití lytických enzymů produkovaných bakteriofágy k lýze bakteriálních buněk. To lze však využít jen k ničení gram-pozitivních bakterií, neboť u gram-negativních nemají endolysiny přístup k peptidoglykanové buněčné stěně (Viertel et al. 2014).

Možností jak obejít imunitní systém a zvýšit tak účinnost léčby je několik. Cisek et al. (2017) popisuje tři alternativy, jak tento problém řešit. První z nich je opakování terapie stejným způsobem jako první cyklus i přesto, že dojde k výraznému snížení účinnosti. V tomto případě počítá tedy s možností, že účinnost fágů zůstane zachována do dostatečné míry (Cisek et al. 2017).

Další alternativou, kterou popisuje, je postupné zvyšování koncentrace bakteriofágů v druhém a dalších kolech terapie. Tím by se zvedla pravděpodobnost infekce bakteriální buňky bakteriofágem dříve, než by došlo k jejich úplné eliminaci imunitním systémem (Cisek et al. 2017).

Třetí variantou je použití různých druhů fágů, protože protilátky jsou velmi charakteristické svojí druhovou specificitou. Problémem není jen tvorba anti-fágových protilátek v průběhu fágové terapie, dochází také ke zvyšování úrovně IgM a IgG protilátek v organismu, a posilování imunitní odpovědi na některé injekce bakteriofágů (Cisek et al. 2017).

Další z cest, jak obejít imunitní systém, by spočívala v mutagenezi fágů na míru danému organismu. Stačilo by modifikovat kapsidové proteiny virionu tak aby byly rozpoznatelné jako součást organismu pacienta a nebyly tak napadány jeho imunitním systémem. To by jistě vyžadovalo další výzkum, ale je pravděpodobné, že s upravenými metodami fágové mutageneze, znalostí povrchových receptorů specifických pro daný imunitní systém pacienta a za použití mnou výše vypracovaných metod, metody podle Qi a

Scholthof (2008) a metody fágového displeje (Tan et al. 2016), by tato modifikace fágového genomu byla realizovatelná.

5.3 Problematika léčby pacientů s imunodeficitem

Další problém který by dokázala fágová terapie řešit, by byl problém léčby pacientů s imunodeficitem, pacientů bez fungujícího imunitního systému (AIDS, léčba leukemie,...), nebo pacientů po transplantaci na imunosupresivní léčbě. Všichni tito pacienti jsou mnohem více náchylní k onemocnění než běžní zdraví lidé. Problémem je ten fakt, že léčba antibiotiky funguje pouze za spolupráce s imunitním systémem pacienta a tedy v jejich případě se může projevit až jako neúčinná.

V tomto případě by jako jediná fungující léčba mohla nastoupit fágová terapie. Fágy totiž potřebují k úspěšné replikaci pouze bakteriální buňku a za absence či snížené účinnosti imunitního systému by naopak jejich potenciál nebyl omezován. Cisek et al. (2017) dokonce ve své práci popisují činnost imunitního systému jako jeden z hlavních problémů snižujících účinnost fágové terapie (Cisek et al. 2017).

5.4 Problematika laické veřejnosti

Je také potřeba pracovat s laickou veřejností. Strach a obavy z neznámého se už dříve ve spoustě jiných oborů projevily jako těžce překonatelné překážky. Proto je nezbytné nezapomínat na toto riziko a včas začít připravovat veřejnost na možný nástup fágové terapie jako alternativy léčby antibiotiky.

Laická veřejnost má především obavy z toho, že by došlo během fágové terapie k mutacím u bakteriofágů do té míry, že by získali schopnost infikovat eukaryotické buňky. Toto je však planá obava, neboť bakteriofágy jsou striktně specializované viry na bakteriální – prokaryotické – buňky. Mutace takového rozsahu by byla pravděpodobně nerealizovatelná při cílené mutagenезi fága, natož aby proběhla samovolně. Muselo by totiž dojít ke změnám genomu v jeho celém rozsahu.

5.5 Problematika metod

Metody, které popisují, jsou stále limitovány celkovými znalostmi molekulární biologie. Možnosti v oblasti modifikace virů, bakteriofágů v případě této práce, jsou limitovány znalostí jejich genomu. Konkrétně je nezbytné znát projevy jednotlivých genů. Na základě této znalosti lze pak utvářet hypotézy o změnách způsobených cílenou mutagenезí fágového genomu. S přesnější znalostí jednotlivých genů a vlastností, které

kódují, lze vyvodit přesnější hypotézy ohledně plánovaných modifikací genomu. Stále je však nezbytné tyto hypotézy ověřit jejich postupným uvedením v praxi.

Znalost genomu bakteriofágů, jednotlivých genů a jejich projevů, s sebou nese značný potenciál. Qi a Scholthof (2008) ve své práci modifikovali plazmid, tak aby produkoval fágové kapsidové proteiny. V této práci jsou popsány inovativní metodiky na modifikaci vazebných proteinů. Znalosti ohledně této problematiky se stále rozrůstají. Osobně si myslím, že to bude pokračovat do té míry, kdy bude reálné na základě těchto znalostí libovolně sestavit fága schopného infekce bakteriální buňky na základě jejich povrchových proteinů a replikace za využití jejího proteosyntetického aparátu.

6 Závěr

V rámci této práce jsem popsal základní problematiku bakteriofágů, jejich historii, současnost, využití a potenciál do budoucnosti. Dále jsem popsal bakterie *Anaplasma phagocytophilum* a *Borrelia burgdorferi* ve spojení s problematikou parazitismu *Ixodes ricinus*. Vymyslel jsem několik metodik jak na PCR mutagenezi, tak enzymatickou mutagenezi bakteriofágů, v rámci nichž popisuji modifikaci sekvencí odpovědných za kódování vazebných proteinů u fágů napadajících *Escherichia coli*, tak aby byly schopné kódovat vazebné proteiny na OspA u *Borrelia burgdorferi*. Tyto metodiky jsou analogicky použitelné i u dalších bakterií s výskytem v populaci *Ixodes ricinus* i mimo ni. Mimo již zmíněných metodik jsem srovnal fágovou terapii a léčbu antibiotiky. Dále jsem popsal problematiku vztahu imunitního systému pacientů a fágů použitých ve fágové terapii, problematiku laické veřejnosti. Na závěr jsem shrnul potenciální využití fágové terapie a zmínil možné směry, kterými by se výzkum bakteriofágů mohl v budoucnu ubírat.

7 Literatura

ABEDON, S. T., KUHL, S. J., BLASDEL, B.G. a KUTTER, E. M. 2014. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **1**(2), 66-85. DOI: 10.4161/bact.1.2.15845

ACKERMANN, H.-W. 2003. Bacteriophage observations a evolution. *Research in Microbiology* **154**(4), 245-251. DOI: 10.1016/S0923-2508(03)00067-6.

ALBERTS, B. 1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Přeložil KOTYK, A., BOUZEK, B., HOZÁK, P. Espero, 288-291. Ústí nad Labem. ISBN 80-902906-2-0.

CISEK, A.A., DAŃBROWSKA, I., GREGORCZYK, K.P. a WYŻEWSKI, Z. 2017. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology* **74**(2), 277-283. DOI: 10.1007/s00284-016-1166-x.

GILL, J. a HYMAN, P. 2010. Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **11**(1), 2-14. DOI: 10.2174/138920110790725311.

GÓRSKI, A., WAŻNA, E., DAŃBROWSKA, B.-W., DAŃBROWSKA, K., ŚWITAŁA-JELEŃ, K. a MIĘDZYBRODZKI, R. 2006. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **46**(3), 313-319. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x.

ISMAIL, N., BLOCH, K.C. a MCBRIDE, J.W. 2010. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine* **30**(1), 261-292. DOI: 10.1016/j.cll.2009.10.004.

MORGAN, G.J. a PITTS, W.B. 2008. Evolution without Species: The Case of Mosaic Bacteriophages. *The British Journal for the Philosophy of Science* **59**(4), 745-765. DOI: 10.1093/bjps/axn038.

PAPÁČEK, M., MATĚNOVÁ, V., MATĚNA, J. a SOLDÁN, T. 2000. *Zoologie. Scientia*, 73-74. Praha. ISBN 80-7183-203-0.

QI, D. a SCHOLTHOF, K.-B.G. 2008. A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis. *Journal of Virological Methods* **149**(1), 85-90. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.01.002.

REIKOFSKI, J. a TAO, B.Y. 1992. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnology Advances* **10**(4), 535-547. DOI: 10.1016/0734-9750(92)91451-J.

ROSYPAL, S. 2000. Úvod do molekulární biologie: Díl třetí. Molekulární biologie virů, mutageneze, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA. Stanislav Rosypal, 609-638. Brno. ISBN 8090256228.

SAVVA, C.G., DEWEY, J.S., MOUSSA, S.H., TO, K.H., HOLZENBURG, A.a YOUNG, R. 2014. Stable micron-scale holes are a general feature of canonical holins. *Molecular Microbiology* **91**(1), 57-65. DOI: 10.1111/mmi.12439.

SHARP, R. 2001. Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **76**(7), 667-672. DOI: 10.1002/jctb.434.

SULAKVELIDZE, A., ALAVIDZE, Z. a MORRIS, J.G. 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(3), 649-659. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.

SUMMERS, W.C. 2014. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage* **2**(2), 130-133. DOI: 10.4161/bact.20757.

TAN, Y., TIAN, T., LIU, W., ZHU, Z. a YANG C.J. 2016. Advance in phage display technology for bioanalysis. *Biotechnology Journal* **11**(6), 732-745. DOI: 10.1002/biot.201500458.

TELLIER, R., BUKH, J., EMERSON, S.U. a PURCELL, R.H. 2003. Long PCR Amplification of Large Fragments of Viral Genomes: A Technical Overview. *PCR Protocols*. Humana Press, 167-172. New Jersey. DOI: 10.1385/1-59259-384-4:167.

VIERTEL, T. M., RITTER, K. a HORZ, H.-P. 2014. Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**(9), 2326-2336. DOI: 10.1093/jac/dku173.

VOKURKA, M. a HUGO, J. 2005. *Velký lékařský slovník. 5. vydání*. Maxdorf, Jessenius, 1001 s. Praha. ISBN 80-7345-058-5.

VOLF, Petr a Petr HORÁK. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Triton, 262-265. Praha. ISBN 9788073870089.

7.1 Internetové zdroje

[1] Medscape. *Ehrlichiosis* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/235839-overview>

[2] NCBI. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[3] NCBI. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_045688.1?report=fastA

[4] NCBI. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1194357>

[5] GENERI BIOTECH [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/kategorie/oligo-probes/>

8 Resumé

In this work I described the basic issues of bacteriophages, their history, recent state, their use and potential for the future. I also described the bacteria *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in connection with the parasitism of *Ixodes ricinus*. I have invented several methodologies for both PCR mutagenesis and enzymatic mutagenesis of bacteriophages. In these methodologies I describe the modification of sequences responsible for coding binding proteins in phages attacking *Escherichia coli*, so as to be able to encode binding proteins for OspA proteins which are specific for *Borrelia burgdorferi*. These methodologies are equally applicable to other bacteria found in and outside the *Ixodes ricinus* population. In addition to the aforementioned methodologies, I compared phage therapy and antibiotic treatment. Furthermore, I described the issue of the relationship between the immune system of patients and phages used in phage therapy and the issue of the laic public. In conclusion I described the potential use of phage therapy, and mentioned possible directions that bacteriophage research might take in the future.

9 Seznam obrázků

- Obr. 1. Základní schéma bakteriofága. *Převzato z Rosypala (2000).* 2
- Obr. 2. Morfologie *Ixodes ricinus*. *Převzato z Volfa a Horáka (2007).* 9
- Obr. 3. Strategií tvorby primerů a jejich využití pro inzerci, substituci a deleční mutagenezi. *Převzato z Qi a Scholthof (2008).* 21

10 Seznam tabulek

- Tab. 1. Primery použité pro mutagenezní PCR. *Převzato z Qi a Scholthof (2008).* 23